

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE

MARIA MARGARIDA MORENA DOMINGOS LEVENHAGEN

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARCINOGÊNICOS, GENOTÓXICOS
E ANTIGENOTÓXICOS DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Gomphrena*
Celosoides EM MODELO PRÉ-CLÍNICO**

CAMPO GRANDE
2024

MARIA MARGARIDA MORENA DOMINGOS LEVENHAGEN

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARCINOGENICOS, GENOTÓXICOS E
ANTIGENOTÓXICOS DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Gomphrena*
Celosoides EM MODELO PRÉ-CLÍNICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de Pesquisa: Carcinogênese experimental.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano de Oliveira

CAMPO GRANDE
2024



Ata de Defesa de Tese
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste
Doutorado

Aos sete dias do mês de novembro do ano de dois mil e vinte e quatro, às treze horas, na videoconferência, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Rodrigo Juliano Oliveira (UFMS), Aline Mackert dos Santos (UFMS), Camila do Nascimento Moreira (UFMS), RENATA COELHO RODRIGUES NORONHA (UFPA) e Valter Aragao do Nascimento (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **MARIA MARGARIDA MORENA DOMINGOS LEVENHAGEN**, CPF ***.503.776-**, Área de concentração em Saúde e Sociedade, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**AValiação dos Efeitos Genotóxicos do Extrato Etanólico de Gomphrena celosioides em Modelo Pré Clínico**" e orientação de Rodrigo Juliano Oliveira. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR(A)	ASSINATURA	AValiação
Dr. Rodrigo Juliano Oliveira (Interno) Presidente da Banca Examinadora	Documento assinado digitalmente  RODRIGO JULIANO OLIVEIRA Data: 06/12/2024 11:38:48-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	☒ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação
Dr. Valter Aragao do Nascimento (Interno)	Documento assinado digitalmente  VALTER ARAGAO DO NASCIMENTO Data: 06/12/2024 11:20:45-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	☒ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação
Dra. Camila do Nascimento Moreira (Interno)	Documento assinado digitalmente  CAMILA DO NASCIMENTO MOREIRA Data: 06/12/2024 11:32:07-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	☒ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação
Dr. Aline Mackert dos Santos (Externo)	Documento assinado digitalmente  ALINE MACKERT DOS SANTOS Data: 09/12/2024 09:15:55-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	☒ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação
Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha (Externo)		☐ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação
Dr. Adauto Lima Cardoso (Externo) (Suplente)	Documento assinado digitalmente  ADAUTO LIMA CARDOSO Data: 06/12/2024 10:59:44-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	☒ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação

RESULTADO FINAL: ☒ APROVAÇÃO ☐ APROVAÇÃO COM REVISÃO ☐ REPROVAÇÃO

OBSERVAÇÕES: A banca solicitou que o título da tese seja alterado para **AValiação dos Efeitos Carcinogênicos, Genotóxicos e Antigenotóxicos do Extrato Etanólico de *Gomphrena celosioides* em Modelo Pré-Clínico.**

Documento assinado digitalmente
 **MARIA MARGARIDA MORENA DOMINGOS DA SILVA**
Data: 06/12/2024 11:26:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do(a) Aluno(a)

Nada mais havendo a ser tratado, o(a) Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

A Deus.

A minha família pelo apoio incondicional,
em especial minha mãe Rosa Fernandes da Silva,
minha eterna admiração.

Ao meu querido Pai, (*in memoriam*), pelo
amor e ensinamentos.

Ao meu orientador pela confiança,
apoio e perseverança dedicada a este projeto.

AGRADECIMENTOS

À universidade Federal de Mato Grosso do Sul, e em especial ao Programa de Pós-graduação em saúde e desenvolvimento na região Centro-Oeste.

Ao meu orientador, Dr. Rodrigo Juliano Oliveira que tornou este projeto pessoal possível.

À Dra. Andréia Antonioli por dar início a esse projeto pessoal comigo e por me incentivar.

À Silvia Cordeiro Neves, pelas orientações e contribuições imprescindíveis.

À Profa. Dra. Nayane Moreira Machado e à estudante Bruna Cristina Silva pelas contribuições com experimento realizado com *Drosófilas*.

Ao professor Dr. Josafá Carlos de Siqueira pela identificação do material vegetal utilizado neste projeto.

Ao professor Alexandre Prof. Alexandre Azenha Alves de Rezende pela consultoria no Teste de Tumor Epitelial.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Bolsa processo: 21/09693- 5), ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Processo: 306603/2022-5, e 427859/2018-2), à FAEPEX-UNICAMP, à FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) para financiamento apoio e bolsas de estudo.

“O correr da vida embrulha tudo,
a vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem”

(GUIMARÃES ROSA, 1994).

RESUMO

O uso de plantas medicinais pela humanidade é uma prática antiga que ainda perdura, mesmo com grandes avanços na medicina, mantendo uma contribuição considerável para a conservação da saúde e alívio de enfermidades, tendo, portanto, destaque e impacto na Saúde Pública. A *Gomphrena*, erva popularmente conhecida como “Perpétua brava”, tem sido utilizada no tratamento de diversas condições em vários sistemas, com propriedades terapêuticas antitumorais, diuréticas, anti-hipertensivas, antimicrobianas citotóxicas, anti-inflamatórias e analgésicas. Apesar dos grandes avanços e da importância da espécie em termos de potencial terapêutico, mais estudos ainda são necessários para avaliar e confirmar a segurança de seu uso. Portanto, nosso objetivo é avaliar os efeitos genotóxicos, mutagênicos e imunomoduladores do extrato etanólico de *Gomphrena celosioides* (EEGc) em células somáticas de *Drosophila melanogaster* e em um modelo animal de camundongos Swiss. O modelo alternativo com *Drosophila* foi utilizado para a abordagem inicial e padronização da concentração do extrato a ser testado. Os resultados indicam que o extrato etanólico de *Gomphrena celosioides* (EEGc) não apresenta propriedades genotóxicas. Todas as concentrações testadas, do extrato de *Gomphrena celosioides* (0,96; 1,92; 3,85; 7,70 mg/mL) foram aprovadas na primeira etapa deste trabalho, e aplicadas para estimar a capacidade de induzir danos ao DNA de células somáticas de *Drosophila melanogaster*. EEGC não parece ter tido efeito carcinogênico em *Drosophila melanogaster*, mas em vez disso atuou como fator protetor, reduzindo a frequência de tumores menor que o controle negativo, de forma estatisticamente significativa. No modelo de camundongos animais, não houve evidência de genotoxicidade e a associação de EEGC com CTX foi capaz de reduzir a frequência de dano genotóxicos basal em ensaios de cometa e micronúcleos, mostrando capacidade protetora.

Palavras-chave: planta medicinal; Amaranthaceae; cometa; micronúcleo; fagocitose esplênica

ABSTRACT

The use of medicinal plants by humanity is an ancient practice that still continues, even with great advances in medicine, maintaining a considerable contribution to the conservation of health and relief from illnesses, therefore having prominence and impact on Public Health. *Gomphrena*, an herb popularly known as “Perpétua brava”, has been used in the treatment of various conditions in various systems, with antitumor, diuretic, antihypertensive, cytotoxic antimicrobial, anti-inflammatory and analgesic therapeutic properties. Despite the great advances and the importance of the species in terms of therapeutic potential, more studies are still needed to evaluate and confirm the safety of its use. Therefore, our objective is to evaluate the genotoxic, mutagenic, immunomodulatory effects of the ethanolic extract of *Gomphrena celosioides* (EEGc) in somatic cells of *Drosophila melanogaster* and in an animal model of Swiss mice. The alternative model with *Drosophila* was used for the initial approach and standardization of the concentration of the extract to be tested. The results indicate that ethanolic extract of *Gomphrena celosioides* (EEGc) does not present genotoxic properties. All concentrations tested, of *Gomphrena celosioides* extract (0.96; 1.92; 3.85; 7.70 mg/mL) where approved at first step of this work, and applied to estimate the ability to induce damage to the DNA of *Drosophila melanogaster* somatic cells. EEGC does not appear to have had a carcinogenic effect on *Drosophila melanogaster*, but instead it acted as a protective factor, reducing frequency of tumors lower than the negative control, in a statistically significant way. In animal mice model, there was no evidence of genotoxicity and the association of EEGC with CTX was able to reduce the frequency of basal genotoxic damage in comet and micronuclei assays, showing protector ability.

Keywords: Medicinal plants; *Drosophila melanogaster*; Swiss mice; Carcinogenesis; Comet; Micronucleus

LISTAS DE CONTEUDO

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Gomphrena celosioides</i> Mart-----	16
Figura 2. Ilustração do cruzamento entre linhagens <i>Drosophila melanogaster</i> -----	20
Figura 3. Taxa de sobrevivência da <i>Drosophila melanogaster</i> após tratamento com diferentes concentrações de EEGC de <i>Gomphrena celosioides</i> -----	27
Figura 4. Frequência de clones de tumor observados em <i>Drosophila melanogaster</i> , heterozigota para o gene supressor de tumor <i>wt</i> s, tratadas com diferentes concentrações isoladas de EEGC-----	27
Figura 5. Diagrama didático do cruzamento de linhagem entre machos do <i>mwh/mhw</i> e fêmeas virgens do <i>wt</i> s/ <i>Sb</i> 1. O cromossomo 3 é representado contendo os genótipos <i>mwh/mhw</i> e <i>wt</i> s/ <i>Sb</i> 1. + indica o alelo do tipo selvagem-----	28
Figura 6. Delineamento camundongos-----	29
Figura 7. Taxa de sobrevivência das larvas tratadas com o extrato etanólico de <i>Gomphrena celosioides</i> (EEGc) nas concentrações de 0,96, 1,92, 3,85 e 7,70 mg/mL-----	33
Figura 8. Valores médios $\pm$ desvio padrão dos parâmetros biométricos dos animais tratados com extrato etanólico de <i>Gomphrena celosioides</i> (EEGc) isolado ou em associação com a ciclofosfamida-----	36
Figura 9. Valores médios $\pm$ desvio padrão da frequência de células com fagocitose no baço dos animais tratados com extrato etanólico de <i>Gomphrena celosioides</i> (EEGc) isolado ou em associação com a ciclofosfamida-----	39

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Frequência de clones de tumor observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, tratadas com diferentes concentrações do extrato etanólico de *Gomphrena celosioides* (EEGc)-----32

Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvio padrão da frequência de células com danos no DNA, distribuição das células pelas classes de danos, score e porcentagem de redução de danos no DNA de animais tratados com o extrato etanólico de *Gomphrena celosioides* (EEGc) isolado ou associado com ciclofosfamida-----37

Tabela 3. Valores médios $\pm$ desvio padrão da frequência de micronúcleos e porcentagem de redução de danos no DNA de animais tratados com o extrato etanólico de *Gomphrena celosioides* (EEGc) isolado ou associado com ciclofosfamida-----38

Sumário

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
	2.1 PLANTAS MEDICINAIS.....	13
	2.2 <i>Gonphena celosioides</i> MART	15
	2.3 MODELOS BIOLÓGICOS	19
	2.3.1 Teste para detecção de clones de tumores epiteliais (ETT) em <i>Drosophila melanogaster</i>	19
	2.3.2 Ensaio Genotoxicidade em Camundongo Swiss	20
	2.3.3 Ensaio de Fagocitose Esplênica	22
3	OBJETIVOS	24
	3.1 OBJETIVO GERAL	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
	4.1 MATERIAL BOTÂNICO E PREPARAÇÃO DO EXTRATO	25
	4.2 AGENTES QUÍMICOS.....	25
	4.3 EXPERIMENTO I	26
	4.3.1 Teste de sobrevivência e para detecção de clones de tumores epiteliais (ETT) em <i>Drosophila melanogaster</i>	26
	4.4 EXPERIMENTO 2	28
	4.4.1 Animais e delineamento experimental	28
	4.4.2 Ensaio biológicos	30
	4.5. CÁLCULO DA PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DE DANOS (RD%)	32
	4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5.	RESULTADOS	33
	5.1 EXPERIMENTO I – SOBREVIVÊNCIA, ESTIMATIVA DOS DANOS EM CÉLULAS SOMÁTICAS E DA FREQUÊNCIA DE TUMORES (ETT) EM <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	33
	5.2 EXPERIMENTO II – AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E ANTIGENOTÓXICA EM CAMUNDONGOS.....	35
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÃO	45
8	REFERÊNCIAS	45

ANEXO 1- ARTIGO

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais pelo homem no tratamento, cura e prevenção de doenças tem origens tão remotas, que parecem coincidir com o surgimento da humanidade (MORAES; SANTANA, 2001; FIRMO *et al.*, 2011). Essa prática tão antiga ainda se sustenta, apesar do grande avanço da medicina, mantendo uma considerável contribuição para a conservação da saúde e alívio de sintomas, tendo, portanto, destaque e impacto na Saúde Pública (FIRMO *et al.*, 2011).

A família Amaranthaceae contém mais de 120 espécies catalogadas que são encontradas na América, Austrália, Ásia e oeste da África. No Brasil foram descritas 46 espécies (VIEIRA *et al.*, 1994; OLUWABUNMI; ABIOLA, 2015) com ocorrência confirmada nas cinco grandes regiões brasileiras (Centro-Oeste, Norte, Nordeste, Sudeste e Sul) nos biomas da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (SALUSTRIANO *et al.*, 2022). Nesta família encontra-se o gênero *Gomphrena* e nesse a espécie *Gomphrena celosioides* (SALUSTRIANO *et al.*, 2022).

Dentre as plantas utilizadas na medicina popular, destaca-se a *G. celosioides* (SANGARE *et al.*, 2012), uma erva popularmente conhecida como perpétua brava, perpétua, botão de solteiro e globo-amaranto prostrado (MYERS *et al.*, 2000; VASCONCELOS *et al.*, 2018). *G. celosioides* tem indicação de uso popular para o tratamento de distúrbios do trato urinário e pedra nos rins (PRACHI; KUMAR; KASANA, 2009; SHARMA; VIJAYVERGIA, 2011; VASCONCELOS *et al.*, 2017a; VASCONCELOS *et al.*, 2018), além de doenças de pele, infecciosas, (MACORINI *et al.*, 2020), gastrointestinais e respiratórias (VASCONCELOS *et al.*, 2017a). Na América do Sul essa planta é ainda usada como abortiva (BURKILL, 1985).

Em relação à toxicidade de *G. celosioides* verifica-se que o extrato etanólico tem uma DL₅₀ superior a 2.000mg/Kg (MACORINI *et al.*, 2022) e o extrato aquoso uma DL₅₀ acima de 4000mg/kg (SOULEYMAN *et al.*, 2014). Destaca-se ainda que o extrato etanólico tem baixa toxicidade em teste de doses repetidas por 28 dias (MACORINI *et al.*, 2022). Além disso, verificou-se em estudo prévio de nosso grupo que o extrato etanólico de *G. celosioides* (EEGc), o mesmo testado nesse estudo, não possui efeitos genotóxicos e também não alterou o desempenho reprodutivo e o desenvolvimento embrionário quando fêmeas de camundongos prenhes foram expostas durante todo o período gestacional (SALUSTRIANO *et al.*, 2022). Além disso, o efeito abortivo relatado

anteriormente (BURKILL, 1985) não foi confirmado. No entanto, apesar da literatura apresentada ainda são poucos os artigos que versão sobre os efeitos tóxico, genotóxicos e tóxico reprodutivos sobre essa espécie. Assim, ainda são necessários mais estudos que avaliem e ratifiquem a segurança do seu uso em modelo pré-clínico. Além disso, é importante compreender o seu efeito antigenotóxico visto que essa espécie já foi descrita como rica em produtos com possível efeito antigenotóxico e/ou anticâncer (ácidos fenólicos e flavonoides, por exemplo) (VASCONCELOS *et al.*, 2017a).

Diante do exposto, tendo em vista, o recorrente uso de medicamentos à base de plantas medicinais, embasado por conhecimento popular, torna-se necessário a implementação de pesquisas de investigação e esclarecimento dos reais efeitos terapêuticos e adversos do uso de determinadas espécies, como forma de tornar seu uso mais seguro e eficaz (FIRMO *et al.*, 2011). Dessa forma, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar os efeitos carcinogênicos, genotóxicos e antigenotóxicos do extrato etanólico de *Gomphrena celosioides* (EEGc) em modelo pré-clínico

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população faz ou fez uso de plantas medicinais na atenção básica à saúde em busca de alívio de sintomas e tratamento de doenças (BRASIL, 2016). Essa prática remonta séculos atrás visto que as plantas medicinais são utilizadas desde os primórdios das civilizações (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

O conhecimento acumulado por séculos, décadas e anos é o que fomenta a etnofarmacologia. Essa ciência traz o conhecimento popular, principalmente sobre as plantas medicinais, organizado a fim de destacar as fontes terapêuticas utilizadas em diversas culturas. Assim, essa ciência tornou-se uma ferramenta na descoberta de drogas (COSTA *et al.*, 2010).

O interesse pelas terapias a base de produtos naturais cresceu, principalmente, em países industrializados e então verificou-se, principalmente, a expansão do uso de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2006). Pode-se verificar também que os produtos naturais, incluindo os derivados de plantas, são bases para o desenvolvimento de

modernas drogas com caráter terapêutico que têm os seus desenvolvimentos abarcados no conhecimento tradicional (CALIXTO, 1997; RATES, 2001).

Assim observa-se que as plantas medicinais têm importância para a pesquisa farmacológica e para o desenvolvimento de novas drogas e medicamentos. Essa importância não reside somente nos produtos isolados das plantas. Mas, essas podem ser matéria prima também para os fitoterápicos e a síntese de outros fármacos (BRASIL, 2006). Isso se deve à potencialidade das plantas que ainda precisa ser descoberta e explorada (SCHENKEL, GOSMANN, PETROVICK, 2003).

Destaca-se ainda que no Brasil, um país com dimensões continentais, há um incentivo ao uso de plantas e fitoterápicos porque esses podem compor uma estratégia para o enfrentamento de desigualdades regionais em especial em regiões com baixos indicadores econômicos e sociais (BRASIL, 2016). Na tentativa de reduzir essa desigualdade e também assistir melhorar a sua população, o Ministério da Saúde criou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse para o Sistema Único de Saúde (SUS) ([Renisus](#)). Essa lista contém cerca de 71 espécies que estão em análise e já possuem indicação de uso popular confirmado cientificamente e inclusive configuram como uso seguro (BRASIL, 2009; NUNES *et al.*, 2023; REZENDE *et al.*, 2023).

Diante do exposto, observa-se que a medicina tradicional e a medicina complementar e alternativa estão cada vez mais presente, em conjunto, nas políticas públicas nacionais e internacionais. Ressalta-se ainda, que essas políticas regulamentaram os produtos oriundos das práticas tradicionais e contemplem, entre outros, os conceitos de medicina tradicional e medicina complementar/alternativa (BRASIL, 2016).

As políticas de valorização do meio ambiente e da diversidade é um crescente no mundo. O Brasil também está valorizando mais a sua flora como fonte de princípios ativos e fitomedicamentos. Logo, as plantas medicinais e seus subprodutos, incluindo os fitoterápicos, deixaram de ser considerados apenas como terapias alternativas e passaram a ser compreendidos de forma sistêmica e racional com vistas a uma abordagem dos fenômenos envolvidos nas questões de saúde e qualidade de vida (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017). Reforça essa assertiva o fato do Governo Federal ter aprovado o Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, sobre a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) que visa ampliar as opções terapêuticas e melhorar a atenção à saúde aos usuários do SUS; usar de forma sustentável da biodiversidade brasileira;

valorizar e preservar o conhecimento tradicional das comunidades e povos tradicionais; fortalecer a agricultura familiar para promover crescimento com geração de emprego e renda e redução das desigualdades regionais; promover desenvolvimento tecnológico e industrial; promover inclusão social e redução das desigualdades sociais, e promover participação popular e controle social (BRASIL, 2009).

2.2 *Gonphena celosioides* MART

G. celosioides Mart é uma planta herbácea pertencente à família Amaranthaceae e ao gênero *Gomphrena*. Essa planta é conhecida popularmente como perpétua, perpétua-brava, botão de solteiro e globo-amaranto prostrado (MYERS *et al.*, 2000; VASCONCELOS *et al.*, 2018; SALUSTRIANO *et al.*, 2022). Esta espécie tem ocorrência confirmada nas regiões Norte (Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins), Nordeste (Bahia, Maranhão, Pernambuco, Rio Grande do Norte), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) do Brasil. Além disso há registro da sua presença possível ocorrência nos estados do Amazonas, Amapá, Alagoas, Ceará, Paraíba, Piauí e Sergipe (SENNA; SIQUEIRA; MARCHIORETTO, 2015; SALUSTRIANO *et al.*, 2022). Além do Brasil essa espécie também é encontrada em toda a América do Sul, Ásia e África (TAKIM; OLAWOYIN; OLANREWaju, 2013; CHASSAGNE *et al.*, 2017; VASCONCELOS *et al.*, 2018; SALUSTRIANO *et al.*, 2022).

G. celosioides ocupa áreas de lavouras e destinadas à oleicultura. Ela também pode ser encontrada em áreas de paisagismo já que é vastamente utilizada como forração de canteiros em substituição a gramados. Com aspecto herbáceo, possui folhas opostas cruzadas, lanceoladas ou ovaladas, desprovidas de pecíolos, pilosas e de margem inteira. A inflorescência tem aspecto de espiga globosa que se transforma em cilíndrica à medida que o eixo cresce. Ela é suportada por duas brácteas foliáceas e é composta por muitas flores de cor branca, rosa ou lilás, dependendo da variedade (Figura 1) (MOREIRA; BRAÇANÇA, 2011). Descreve-se ainda que essa erva daninha, que pode ser anual ou perene de vida curta (MYERS *et al.*, 2000), possui caule ereto com cerca de 10 a 20 cm de comprimento, pouco ramificado e recoberto com pelos brancos sedosos. Possui folhas oblongo-lanceoladas a oblongo-obovadas, com 1,5 a 4,5 cm de comprimento e 0,5 a 1,3

cm de largura. As flores são terminais e axilares com pontas cilíndricas, medindo de 1 a 2 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro (WAGNER; HERBST; SOHMER, 1999). O seu crescimento também é registrado ao longo de estradas, margens de rios, ferrovia e pousio chegando a invadir pastagens. Destaca-se a sua presença ainda em culturas de terras secas e plantações (SUZANE *et al.*, 2010).



Figura 1. *Gomphrena celosioides* Mart., obtida em Manual de Identificação de Plantas, Embrapa (MOREIRA; BRAÇANÇA, 2011).

Apesar da ampla presença da espécie, em plantações e pastagens, esta, é pouco consumida por animais, e é comprovadamente tóxica para equinos se ingerida em excesso ou por longos períodos (FANK-DE-CARVALHO; GRACIANO-RIBEIRO, 2005).

Uma revisão sobre o gênero *Gomphrena* demonstra que a decocção de toda a planta *G. celosioides* e também de *G. globosa* Linn pode ser usada em feridas com grangrena (ARENAS; AZOREARO, 1977), *G. martiana* e *G. boliviana* são indicadas para o tratamento de infecções microbianas (POMILIO *et al.*, 1992). Além dessas informações a literatura, de maneira geral, informa que *G. celosioides* tem indicação de uso popular para o tratamento de distúrbios do trato urinário e pedra nos rins (PRACHI; KUMAR; KASANA, 2009; SHARMA; VIJAYVERGIA, 2011; VASCONCELOS *et al.*, 2017a; VASCONCELOS *et al.*, 2018), além de doenças de pele, infecciosas, (MARCORINI *et al.*, 2020), gastrointestinais e respiratórias (VASCONCELOS *et al.*, 2017a). Além disso, essa planta é utilizada como abortiva na América do Sul (BURKILL, 1985).

Estudos fitoquímicos de *G. celosioides* demonstraram a presença de saponinas, esteroides, aminoácidos, açúcares não redutores, fenóis, flavonoides, cetoses e

betacianinas (BOTHÁ; GERRITMA-VAN DER VIJVER, 1986). O fracionamento de partes aéreas indicaram a presença de ácido 4-hidroxi-benzóico e ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico (ácido vanílico), estigmasterol, sitosterol e campesterol. Em extratos das raízes foram encontrados ecdisterona metil palmitato, stigmast-6-em-3-Ob-(Dglicopiranosídeo) e estigmasterol (MOURA *et al.*, 2004). O extrato utilizado nesse estudo tem em sua constituição ácido málico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido vanílico, catequina, Irisona B, Dimetoxi-flavona e cafeoil-glicose (VASCONCELOS *et al.*, 2017a).

Na literatura científica, *G. celosioides* está descrita como antioxidante e imunomodulatória (GHONIME *et al.*, 2015), nematotóxica (IKRAM *et al.*, 2022), antimicrobiano (MOURA *et al.*, 2004; DOSUMU *et al.*, 2010), gastroprotetora (OLUWABUNMI; ABIOLA; 2015); diurética cardioprotetora e reguladora da pressão arterial (VASCONCELOS *et al.*, 2017a; VASCONCELOS *et al.*, 2018), antihiperalgésica e antiartrítica (MARCORINI *et al.*, 2020). Além disso, há registro de segurança do uso dessa planta em modelos experimentais. Alguns estudos procuraram edificar a DL₅₀, que é definida como a dose mediana prevista para matar 50% de uma determinada população de teste, ferramenta que procura estabelecer o risco de letalidade aguda (MORRIS-SCHAFFER; MCCOY, 2021). De acordo com Souleyman *et al.* (2014), a DL₅₀, na toxicidade aguda, para extrato aquoso de *G. celosioides* é superior a 4000 mg/kg. Já para o extrato etanólico, o mesmo usado nesse estudo, a DL₅₀ está acima de 2000 mg/kg (MACORINI *et al.*, 2022). Ainda segundo os mesmos autores, esse extrato tem baixo potencial toxicológico no teste de dose múltiplas, ou seja, camundongos machos e fêmeas não demonstram sinais de intoxicação após exposição por 28 dias para as doses de 75, 150 e 300mg/kg/dia (MACORINI *et al.*, 2022). Além disso, Salustriano *et al.* (2022) demonstrou ausência de genotoxicidade e ausência de alteração do desempenho reprodutivo e do desenvolvimento embrio fetal para fêmeas de camundongos prenhes tratadas por 18 dias com as doses de 100, 1000 e 2000 mg/kg/dia.

Em detalhamento das evidências pré-clínicas da eficácia de *G. celosioides* destaca-se que o extrato etanólico nas doses de 300, 700 e 1000 mg/kg reduziu a formação de edema e a hiperalgesia mecânica. A hiperalgesia ao frio após 3 horas foi inibida pelas doses de 700 e 1000 mg/kg e após 4 horas o efeito foi observado somente para a dose de 1000 mg/kg. Além disso, a dose de 1000 mg/kg reduziu o número de leucócitos migrados, sem interferir no extravasamento de proteínas, no modelo de pleurisia induzida por carragenina. A dose de 300 mg/kg reduziu a migração de leucócitos no edema articular induzido por zymosan. Foi evidenciado ainda, que para essa mesma dose, redução da

adesão e migração e rolamento de leucócitos na peritonite induzida por zymosan. No modelo de inflamação induzida por Adjuvante Completo de Freud observou-se que o extrato foi capaz de reduzir a formação de edema e reduzir a hiperalgesia mecânica. Observou-se também efeito sobre a alodinia ao frio. Esses resultados demonstram potencial anti-hiperalgésico e antiartrítico em modelos agudos e persistente confirmando o potencial analgésico natural descrito popularmente para essa planta (MACORINI *et al.*, 2020).

Essa planta ainda é indicada para doenças renais e o estudo de Vasconcelos *et al.* (2018) demonstrou que o extrato etanólico de *G. celosioides* reduziu de forma aguda a pressão arterial média na dose de 100 mg/kg. Em teste de 4 semanas o extrato demonstrou efeito diurético após administração aguda em todas as semanas avaliadas. O extrato também atuou como anti-hipertensivo e seus efeitos significativos já foram observados na primeira semana de tratamento que se estenderam até a quarta semana quando o experimento foi encerrado. Esse extrato inibiu a enzima conversora de angiotensina levando-a a níveis mais baixos que de aldosterona. Os exames demonstraram baixos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e manutenção do óxido nítrico, logo infere-se efeito antioxidante. Ademais, o extrato reduziu o comprometimento da reatividade vascular induzido pela hipertensão renovascular o que está associado à parede ventricular esquerda mais fina o que indica redução do remodelamento cardíaco induzido pela hipertensão. Assim, os autores concluíram que o efeito diurético do extrato é mantido em ratos hipertensos renovasculares e pode reduzir a pressão arterial após a primeira semana de tratamento pela inibição da enzima conversora de angiotensina com efeitos duradouros e fortes o suficiente para promover proteção contra a remodelação cardíaca.

Ainda para esse extrato de *G. celosioides* sugere-se efeito diuréticos e natriuréticos. A administração oral de 100 e 300 mg/kg aumentou significativamente a produção de urina ao longo de 8 horas e esse fato foi dependente das vias do óxido nítrico, das prostaglandinas e da bradicinina porque os seus inibidores reduziram os efeitos do extrato. Além disso, o efeito pode ser observado mesmo após 7 dias do tratamento e ainda foi associado à diminuição de aldosterona sérica nos grupos tratados com o extrato (VASCONCELOS *et al.*, 2017a).

Também é destaque para o extrato de *G. celosioides* o seu efeito gastroprotetor. De acordo com Oluwabunmi; Abiola (2015), ratos Wistar tratados pré-tratados com extrato metanólico de *G. celosioides* apresentaram uma redução do escore de úlcera, do

índice de úlcera, do volume gástrico e da acidez gástrica total em modelo de úlcera induzida por indometacina.

Destaca-se ainda que *G. celosioides* já testada como anticâncer. No entanto, a literatura demonstrou que o extrato tem baixo efeito antitumoral *in vitro*. O extrato etanólico de *G. celosioides* (EEGc) apresentou IC₅₀ acima de 1000 µg/mL em células das linhagens KKU-100 (JCRB 1568) e KKU-213 (JCRB 1557) (PROMRAKSA *et al.*, 2019) e superior a 250 µg/mL para os extratos etanólico e aquoso em células HepG2 (CHASSAGNE *et al.*, 2017). Esses fatos podem desacreditar que essa planta tenha efeitos anticâncer e que deva ser prospectada como um quimioterápico. No entanto, ela está descrita como não foi genotóxica em camundongos Swiss fêmeas prenhes (SALUSTRIANO *et al.*, 2022) e ela possui constituintes que são antioxidantes (BOTHÁ; GERRITMA-VAN DER VIJVER, 1986; MOURA *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2017a). A junção dessas informações literárias justifica a avaliação antigenotóxica dessa espécie.

2.3 MODELOS BIOLÓGICOS

2.3.1 Teste para detecção de clones de tumores epiteliais (ETT) em *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster é um organismo-modelo utilizado por pesquisadores para realização de diferentes testes. A manutenção em laboratório é considerada simples devido às diversas características favoráveis tais como: grande número de indivíduos por progênie, ciclo reprodutivo curto, de cerca de 10 a 12 dias à temperatura de 25° C; baixo número de cromossomos, com reações metabólicas semelhantes às dos mamíferos (GRAF *et al.*, 1984) e disponibilidade de estoques vivos com mutações em diversos genes (GARCIA; FERNÁNDEZ, 2011).

Já foi comprovado e estabelecido a afinidade genética da espécie com vertebrados, de forma que os genes que desempenham papéis importantes no controle do ciclo celular em *D. melanogaster* são semelhantes aos genes dos vertebrados, que são responsáveis por funções semelhantes, sugerindo uma origem evolutiva comum (PANDEY; NICHOLS, 2011). Um dos genes envolvidos é o *wts*, homólogo ao LATS1, presente em mamíferos e que atua como supressor de tumor (EKEN *et al.*, 2002).

D. melanogaster dispõe de um disco imaginal, correspondente a um grupo de células em estágio larval que durante a metamorfose se desenvolvem nas estruturas da epiderme do indivíduo adulto (EEKEN *et al.*, 2002). Em homozigose, o marcador *wts* é uma mutação recessiva letal nos zigotos. Em virtude da letalidade, o alelo *wts* é conservado na linhagem estoque com o acompanhamento de um balanceador cromossômico (TM3, Sb¹).

Por meio do cruzamento (Figura 2) entre linhagens *wts/TM3, Sb¹* e *multiple wing hair (mwh/mwh)* são obtidas larvas heterozigotas (*wts/+*). Se acontecer a perda de heterozigose do disco imaginal da *D. melanogaster*, existirá a possibilidade de proliferação de clones homozigotos na larva, que irá se manifestar na de tumores na mosca adulta (SIDOROV *et al.*, 2001).

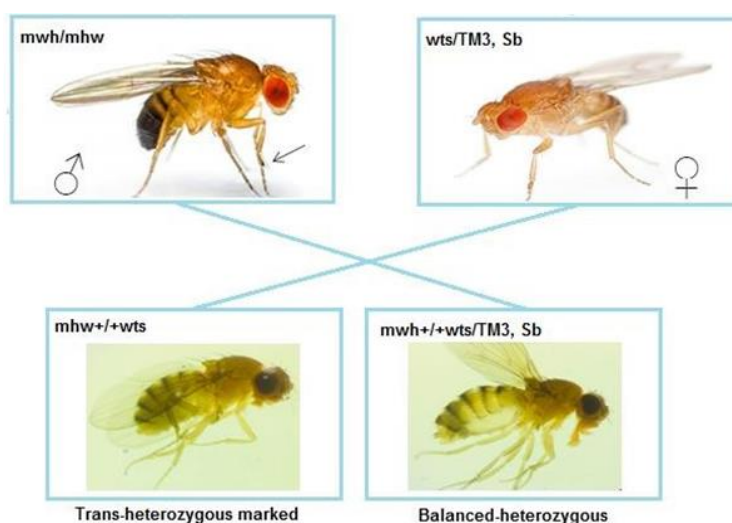


Figura 2. Ilustração do cruzamento entre linhagens *wts/TM3, Sb¹* e *multiple wing hair (mwh/mwh)*. Imagens do arquivo pessoal da pesquisadora Nayane Moreira Machado do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM.

2.3.2 Ensaios Genotoxicidade em Camundongo Swiss

Genotoxicidade é definido como alteração na estrutura ou função da molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico) resultante da interação deste, com agente genotóxico (CAMARGO *et al.*, 1994). Dentre os agentes com potencial genotóxico, estão também alguns vegetais que ao serem consumidos em estado natural ou por meio de preparos como extratos, infusões, decocção, maceração ou outros podem induzir danos graves inclusive com potencial teratogênico hereditário (OLIVEIRA *et al.*, 2013; ISHIKAWA, 2017). A avaliação da genotoxicidade conta com metodologias clássicas como é o caso

do ensaio do cometa e do micronúcleo e esses podem ser complementados pelo teste de fagocitose esplênica (CARVALHO *et al.*, 2015).

2.3.2.1 Ensaio do cometa

Também denominado de eletroforese em gel de uma única célula, o ensaio cometa foi originalmente descrito pelos pesquisadores suecos Östling; Johanson (1984) como uma metodologia sensível que avalia e quantifica danos no DNA de células individuais (SINGH *et al.*, 1988).

Trata-se de um teste amplamente empregado em estudos científicos devido à eficácia, praticidade e baixos custos associados. Sua metodologia consiste em depositar células a serem avaliadas em gel agarose que, sobre uma lâmina de vidro, são submetidas a uma solução de lise, com subsequente desnaturação do DNA e eletroforese em pH alcalino. A eletroforese então leva ao deslocamento do DNA fragmentado para longe do nucleóide, o que forma estrutura semelhante a um cometa (ALVAREZ-MOYA *et al.*, 2011).

A metodologia de análise pode ser visual ou computadorizada. No presente estudo foi utilizada a metodologia descrita por Kobayashi *et al.* (1995). Segundo esses autores, células que não apresentarem cauda, serão consideradas não danificadas e receberão classificação classe 0; células com cauda menor que o diâmetro do nucleóide serão classificadas como classe 1; as células com cauda de tamanho entre 1 e 2 vezes o diâmetro do nucleóide serão consideradas classe 2; e células com cauda maior que 2 vezes o diâmetro do nucleóide serão classificadas como classe 3. Células com nucleóide totalmente fragmentado não são contabilizadas e podem ser indicativo de ocorrência de apoptose que deve ser confirmada por outros métodos.

2.3.2.2 Ensaios do micronúcleo

O teste do micronúcleo tem a capacidade de detectar alterações cromossômicas como ausência de centrômero (efeito clastogênico) ou erros no funcionamento do fuso mitótico (mecanismo aneugênico) (KASHYAP; REDDY, 2012). O teste é considerado positivo para dano genotóxico devido à presença de grande quantidade de micronúcleos a análise microscópica, indicando alteração irreparável do DNA (HEDDLE *et al.*, 1991). Assim, os micronúcleos são quantificadores da exposição a agentes químicos ou físicos capazes de alterar permanentemente a molécula de DNA (TUCKER; PRESTON, 1996)

e, portanto, são ferramentas da área de genética toxicológica para prever atividade cancerígena de um composto (KRISHNA *et al.*, 2000).

Para estudos *in vivo* em mamíferos, o teste do micronúcleo em sangue periférico geralmente é feito em linfócitos periféricos e eritrócitos (TUCKER; PRESTON, 1996). No entanto, uma técnica amplamente utilizada é aquela que utiliza preparações a partir de medula óssea (SCHMID, 1975).

De acordo com Schmid (1975), os micronúcleos devem ser avaliados em hemácias jovens, pois quando os eritroblastos expõem seus núcleos e se transformam em eritrócitos, os micronúcleos tornam-se facilmente observáveis no citoplasma devido à sua morfologia arredondada e coloração.

Hayashi *et al.* (1990), no intuito de permitir amostragens diversas de um mesmo animal, desenvolveram e descreveram a técnica de micronúcleo em sangue periférico pela coloração com Laranja de Acridina. Este corante ao se intercalar com moléculas de DNA, sob luz ultravioleta, emite uma fluorescência de cor amarela. Logo os micronúcleos ou números tornam-se facilmente identificáveis. Quando esse mesmo corante se liga às fitas simples de RNA ele fluoresce em vermelho fazendo um bom contraste e facilitando assim a identificação dos micronúcleos. Os micronúcleos em geral estão na periferia das áreas coradas em vermelho ou no seu centro. No entanto, micronúcleos não podem estar separados de regiões contendo RNA.

De acordo com Michiko *et al.* (1992), estudos comparativos entre a técnica convencional, em medula óssea, corada por Giemsa, e a técnica que utiliza pré-coloração com Laranja de Acridina demonstram uma boa correlação. Logo essas técnicas mostram-se adequadas para este tipo de avaliação. Porém, a técnica de sangue periférico apresenta uma vantagem importante já que um mesmo animal pode fornecer várias amostras de material, sem a necessidade de eutanásia (CSGMT, 1992).

2.3.3 Ensaio de Fagocitose Esplênica

O baço apresenta função hematopoiética e imunomodulatória importante. As células esplênicas capturam antígenos e os apresentam aos linfócitos T e B, que interagem estimulando a geração de plasmócitos secretores de anticorpos. O baço é capaz de sequestrar leucócitos e plaquetas levando a quadro de leucopenia. Devido a sua importância na regulação imunológica, avaliar recrutamento de fagócitos como forma de

entender melhor os efeitos imunomodulatórios dos compostos em testes (HAYASHI *et al.* 1990; MEBIUS; KRAAL, 2005) é importante. Assim, o ensaio de fagocitose esplênica avalia se a atividade fagocítica foi ou não aumentada em função de danos no DNA (CARVALHO *et al.*, 2015). Logo a avaliação da fagocitose é importante para verificar se o baço está ou não sequestrando células com lesões de DNA a ponto de subestimar a frequência de danos genômicos (avaliados pelo teste do cometa) ou cromossômicos (avaliados pelo teste do micronúcleo (NAVARRO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2023; CORREIA *et al.*, 2024).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos biológicos do extrato etanólico de *Gomphrena celosioides* (EEGc) a nível carcinogênico, genotóxico e antigenotóxico em modelo pré-clínico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos carcinogênicos do EEGc em *Drosophila melanogaster*;

Investigar a atividade genotóxica do EEGc em sangue periférico de camundongo Swiss;

Avaliar os efeitos antigenotóxicos do EEGc em sangue periférico de camundongo Swiss;

Avaliar a atividade fagocítica esplênica do EEGc em camundongo Swiss;

Avaliar os efeitos do EEGc nos parâmetros biométricos de camundongos Swiss.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO E PREPARAÇÃO DO EXTRATO

O extrato etanólico de *Gomphrena celosioides* (EEGc) foi produzido a partir de material vegetal de partes aéreas da planta conforme método descrito em publicações prévias de nosso grupo de estudo. O EEGc usado nesse estudo também foi utilizado por Vasconcelos *et al.* (2017a) e Salustriano *et al.* (2022) e a caracterizados do extrato foi, portanto, previamente descrito na literatura. No entanto, os extratos foram testados para confirmar a mesma composição ao longo dos anos (VASCONCELOS *et al.*, 2017a). Amostras vegetais foram coletadas em abril de 2014 em Paranaíba, Mato Grosso do Sul, nas coordenadas geográfica: Brasil [lat: -19.666667 long: -51.183333 WGS84], analisadas e catalogadas pelo professor Dr. Josafá Carlos de Siqueira, docente na Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ). Um exemplar foi arquivado no Herbário da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FFCLRP/USP) sob número SPFR-2962. Esta espécie foi registrada no Registro Nacional Sistema de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados (SISGEN) sob os códigos AF99A04 e ASEC80E.

4.2 AGENTES QUÍMICOS

O EEGc foi solubilizado em Tween 80 (1%) e, posteriormente, diluído com água destilada. As concentrações utilizadas no teste para a detecção de clones de tumores epiteliais (ETT) em *D. melanogaster* foram 0,96, 1,92, 3,85 e 7,70 mg/mL. Estas concentrações foram definidas em experimento piloto (dados não mostrados). As doses usadas no estudo com camundongos foram de 100, 1000 e 2000 mg/kg de peso corpóreo (p.c.) por gavagem (via oral – v.o.). De acordo com Vasconcelos *et al.* (2017a), a dose de 100 mg/kg tem efeito diurético e por isso ela foi escolhida como uma dose efetiva e terapêutica. As outras duas doses foram baseadas no estudo de Salustriano *et al.* (2022) e segundo esse estudo a dose de 1.000 mg/kg é uma dose de segurança (10x maior) do que a dose efetiva/terapêutica (ANVISA, 2010; OECD 421, 2015) e a dose de 2.000 mg/kg foi definida como a dose limite de acordo com as diretrizes de toxicidade oral aguda (OECD 425, 2008).

A doxorubicina (Rubidox, Bergamo, Brazil), diluída em água destilada, foi utilizada como controle positivo, na concentração de 2,17 mg/mL (0,4 mM)

(VASCONCELOS *et al.*, 2017b), para o teste de detecção de clones de tumores epiteliais (ETT) em *D. melanogaster*.

A ciclofosfamida (Fosfaseron, Ítaca Laboratorios, REG. MS No. 1.2603.0056.002-1; Lote 063020, Brazil), diluída em água destilada, foi utilizada como controle positivo, na dose de 100 mg/kg p.c. por via intraperitoneal (i.p.), para os testes com camundongos Swiss (OLIVEIRA *et al.*, 2023; CORREA *et al.*, 2024).

4.3 EXPERIMENTO I

4.3.1 Teste de sobrevivência e para detecção de clones de tumores epiteliais (ETT) em *Drosophila melanogaster*

As linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*: *Multiple Wing Hair* (mwh/mhw) e wts/TM3 foram cultivadas isoladamente (Figura 3). Em seguida, fez-se a separação e cruzamento de machos da linhagem mwh/mhw e fêmeas virgens da linhagem wts/TM3 (Figura 4; Figura 5). A postura ocorreu em meio de postura (frascos contendo uma base de sólida de ágar (3 % de ágar em água) e uma camada de fermento biológico fresco e açúcar). Após 72 ± 4 horas os frascos foram lavados com água de osmose reversa e as larvas trans-heterozigotas marcadas (wts^{+/+}mwh) e heterozigotas balanceadas (TM3, Sb1 ^{+/+} mwh) foram obtidas com o auxílio de uma peneira.

Para avaliar a toxicidade, foi realizado o teste de eclosão (RAND *et al.*, 2014). Para tanto de 50 larvas foram transferidos para frascos de vidro contendo 1,5 g de meio de purê de batatas instantâneo (marca Yoki Alimentos S. A., São Paulo, Brasil), como um meio de cultura alternativo para *Drosophila* (SPANNO *et al.*, 2001), umedecidos com 5 mL das diferentes concentrações de EEGc (0,96, 1,92, 3,85 e 7,70 mg/mL). Para controle negativo utilizou-se Tween 80 (1 %) e para o controle positivo Doxorubicina (2,17 mg/mL) (VASCONCELOS *et al.*, 2017b). Ao final da coleta foram avaliados os números de larvas vivas e mortas e descritas na forma de porcentagem. Para que a dose fosse utilizada no próximo teste era necessário que pelo menos 70 % das larvas estivessem vivas.

Um segundo grupo de frascos, com os mesmos tratamentos, foi preparado para o teste ETT e aguardou-se a eclosão dos descendentes. Os descendentes portadores do genótipo wts^{+/+}mhw, foram separados e identificados pela presença de pelos selvagens fenotípicos (longos e finos). Já os descendentes, que apresentam pelos curtos e grossos,

pertencentes à progênie heterozigoto balanceado (que possuem a presença do gene balanceador TM3, Sb1) foram descartados uma vez que não possuem o gene em estudo.



Figura 3. Machos e fêmeas das linhagens mutantes de *D. melanogaster* *Multiple Wing Hair* (mwh/mhw) e wts/TM3.

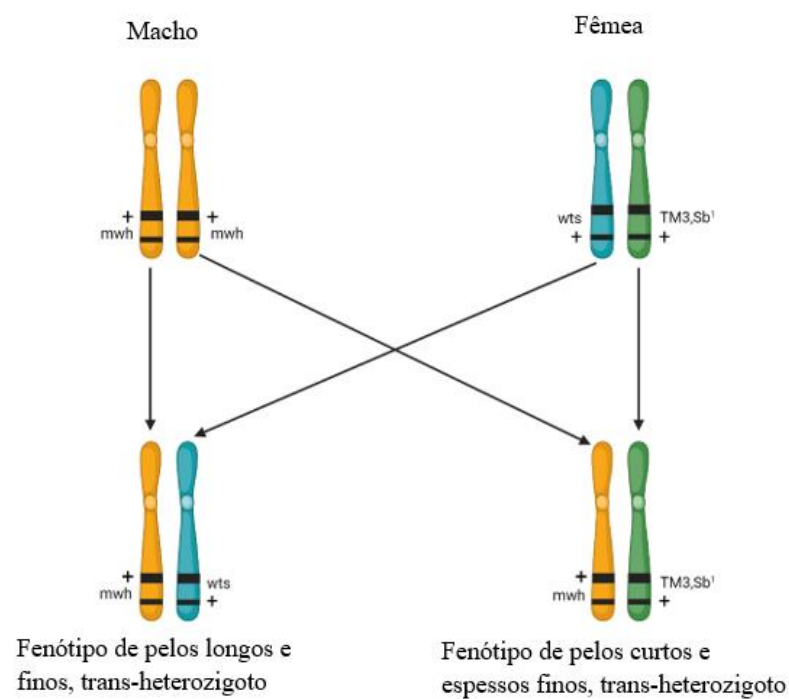


Figura 4. Diagrama didático do cruzamento de linhagem entre machos do mwh/mhw e fêmeas virgens do wts/Sb1. O cromossomo 3 é representado contendo os genótipos mwh/mhw e wts/Sb1. + indica o alelo do tipo selvagem.

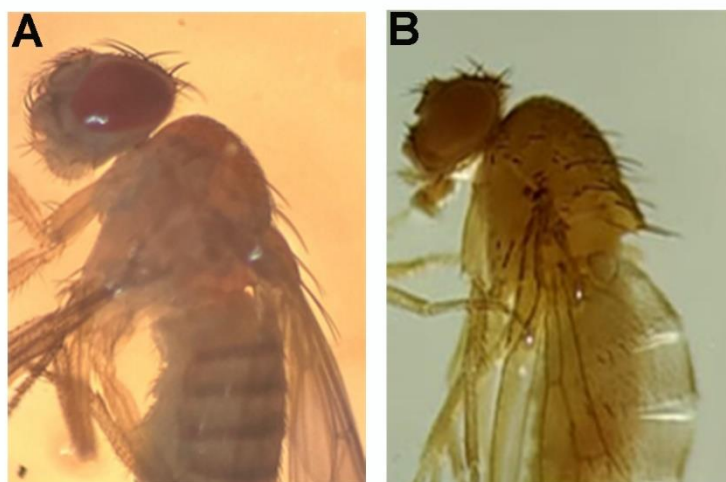


Figura 5. Diagrama didático do cruzamento de linhagem entre machos do mwh/mhw e fêmeas virgens do wts/Sb1. O cromossomo 3 é representado contendo os genótipos mwh/mhw e wts/Sb1. + indica o alelo do tipo selvagem.

Após o processo de metamorfose, as moscas adultas foram coletadas e conservadas em frascos contendo etanol 70 %. Analisou-se 200 indivíduos (machos e fêmeas) de cada concentração, com genótipo (wts+), que possuem pelos normais (longos). As moscas de pelos curtos (*Stubble*) não foram analisadas, pois não possuem o gene *wts*. Os indivíduos foram analisados em placa escavada contendo glicerina (Glicerol $C_3H_8O_3$) com auxílio de pincéis nº 1 e lupa estereoscópica. Contabilizou-se a presença de tumores em cada um dos seguimentos (olhos, cabeça, asas, corpo, pernas, halteres), que se manifestam na cutícula da mosca em forma de verrugas. Ao final fez o somatório de todos os tumores por indivíduo (SIDOROV et al., 2001; VASCONCELOS *et al.*, 2017b).

4.4 EXPERIMENTO 2

4.4.1 Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 40 camundongos machos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss com peso médio de 40 g. Os animais foram submetidos a um período de adaptação de 7 dias, acondicionados em mini-isoladores (Rack ventilada Alesco®) forrados com maravalha de *Pinus Sp.* Os animais foram alimentados com ração comercial padrão (Nuvital®) e água filtrada sob sistema de livre acesso. A iluminação foi controlada por fotoperíodo (12 h claro/ 12 h escuro) e a temperatura mantida em $22 \pm 2^\circ C$ e umidade de 55 ± 10 .

A pesquisa foi realizada de acordo com os protocolos da Declaração Universal dos Direitos Animais e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) sob o parecer número 965/2018.

Os animais foram distribuídos em 8 grupos experimentais (n = 5) conforme ilustrado em figura 6 e descrito abaixo:

- Grupo Controle Negativo (CN) – os animais foram tratados com 0,1mL/10g de peso corpóreo (p.c.) do veículo do EEGc (Tween 80 – 1 %) por via oral (v.o.) e 0,1 mL/10g p.c. do veículo da ciclofosfamida (água destilada) por via intraperitoneal (i.p.);
- Grupo Controle Positivo (Ciclofosfamida) – os animais foram tratados com 0,1 mL/10g p.c., v.o.) do veículo do EEGc (Tween 80 – 1 %) e 100 mg/kg de Ciclofosfamida (p.c., i.p.);
- Grupos Genotoxicidade EEGc100, EEGc1000 e EEGc 2000 – os animais foram tratados com 100, 1.000 e 2.000 mg/kg (p.c.; v.o.) do EEGc, respectivamente + 0,1 mL/10 g (p.c.. i.p.) do veículo da ciclofosfamida (água destilada);
- Grupos Antigenotoxicidade EEGc100+Ciclo, EEGc1000+Ciclo e EEGc2000+Ciclo – os animais foram tratados com 100, 1.000 e 2.000 mg/Kg (p.c.; v.o.) do EEGc, respectivamente + 100 mg/kg de Ciclofosfamida (p.c., i.p.).

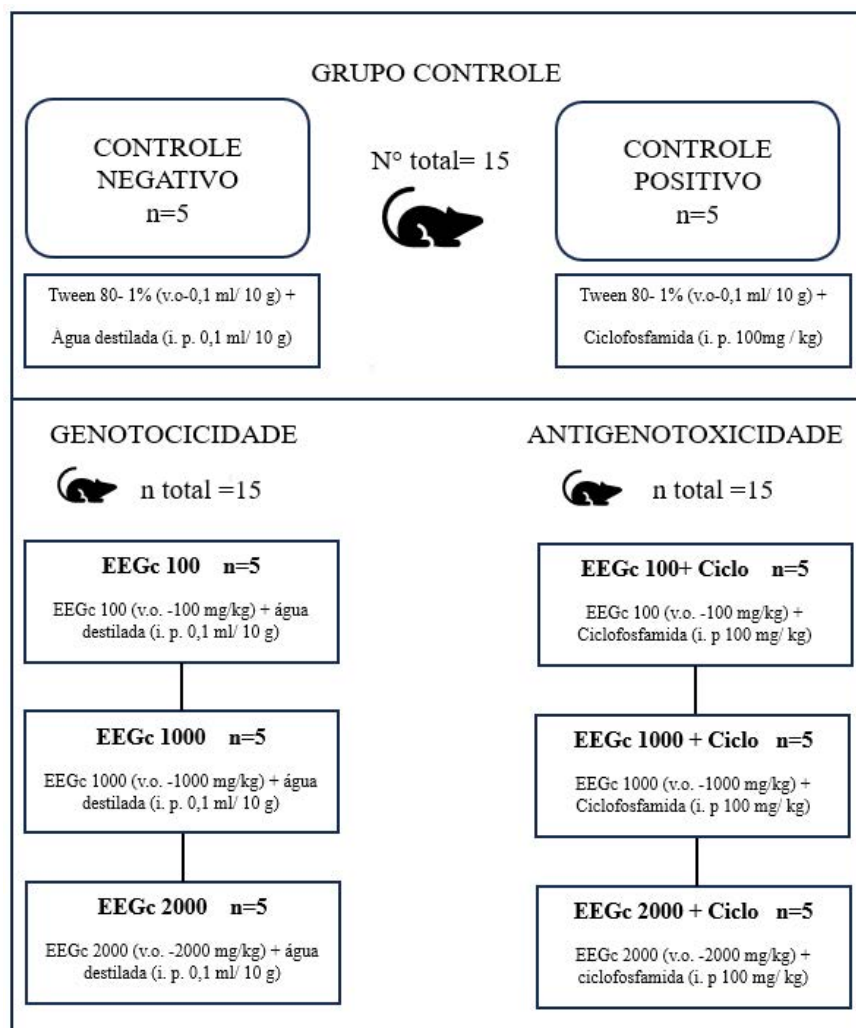


Figura 6 – Delineamento camundongos, Grupo Controle Negativo (CN) – 0,1mL/10 g de peso corpóreo (p.c.) do veículo da EEGc (Tween 80 – 1%) por via oral (v.o.) e 0,1mL/10 g p.c. do veículo da ciclofosfamida (água destilada) por via intraperitoneal (i.p.); Grupo Controle Positivo (Ciclo) – 0,1 mL/10 g de Tween 80 (1%) (p.c., v.o.) e 100 mg/Kg de Ciclofosfamida (p.c., i.p.); Grupos Genotoxicidade EEGc100, EEGc1.000 e EEGc2.000 – 100, 1000 e 2000 mg/kg (p.c.; v.o.) do EEGc, respectivamente + 0,1 mL/10 g de água destilada (p.c., i.p.); Grupos Antigenotoxicidade EEGc100+Ciclo, EEGc1000+Ciclo e EEGc2000+Ciclo – 100, 1.000 e 2.000 mg/kg (p.c.; v.o.) do EEGc, respectivamente + 100mg/kg de Ciclofosfamida (p.c., i.p.).

4.4.2 Ensaios biológicos

Foram coletadas amostras de sangue periférico, por meio de punção da veia caudal, 24, 48 e 72 horas após administração dos compostos-testes. No tempo de 24 h o sangue periférico foi analisado pelo ensaio do cometa. Já em 24, 48 e 72 h o sangue periférico foi analisado pela técnica de micronúcleo. Após essas coletas, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical seguida de laparotomia para a coleta, pesagem e análise macroscópica dos órgãos (coração, pulmão, baço, fígado e rins). O baço foi destinado para avaliação da fagocitose esplênica após pesagem. Os parâmetros biométricos foram compostos pelo peso inicial, peso final e peso absoluto e relativo dos órgãos.

4.4.2.1 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado segundo Singh *et al.* (1988) e avaliado conforme Kobayashi (1995). Vinte microlitros de sangue periférico (20 µL) foram homogeneizados em 120 µL de agarose de LPM (0,5 %). Em seguida a mistura foi depositada em lâminas pré-cobertas com agarose comum (5 %). As lâminas foram recobertas por lamínula de vidro e resfriadas a 4° C por 20 minutos. Em seguida, após remoção das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise (89,0 mL de estoque de lise – 2,5 M NaCl, 100,0 mM EDTA, 10,0 mM Tris, pH 10,0 corrigido com NaOH sólido; 1,0 mL de Triton X-100 e 10,0 mL de DMSO). A lise ocorreu por 1 hora, à temperatura de 4° C em local

escuro. Em seguida, as lâminas foram dispostas na cuba de eletroforese e imersas em tampão com pH >13,0 (300,0 mM NaOH e 1,0 mM EDTA) e a desnaturação do DNA ocorreu por um período de 20 minutos à 4°C sob o abrigo da luz. Em seguida, foi realizada a eletroforese à 25,0 V e 300,0 mA (1,25 v/cm) por 20 min. As lâminas foram neutralizadas com tampão em pH de 7,5 (0,4M Tris-HCl) por 3 ciclos de 5 minutos cada, e deixadas para secar ao ar livre. Em seguida, as lâminas foram fixadas com álcool etílico absoluto por 10 minutos. Após foram coradas com 100,0 µL de brometo de etídio (20x10⁻³mg/mL). As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência (Bioval®) em aumento de 40 x, com filtro de excitação 420-490 nm e filtro de barreira 520 nm. Foram analisadas 200 células/animal e classificadas em: classe 0 – nucleóides não danificados e que não apresentam cauda; classe 1 – nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; classe 2 – nucleóides com cauda de tamanho ente 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide; classe 3 – nucleóides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleóide (Kobayashi, 1995). Nucleóides de células apoptóticas, que se apresentam totalmente fragmentados geralmente não são contabilizados (SPEIT *et al.*, 1996).

4.4.2.1 Ensaio do micronúcleo em sangue periférico

Amostras de 20 µl de sangue periférico foram depositadas em lâmina previamente preparada com 20 µl de Alaranjado de Acridina (1,0 mg/mL) e recoberta com lamínula. As lâminas foram estocadas em freezer -20°C por pelos menos 15 dias. Foram analisadas 2000 células/animal em microscópio de epifluorescência (Motic®; Modelo BA 410), com filtro de excitação 420-490 nm e filtro de barreira 520 nm, em aumento de 400 vezes, conforme descrito Hayashi *et al.* (1990), modificado por Oliveira *et al.* (2009).

4.4.1.3 Avaliação de fagocitose esplênica

O teste de fagocitose esplênica foi realizado por meio da maceração de 1/3 do baço em solução fisiológica com auxílio de pipeta de *Pasteur*. Após sucessivas aspirações, cem microlitros da suspensão celular foram colocados em lâmina previamente corada com alaranja de acridina (1 mg/mL). Na sequência a lâmina foi coberta por uma lamínula e armazenada em freezer, por pelo menos 15 dias, até posterior análise em microscópio de fluorescência com filtro de excitação 420-490 nm e filtro de barreira 520 nm, e aumento de 400 x. Foram analisadas 200 células/animal. A avaliação da presença

ou ausência de fagocitose foi realizada de acordo com estabelecido por Hayashi *et al.* (1992) e modificado por Carvalho *et al.* (2015).

4.5. CÁLCULO DA PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DE DANOS (RD%)

As porcentagens de redução de danos para os ensaios do cometa e do micronúcleo foram contabilizadas de acordo com Manoharan & Beneriee (1985) e Waters *et al.* (1990).

$$DR\% = \left[\frac{\text{Média do controle positivo} - \text{Média do grupo associado}}{\text{Média do controle positivo} - \text{Média do controle negativo}} \right] \times 100$$

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (ETT) em *D. melanogaster* utilizou-se o teste U, não paramétrico, de Mann–Whitney. Nos ensaios com camundongos, os dados paramétricos, foram analisados por ANOVA/Tukey. Os dados foram apresentados em média $\pm$ desvio padrão e o nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO I – SOBREVIVÊNCIA, ESTIMATIVA DOS DANOS EM CÉLULAS SOMÁTICAS E DA FREQUÊNCIA DE TUMORES (ETT) EM *DROSOPHILA MELANOGASTER*

O teste de sobrevivência demonstrou que somente a maior concentração de EEGc (7,70 mg/mL) reduziu ($p < 0,05$) a taxa de sobrevivência das larvas de *D. melanogaster*. No entanto, todas as concentrações testadas apresentaram sobrevivência superior à 70% (Figura 7) e, portanto, foram mantidas para o teste subsequente.

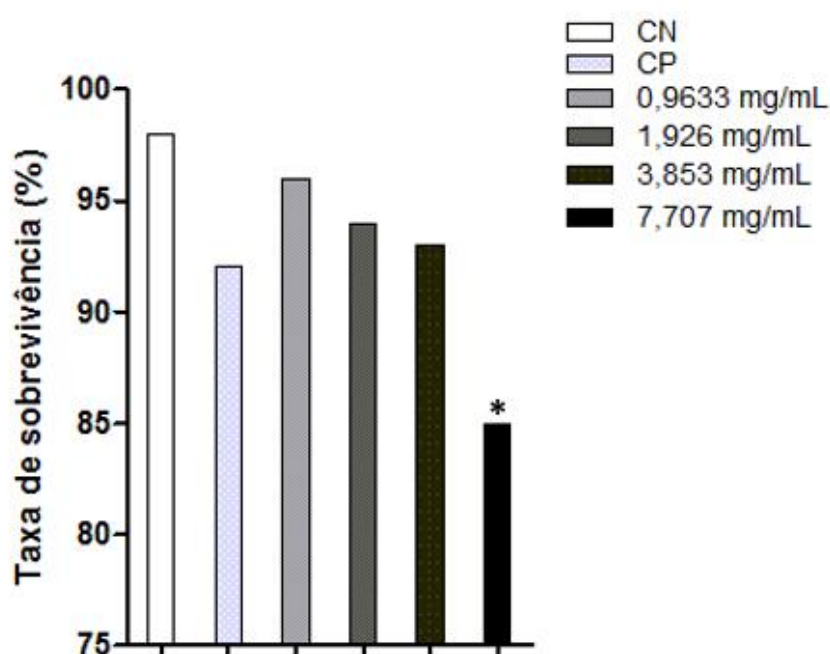


Figura 7 – Taxa de sobrevivência das larvas tratadas com o extrato etanólico de *Gomphrena celosioides* (EEGc) nas concentrações de 0,96, 1,92, 3,85 e 7,70 mg/mL. Para controle negativo utilizou-se Tween 80 (1%) e para o controle positivo doxorrubicina (2,17 mg/mL). (* $p < 0,05$)

O teste do ETT demonstrou que a Doxorrubicina aumentou ($p < 0,05$) a frequência de clones de tumores em 19,14 x comprovando o seu efeito carcinogênico. Já o EEGc não apresentou efeito carcinogênico ($p > 0,05$). Inclusive a menor concentração testada (0,96 mg/mL) reduziu ($p < 0,05$) a frequência basal de tumores observados no controle negativo (Tabela 1).

Tabela 1 - Frequência de clones de tumor observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wt*s, tratadas com diferentes concentrações do extrato etanólico de *Gomphrena celosioides* (EEGc):

Tratamento EEGc	Total de moscas	Número de tumores						Total	Frequência
		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter		
Controle Negativo	200	0	0	6	5	3	0	14	0,07
CP	200	0	3	186	21	58	1	269	1,34*
0,96	200	0	0	6	0	0	0	6	0,03*
1,92	200	0	0	7	2	4	0	13	0,06
3,85	200	0	3	5	5	3	0	16	0,08
7,70	200	0	3	8	6	5	0	22	0,11

Legenda: EEGc – Extrato etanólico de *Gomphrena celosioides*. CN – Controle negativo – Tween 80 (1%); Controle Positivo – Doxorrubicina (2,17mg/mL). Frequência – Número de tumores / número de moscas analisadas. *Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo. Teste estatístico: Mann Whitney ($p < 0,05$).

5.2 EXPERIMENTO II – AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E ANTIGENOTÓXICA EM CAMUNDONGOS

A avaliação dos parâmetros biométricos demonstrou que o peso inicial, peso final e peso relativo e absoluto do coração, pulmão, fígado, rins e baço foram semelhantes ($p > 0,05$) entre os diferentes grupos experimentais (Figura 6).

Avaliação dos danos genômicos, por meio do ensaio do cometa, demonstrou que a ciclofosfamida foi genotóxica e aumentou ($p < 0,05$) a frequência de danos no DNA em 12,04 x. O EEGc isolado não foi genotóxico ($p > 0,05$) nas duas menores doses. No entanto, a maior dose (EEGc2000) foi genotóxica e aumentou ($p < 0,05$) a frequência de lesões genômicas em 5,37 x. O EEGc quanto associado à ciclofosfamida foi antigenotóxico ($p < 0,05$) para todas as doses testadas e as porcentagens de redução de danos foram de 63,23, 49,91 e 33,39 % para as doses de 100, 1000 e 2000 mg/kg, respectivamente (Tabela 2).

A avaliação dos danos cromossômicos, por meio do ensaio do micronúcleo, demonstrou que a ciclofosfamida é genotóxica e aumentou ($p < 0,05$) a frequência de danos cromossômicos em 3,59 x, 3,13 x e 2,87 x nos tempos de 24, 48 h e 72 h. O EEGc isolado não foi genotóxico ($p > 0,05$) em nenhuma das doses e em nenhum dos tempos analisados. No entanto, as três doses foram antigenotóxicas ($p < 0,05$) nos tempos de 24 e 48h. As porcentagens de redução de danos foram de 64,42, 77,19 e 52,63% em 24h e de 71,43, 63,26 e 40,82 % para 48h nas doses de 100, 1000 e 2000 mg/kg, respectivamente. No tempo de 72h o EEGc não foi antigenotóxico ($p > 0,05$) e as porcentagens de redução de danos foram de 20,00, 36,67 e 63,33 % para as doses de 100, 1000 e 2000 mg/kg, respectivamente (Tabela 3).

O ensaio de fagocitose esplênica demonstrou que nenhum dos tratamentos (ciclofosfamida isolada, EEGc isolado e EEGc associado à ciclofosfamida) induziu ativação fagocítica ($p > 0,05$) (Figura 9).

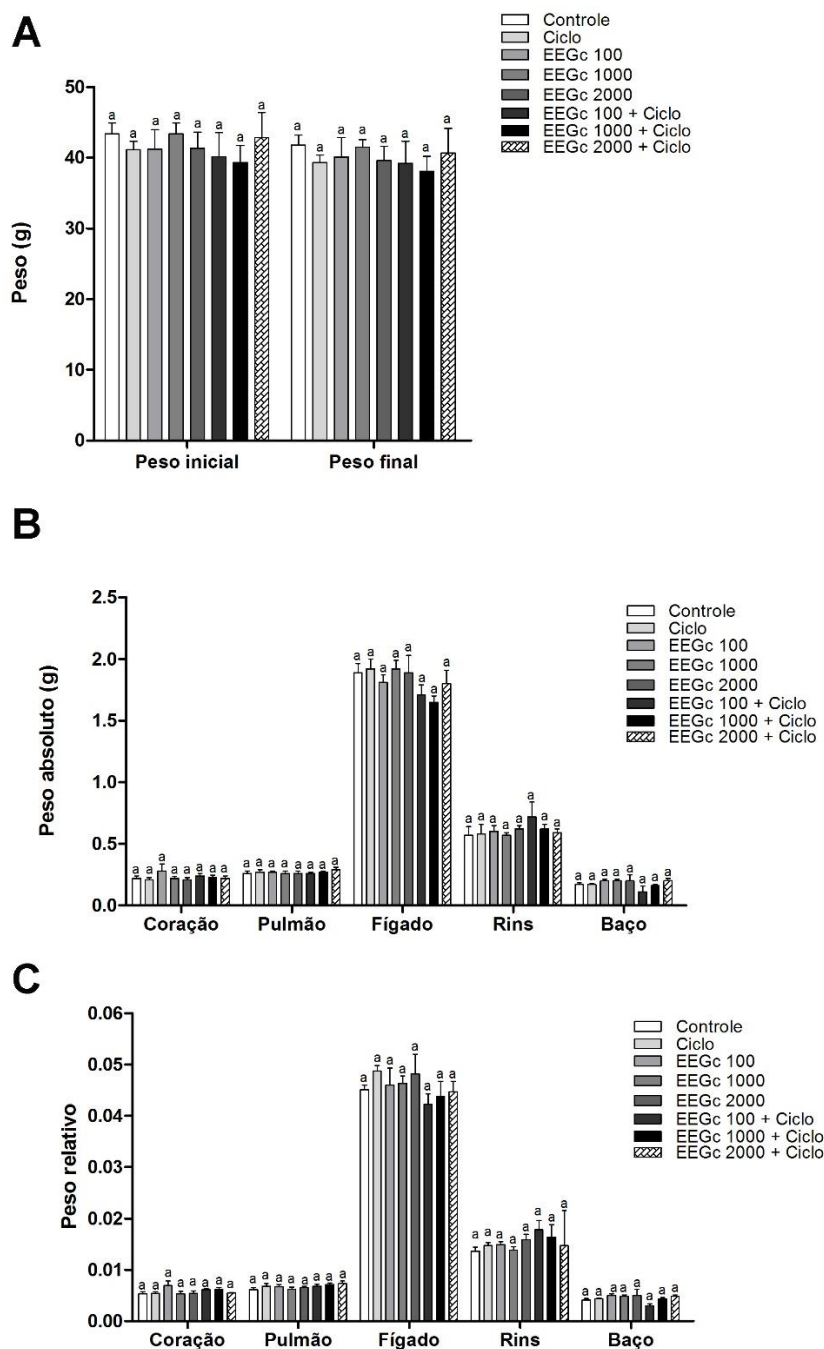


Figura 8 – Valores médios $\pm$ desvio padrão dos parâmetros biométricos dos animais tratados com extrato etanólico de *Gomphrena celosioides* (EEGc) isolado ou em associação com a ciclofosfamida. A – Peso inicial e peso final; B – Peso absoluto dos órgãos; C – Peso relativo dos órgãos. Grupo Controle Negativo (CN) – 0,1 mL/10 g de peso corpóreo (p.c.) do veículo da EEGc (Tween 80 – 1 %) por via oral (v.o.) e 0,1 mL/10 g p.c. do veículo da ciclofosfamida (água destilada) por via intraperitoneal (i.p.); Grupo Controle Positivo (Ciclo) – 0,1 mL/10 g de Tween 80 (1%) (p.c., v.o.) e 100 mg/Kg de Ciclofosfamida (p.c., i.p.); Grupos Genotoxicidade EEGc100, EEGc1.000 e EEGc2.000 – 100, 1000 e 2000 mg/Kg (p.c.; v.o.) do EEGc, respectivamente + 0,1 mL/10g de água destilada (p.c., i.p.); Grupos Antigenotoxicidade EEGc100+Ciclo, EEGc1000+Ciclo e EEGc2000+Ciclo – 100, 1.000 e 2.000 mg/Kg (p.c.; v.o.) do EEGc, respectivamente + 100 mg/Kg de Ciclofosfamida (p.c., i.p.). Teste estatístico: ANOVA/Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvio padrão da frequência de células com danos no DNA, distribuição das células pelas classes de danos, score e porcentagem de redução de danos no DNA de animais tratados com o extrato etanólico de *Gomphrena celosioides* (EEGc) isolado ou associado com ciclofosfamida:

Grupos Experimentais	Células com dano no DNA	Classes				Score	%RD
		0	1	2	3		
CN	10,20 $\pm$ 2,03 ^a	189,80 $\pm$ 2,03	10,20 $\pm$ 2,03	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	10,20 $\pm$ 2,03 ^a	
Ciclo	122,80 $\pm$ 8,31 ^d	76,20 $\pm$ 9,24	112,80 $\pm$ 8,01	10 $\pm$ 1,58	0,00 $\pm$ 0,00	132,80 $\pm$ 8,88 ^d	
Genotoxicidade							
EEGc 100	35,80 $\pm$ 3,63 ^{a,b}	164,20 $\pm$ 3,62	35,80 $\pm$ 3,62	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	35,80 $\pm$ 3,62 ^{a,b}	
EEGc 1000	39,60 $\pm$ 5,84 ^{a,b}	160,40 $\pm$ 5,84	39,60 $\pm$ 5,84	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	39,60 $\pm$ 5,84 ^{a,b}	
EEGc 2000	54,80 $\pm$ 6,96 ^{b,c}	145,20 $\pm$ 6,96	54,80 $\pm$ 6,96	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	54,80 $\pm$ 6,96 ^{b,c}	
Antigenotoxicidade							
EEGc 100 + Ciclo	51,60 $\pm$ 12,63 ^{b,c}	148,80 $\pm$ 12,41	50,80 $\pm$ 12,18	0,40 $\pm$ 0,24	0,00 $\pm$ 0,00	51,60 $\pm$ 12,63 ^{b,c}	63.23%
EEGc 1000 + Ciclo	66,60 $\pm$ 9,82 ^{b,c}	133,40 $\pm$ 9,82	66,60 $\pm$ 9,82	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	66,60 $\pm$ 9,82 ^{b,c}	49.91%
EEGc 2000 + Ciclo	85,20 $\pm$ 3,37 ^c	112,80 $\pm$ 4,49	84,60 $\pm$ 2,98	0,60 $\pm$ 0,40	0,00 $\pm$ 0,00	85,80 $\pm$ 3,76 ^c	33.39%

Legenda: Grupo Controle Negativo (CN) – 0,1mL/10g de peso corpóreo (p.c.) do veículo da EEGc (Tween 80 – 1%) por via oral (v.o.) e 0,1mL/10g p.c. do veículo da ciclofosfamida (água destilada) por via intraperitoneal (i.p.); Grupo Controle Positivo (Ciclo) – 0,1mL/10g de Tween 80 (1%) (p.c., v.o.) e 100mg/Kg de Ciclofosfamida (p.c., i.p.); Grupos Genotoxicidade EEGc100, EEGc1.000 e EEGc2.000 – 100, 1000 e 2000 mg/Kg (p.c.; v.o.) do EEGc, respectivamente + 0,1mL/10g de água destilada (p.c., i.p.); Grupos Antigenotoxicidade EEGc100+Ciclo, EEGc1000+Ciclo e EEGc2000+Ciclo – 100, 1.000 e 2.000 mg/Kg (p.c.; v.o.) do EEGc, respectivamente + 100mg/Kg de Ciclofosfamida (p.c., i.p.). Teste estatístico: ANOVA/Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). %RD – Porcentagem de Redução de Danos no DNA. Teste estatístico: ANOVA/Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 3. Valores médios $\pm$ desvio padrão da frequência de micronúcleos e porcentagem de redução de danos no DNA de animais tratados com o extrato etanólico de *Gomphrena celosioides* (EEGc) isolado ou associado com ciclofosfamida:

Grupos Experimentais	Frequência de Micronúcleos			%RD		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
CN	4,40 $\pm$ 0,75 ^{a,b}	4,60 $\pm$ 1,03 ^{a,b}	3,20 $\pm$ 0,37 ^{a,b}			
Ciclo	15,80 $\pm$ 0,66 ^d	14,40 $\pm$ 0,93 ^d	9,20 $\pm$ 1,16 ^c			
Genotoxicidade						
EEGc 100	2,80 $\pm$ 0,66 ^a	6,40 $\pm$ 0,81 ^{a,b,c}	2,80 $\pm$ 0,37 ^a			
EEGc 1000	4,80 $\pm$ 0,92 ^{a,b}	4,00 $\pm$ 1,30 ^{a,b}	4,40 $\pm$ 0,75 ^{a,b,c}			
EEGc 2000	4,40 $\pm$ 1,03 ^{a,b}	3,60 $\pm$ 0,81 ^a	7,20 $\pm$ 1,32 ^{a,b,c}			
Antigenotoxicidade						
EEGc 100 + Ciclo	8,00 $\pm$ 0,89 ^{b,c}	7,40 $\pm$ 0,93 ^{a,b,c}	8,00 $\pm$ 2,07 ^{b,c}	68,42%	71,43%	20,00%
EEGc 1000 + Ciclo	7,00 $\pm$ 1,67 ^{a,b,c}	8,20 $\pm$ 1,07 ^{b,c}	7,00 $\pm$ 0,84 ^{a,b,c}	77,19%	63,26%	36,67%
EEGc 2000 + Ciclo	9,80 $\pm$ 0,86 ^c	10,40 $\pm$ 1,03 ^{c,d}	5,40 $\pm$ 0,51 ^{a,b,c}	52,63%	40,82%	63,33%

Legenda: Grupo Controle Negativo (CN) – 0,1mL/10 g de peso corpóreo (p.c.) do veículo da EEGc (Tween 80 – 1%) por via oral (v.o.) e 0,1mL/10g p.c. do veículo da ciclofosfamida (água destilada) por via intraperitoneal (i.p.); Grupo Controle Positivo (Ciclo) – 0,1mL/10 g de Tween 80 (1 %) (p.c., v.o.) e 100 mg/Kg de Ciclofosfamida (p.c., i.p.); Grupos Genotoxicidade EEGc100, EEGc1.000 e EEGc2.000 – 100, 1000 e 2000 mg/Kg (p.c.; v.o.) do EEGc, respectivamente + 0,1mL/10g de água destilada (p.c.. i.p.); Grupos Antigenotoxicidade EEGc100+Ciclo, EEGc1000+Ciclo e EEGc2000+Ciclo – 100, 1.000 e 2.000 mg/Kg (p.c.; v.o.) do EEGc, respectivamente + 100 mg/Kg de Ciclofosfamida (p.c., i.p.). Teste estatístico: ANOVA/Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). %RD – Porcentagem de Redução de Danos no DNA. Teste estatístico: ANOVA/Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

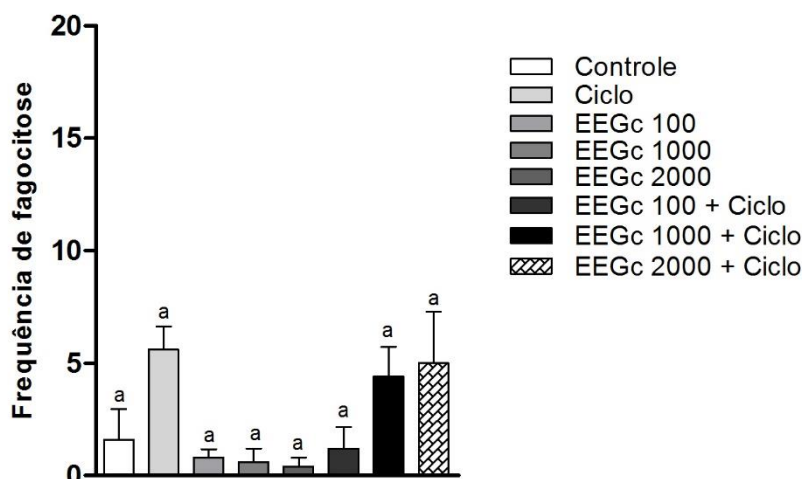


Figura 9 – Valores médios $\pm$ desvio padrão da frequência de células com fagocitose no baço dos animais tratados com extrato etanólico de *Gomphrena celosioides* (EEGc) isolado ou em associação com a ciclofosfamida. Grupo Controle Negativo (CN) – 0,1 mL/10 g de peso corpóreo (p.c.) do veículo da EEGc (Tween 80 – 1 %) por via oral (v.o.) e 0,1 mL/10 g p.c. do veículo da ciclofosfamida (água destilada) por via intraperitoneal (i.p.); Grupo Controle Positivo (Ciclo) – 0,1 mL/10 g de Tween 80 (1 %) (p.c., v.o.) e 100 mg/Kg de Ciclofosfamida (p.c., i.p.); Grupos Genotoxicidade EEGc100, EEGc1.000 e EEGc2.000 – 100, 1000 e 2000 mg/Kg (p.c.; v.o.) do EEGc, respectivamente + 0,1 mL/10 g de água destilada (p.c., i.p.); Grupos Antigenotoxicidade EEGc100+Ciclo, EEGc1000+Ciclo e EEGc2000+Ciclo – 100, 1.000 e 2.000 mg/Kg (p.c.; v.o.) do EEGc, respectivamente + 100 mg/Kg de Ciclofosfamida (p.c., i.p.). Teste estatístico: ANOVA/Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Teste estatístico: ANOVA/Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Esse estudo é pioneiro em demonstrar que o EEGc não é carcinogênico em *D. melanogaster* e tem efeito quimiopreventivo em danos do DNA induzidos por ciclofosfamida em camundongos Swiss. Além disso, *G. celosioides* já foi descrita com baixo efeito antitumoral *in vitro*. O extrato etanólico de *G. celosioides* (EEGc) apresentou IC₅₀ acima de 1000 µg/mL em células das linhagens KKU-100 (JCRB 1568) e KKU-213 (JCRB 1557) (PROMRAKSA *et al.*, 2019) e superior a 250 µg/mL para os extratos etanólico e aquoso em células HepG2 (CHASSAGNE *et al.*, 2017). Além disso, a literatura descreveu que o EEGc não foi genotóxico em camundongos Swiss fêmeas prenhes (SALUSTRIANO *et al.*, 2022).

O presente estudo demonstrou que o EEGc tem potencial para reduzir significativamente a sobrevivência de larvas de *D. melanogaster* em concentração igual ou superior a 7,70 mg/mL. No entanto, todas as doses avaliadas no teste de sobrevivência foram utilizadas para o teste ETT porque a sobrevivência das larvas foi superior a 70 %

e isso indicou que as concentrações testadas não afetaram o desenvolvimento larval a ponto de comprometer o desenvolvimento de testes subsequentes. A literatura descreve que a sobrevivência de pelo menos 70 % das larvas é o ideal para a escolha de doses que podem ser usadas no teste ETT. Logo, taxa de mortalidade acima de 30 % podem comprometer os testes subsequentes por não se atingir o número mínimo necessário de indivíduos adultos para as análises (DEMIR *et al.*, 2013; ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2015).

No teste ETT observou-se que a menor concentração do EEGc (0,96 mg/mL) foi capaz de reduzir significativamente a frequência basal de tumores epiteliais em *D. melanogaster*. Esse efeito sugere que o extrato possa ter potencial antitumoral. No entanto, possivelmente o seu efeito não seria no tratamento de cânceres visto que o efeito quimioterápico, simulado em testes em cultura de células, já refutou essa hipótese (CHASSAGNE *et al.*, 2017; PROMRAKSA *et al.*, 2019). Assim, infere-se que o seu efeito possa correlacionar-se à prevenção de lesões de DNA que podem predispor o indivíduo ao desenvolvimento do câncer e, por consequência, apresentaria também um efeito na redução da ocorrência dessa doença.

O câncer pode ser produto de mutações sequenciais, geralmente relacionadas à perda de função dos genes supressores tumorais e/ou à ativação de proto-oncogenes (ENOMOTO *et al.*, 2018). No caso do teste do ETT o marcador *wts* corresponde a um supressor tumoral que é letal em homozigose e, portanto, ele é mantido em heterozigose nos indivíduos por meio do gene balanceador TM3, Sb1 (OLIVEIRA *et al.*, 2017; VASCONCELOS *et al.*, 2017b; SILVA; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2020). No entanto, a perda da heterozigose no gene *wts* em células dos discos imaginais de leva à formação de clones celulares com aspecto de verrugas em todo o corpo da *D. melanogaster*. Essas verrugas são os tumores epiteliais (JUSTICE *et al.*, 1995).

O gene *wts* tem um gene homólogo em humanos que é o LATS1. Esse gene codifica uma serina/treonina quinase que funciona no aparato mitótico e, portanto, está envolvido no controle do ciclo celular que quando desregulado favorece o desenvolvimento do câncer (YU; BACHMAN; LAI, 2015).

Destaca-se ainda que as outras concentrações do EEGc (1,92 e 3,85 mg/mL), inclusive a concentração que reduziu significativamente a sobrevivência larval (7,70 mg/mL) não possuem efeito carcinogênico no modelo alternativo ETT em *D. melanogaster*. Esse resultado permite inferir segurança de uso visto que existe correspondência entre os resultados obtidos nos modelos em *D. melanogaster* e aqueles

obtidos em mamíferos (EEKEN *et al.*, 2002; NEPOMUCENO, 2015). A correspondência pode ser atribuída devido à conservação evolutiva de genes supressores de tumor entre *D. melanogaster* e mamíferos (EEKEN *et al.*, 2002). Além disso, mais de 50 genes foram mapeados e caracterizados como genes supressores de tumor em *D. melanogaster*. Oito deles tem função no desenvolvimento embrionário da mosca, 12 no desenvolvimento do cérebro, 19 são expressos nas células dos discos imaginais, 25 no desenvolvimento hematopoiético e 10 nas gônadas adultas (JUSTICE *et al.*, 1995) e dentre esses genes destaca-se o *wts* (NISHIYAMA, 1999). Destaca-se ainda que as *D. melanogaster* possuem sistema enzimático semelhante ao dos mamíferos (GRAF; VAN SCHAIK, 1992)

Esses fatos impulsionaram para que o estudo fosse continuado. Mas não mais no modelo alternativo de *D. melanogaster* e sim em um modelo animal que se assemelha mais aos humanos e o modelo escolhido foram os camundongos Swiss.

Os resultados com os camundongos sugerem que o EEGc não é tóxico visto que não foram observados sinais clínicos clássicos de intoxicação tais como diarreia, tremores, salivação excessiva, convulsões, hipoatividade, ataxia, letargia, curvatura da cauda, eriçamento de pelos, opacidade dos olhos e de mucosas, e/ou redução do consumo de alimentos e água dentre outros (OECD 425, 2008; CORSO *et al.*, 2019; NUNES *et al.*, 2023; REZENDE *et al.*, 2023; CORREA *et al.*, 2024). Confirmam esse fato a ausência de variações significativa dos pesos no início e no final do experimento. Já que a redução do peso é compreendida como um importante indicativo de toxicidade (SALUSTRIANO *et al.*, 2022; NEVES *et al.*, 2023; NUNES *et al.*, 2023; OLIVEIRA *et al.*, 2023; ORTIZ *et al.*, 2023; REZENDE *et al.*, 2023; CORREA *et al.*, 2024; NEVES *et al.*, 2024) bem como variações nos pesos absolutos e relativos dos órgãos (OLIVEIRA *et al.*, 2018a; OLIVEIRA *et al.*, 2018b). Além disso, destaca-se que a literatura já informou que a toxicidade aguda para o EEGc é superior a 2000 mg/kg em ratos Wistar para os dois sexos (machos e fêmeas) (MACORINI *et al.*, 2022). Inclusive esse estudo utilizou o mesmo extrato utilizado em por nós. Destaca-se ainda que esse extrato foi classificado na Categoria 5, de acordo com o Globally Harmonized System, que é a menos tóxica ou não tóxica (OECD 425, 2008; MACORINI *et al.*, 2022). Já em relação ao extrato aquoso de *G. celosioides* verificou que a toxicidade aguda é superior a 4000 mg/kg (SOULEYMAN; DJAMAN-ALLICO, 2014). Em relação à toxicidade subaguda a literatura afirma que as doses 75, 150 e 300 mg/kg, administradas repetidas vezes ao longo de 28 dias, tem baixo

potencial toxicológico em camundongos Swiss machos e fêmeas (MACORINI *et al.*, 2022). Esses resultados suportam os achados desse estudo.

Dados complementar à toxicidade aguda e subaguda, que podem corroborar a segurança de uso, são os estudos de genotoxicidade. Assim, esse estudo sugere, pioneiramente, que o EEGc pode causar lesões de DNA, em nível genômico (avaliadas pelo ensaio do cometa), em dose igual ou superior à 2000 mg/kg visto que essa dose causou um aumento de 5,37 x a frequência de danos observados no grupo controle. Destaca-se ainda que as menores doses apresentaram uma tendência de aumento da frequência de lesões de 3,51 x e 3,88 x para as doses de 100 e 1000 mg/kg, respectivamente. Esses resultados demonstram uma curva dose resposta, ou seja, com aumento da dose ocorreu aumento da frequência de lesões genômicas. Em um primeiro momento, este dado requer atenção. No entanto, ao se avaliar a frequência de lesão cromossômica verificou-se que o EEGc não foi genotóxico, ou seja, nenhuma das doses testadas aumentou a frequência de micronúcleos. Esses dados sugerem que os danos genômicos (avaliados pelo teste do cometa) não se fixaram no genoma celular na forma de danos cromossômicos (avaliados pelo teste do micronúcleo) indicando ausência de genotoxicidade. Esse fato foi corroborado pela ausência de fagocitose esplênica observada para todos os grupos experimentais.

Previamente, nosso grupo de pesquisa já havia relatado que esse EEGc não causava danos cromossômicos e não ativava a fagocitose esplênica em tratamentos com essas mesmas doses, em até 18 dias consecutivos, em fêmeas de camundongos Swiss prenhes (SALUSTRIANO *et al.*, 2022). Esses fatos reforçam a segurança de uso do EEGc já que esse extrato não apresentou toxicidade aguda e tem baixo potencial de toxicidade subaguda (MACORINI *et al.*, 2022), não apresentou genotoxicidade em fêmeas prenhes e não ativou fagocitose esplênica (SALUSTRIANO *et al.*, 2022) e os danos genômicos, observados nesse estudo, não foram fixados no genoma celular como indicado pelos nossos resultados do ensaio do micronúcleo.

Os danos genômicos podem ser reparados (FERNÁNDEZ-BERTÓLEZ *et al.*, 2022) e, portanto, podem não se fixar no genoma celular causando menos danos ao organismo (NAVARRO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2015; CORREA *et al.*, 2024). Supõe-se que esse fato, já relatado na literatura, tenha ocorrido também nesse estudo. Além disso, sabe-se que uma das principais funções do baço é promover a filtração do sangue retirando dele células lesionadas, incluindo aquelas com danos no DNA, micronucleadas, por exemplo; células senescentes; e inclusões intraeritrocitárias. Assim,

o estudo de Hayashi *et al.* (1990) serviu como base para estudos mais recentes que se valem dessa metodologia para medir a atividade fagocítica do baço em resposta à ação genotóxica ou antigenotóxica (NAVARRO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2015; BERNO *et al.*, 2016; SCHNEIDER *et al.*, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2017; ISHIKAWA *et al.*, 2017; NAVARRO *et al.*, 2018; ISHIKAWA *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2018a; OLIVEIRA *et al.*, 2018b; OLIVEIRA *et al.*, 2019; SALUSTRIANO *et al.*, 2022; NEVES *et al.*, 2023; OLIVEIRA *et al.*, 2023; REZENDE *et al.*, 2023; CORREIA *et al.*, 2024; NEVES *et al.*, 2024). Logo, como o baço está envolvido em processos de imunomodulação e a fagocitose é efetiva no sequestro de células anucleadas ou micronucleadas essa ação pode mascarar os efeitos genotóxicos de uma substância ou de um extrato. Assim, a junção de metodologias de genotoxicidade e fagocitose esplênica fortalecem as hipóteses testadas por fornecer dados mais robustos (CARVALHO *et al.*, 2105) e assim podemos inferir que o EEGc realmente não é genotóxico.

Um outro dado inédito desse estudo trata-se do efeito antigenotóxico do EEGc. Até o presente momento, a literatura consultada não havia a indicação do efeito quimiopreventivo desse extrato. O EEGc foi capaz de reduzir danos genômicos (avaliados pelo cometa) em até 63,23 % sendo a menor dose a mais efetiva (100 mg/kg). Também foram eficientes em prevenir os danos cromossômicos (avaliados pelo ensaio de micronúcleo) em até 77,19 % sendo a dose intermediária, na avaliação de 24 h, a mais eficiente. Para os dados de antigenotoxicidade não foi estabelecido o padrão de dose resposta.

O efeito antigenotóxico e/ou quimiopreventivo trata-se da capacidade que um produto possui de reduzir a frequência de danos no DNA. Esse efeito pode ser por desmutagênese quando, em resumo, um composto se liga a outro impedindo o efeito genotóxico/mutagênico por um processo de adsorção, por exemplo; ou por bioantimutagênese. Nesse outro caso, após um dano ocorrer o composto modula as enzimas do organismo na tentativa de favorecer a correção do dano genotóxico/mutagênico. Logo, as enzimas atuam como moduladoras do reparo e da replicação (KADA; SHIMOI, 1987; DE FLORA, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007; MANTOVANI *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009; FEDEL-MYASATO *et al.*, 2014a; FEDEL-MYASATO *et al.*, 2014b; DIAB; ABOUL-ELA, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2015).

O uso diário de compostos antigenotóxicos poderá ser uma boa estratégia de prevenção de câncer e ao uso diário dos compostos antigenotóxico dá-se o nome de

quimioprevenção (GOMES *et al.*, 1996; SURH *et al.*, 1996). A muito tempo a literatura registra uma associação inversamente proporcional entre o consumo de frutas e verduras e o desenvolvimento do câncer (FLAGG; COATES; GREENBERG, 1995; WEISBURGER, 1999; ZHANG *et al.*, 1999; WEISBURGER, 2000; FERRARI, 2001; FERRARI; TORRES, 2002) e esse fato fomenta a necessidade de se alimentar adequadamente usando produtos naturais e antígenotóxicos (AMARAL *et al.*, 2021).

A literatura clássica também registra que os principais inibidores naturais da carcinogênese/genotoxicidade são representados pelos antioxidantes que são bloqueadores de radicais livres e também pelos indutores de morte celular, inibidores enzimáticos, inibidores da angiogênese, antagonista de fatores de crescimento, hormônios e reparadores de lesão de DNA (KLEINER, 1997; KELLOF *et al.*, 1990).

Segundo Salvador *et al.* (2012) no gênero *Gomphrena* foram isolados esteróides, terpenóides, ecdisteróides, flavonóides, aurantiamida e protoalcalóides. Já segundo Vasconcelos *et al.* (2017a), as partes aéreas de *G. celosioides* são ricas em ácido málico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido vanílico, catecina, Irisona B, Dimetoxi-flavona e cafeoil-glicose. Assim, verifica-se a presença de ácidos fenólicos e flavonóides, no gênero e na espécie, e esses compostos químicos que podem atuar como antioxidantes.

Os antioxidantes, de maneira geral, agem na proteção contra formação das substâncias agressoras ao DNA e na interceptação de radicais livres (os quais uma vez formados iniciam suas atividades de danificação do DNA) (KONG; LILLEHEI, 1998; SANTOS; CRUZ, 2001). Assim, pode-se atribuir o efeito antígenotóxico e/ou quimiopreventivo do EEGc aos seus constituintes.

Frente ao exposto, considera-se que o EEGc é seguro para uso e tem baixo potencial genotóxico, visto que os danos genômicos não se fixaram na forma de danos cromossômicos no genoma celular. Além disso, o EEGc apresentou efeito quimiopreventivo o que sugere aplicabilidade terapêutica na prevenção de lesões de DNA que pode aumentar a predisposição ao câncer.

7 CONCLUSÃO

O uso popular de plantas medicinais, guarda grande riqueza de informações, com grande potencial medicinal. Estudos que procurem formalizar esse conhecimento, fazem parte da política para valorizar e preservar o conhecimento tradicional das comunidades e povos tradicionais.

O modelo experimental com *Drosófilas* apresenta grandes vantagens para avaliação inicial de substâncias de potencial uso terapêutico. Trata-se de um modelo simples, de baixo custo e com grandes possibilidades para estimativa do potencial genotóxicos ou quimioprotetivo.

No modelo com *D. melanogaster*, não apresentou propriedades carcinogênicas, sendo que na menor concentração testada, preveniu de forma estatisticamente significativa, a ocorrência basal de tumores epiteliais.

No experimento com camundongos *swiss*, a segurança do uso do EEGc ficou evidente, pois apresentou baixo potencial genotóxico, sem causar danos cromossômicos no genoma celular.

Além disso, o EEGc apresentou efeito quimiopreventivo o que sugere aplicabilidade terapêutica na prevenção de lesões de DNA que pode aumentar a predisposição ao câncer.

O EEGc apresenta grande potencial para uso medicinal, sendo necessários mais estudos para avaliar todo seu potencial e para estabelecer as doses terapêuticas em humanos.

8 REFERÊNCIAS

ANVISA—Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia Para a Condução de Estudos não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. Brasília; 2010. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/pesquisa-clinica/manuais-eguias/guia-para-a-conducao-de-estudos-naoclinicos-de-toxicologia-e-seguranca-farmacologica-necessarios-ao-desenvolvimento-de-medicamentos-versao-2.pdf/view> (accessed on 7 July 2019).

ALVAREZ-MOYA, C.; SILVA, M. R; ARÁMBULA, A. R. V.; SANDOVAL, A. I.; VASQUEZ, H. C.; MONTES, R. M. G. Evaluation of genetic damage induced by

glyphosate isopropylamine salt using *Tradescantia* bioassays. **Genetics and Molecular Biology**. v. 34, p. 127-130, 2011

AMARAL, L. A.; ALMEIDA, T. S. F.; SOUZA, G. H. O.; BARANOSKI, A.; MARIS, R. S.; BITTENCOURT JUNIOR, F. F.; RAFACHO, B. P. M.; MONREAL, A. C. M.; KASSUYA, C. A. L.; ANTONIOLLI-SILVA, A. C. M. B.; SANTOS, E. F.; OLIVEIRA, R. J. The Use of Natural Fiber-Rich Food Product Is Safe and Reduces Aberrant Crypt Foci in a Pre-Clinical Model. **Nutrients**. v. 13, n.8, p. 2708, 2021.

ARAÚJO, F. H. S. D.; FIGUEIREDO, D. R. D.; AUHAREK, S. A.; PESARINI, J. R.; MEZA, A.; GOMES, R. D. S.; MONREAL, A. C. D.; ANTONIOLLI-SILVA, A. C. M. B.; LIMA, D. P.; KASSUYA, C. A. L.; BEATRIZ, A.; OLIVEIRA, R. J. In vivo chemotherapeutic insight of a novel isocoumarin (3-hexyl-5, 7-dimethoxy-isochromen-1-one): Genotoxicity, cell death induction, leukometry and phagocytic evaluation. **Genetics and Molecular Biology**. v. 40, p. 665-675, 2017.

ARENAS, P.; AZORERO, R. Plants of common use in Paraguayan folk medicine for regulating fertility. **Economic Botany**. v. 31, n. 3, p. 298-300, 1977.

BERNO, C. R.; RÓS, B. T.; DA SILVEIRA, I. O. M. F.; COELHO, H. R.; ANTONIOLLI, A. C. M. B.; BEATRIZ, A.; LIMA, D. P.; MONREAL, A. C. D.; SOUSA, F. G.; GOMES, R. S.; OLIVEIRA, R. J. 4-Aminoantipyrine reduces toxic and genotoxic effects of doxorubicin, cisplatin, and cyclophosphamide in male mice. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**. v. 805, p. 19-24, 2016.

BOTHA, S.; VAN DER VIJVER, L. M. A pharmacochemic investigation of *Gomphrena celosioides* (Amaranthaceae). **Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Natuurwetenskap en Tegnologie**. v. 5, n. 1, p. 40-45, 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápico/Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. - Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. - (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápico /Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. - Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 136 p.: il. - (Série C. Projetos, Programas e Relatórios).

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos/Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica - Brasília: Ministério da Saúde, 2016.190 p.

BURKILL, H.M. The Useful Plants of West Tropical Africa, 2nd ed.; University Press of Virginia, Box 3608 University Station: Charlottesville, VA, USA, 1985; Volume 1, p. 22903.

CALIXTO, J. B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca. **Ciência hoje**. v. 21, n. 123, p. 26-30, 1996.

CARVALHO, P. C.; SANTOS, E. A.; SCHNEIDER, B. U. C.; MATUO, R.; PESARINI, J. R.; CUNHA-LAURA, A. L.; MONREAL, A. C. D.; LIMA, D. P.; ANTONIOLLI, A. C. B. M.; OLIVEIRA, R. J. Diaryl sulfide analogs of combretastatin A-4: Toxicogenetic, immunomodulatory and apoptotic evaluations and prospects for use as a new chemotherapeutic drug. **Environmental toxicology and pharmacology**. v. 40, n. 3, p. 715-721, 2015.

CHASSAGNE, F.; DEHARO, E.; PUNLEY, H.; BOURDY, G. Treatment and management of liver diseases by Khmer traditional healers practicing in Phnom Penh area, Cambodia. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 202, p. 38-53, 2017.

CORREA, W. A.; NEVES, S. C.; OLIVEIRA, R. J.; KASSUYA, C. A.; NAVARRO, S. D.; MARTINS, A. C. F.; SAROJA, B.; MITSUYASU, B.; SILVEIRA, I. O. M. F.; VITOR, N.; COELHO, H. R. S.; VILELA, M. L. B.; NASCIMENTO, V. A.; LIMA, D. P.; BEATRIZ, A.; GOMES, R. S. Chemotherapeutic Mechanism of Action of the Synthetic Resorcinolic Methyl 3, 5-dimethoxy-2-octanoylbenzoate. **Chemical Research in Toxicology**. 2024.

CORSO, C. R.; STIPP, M. C.; ADAMI, E. R.; DA SILVA, L. M.; MARIOTT, M.; DE ANDRADE, S. F.; RAMOS, E. A. S.; KLASSEN, G.; BELTRAME, O. C.; QUEIROZ-TELES, J. E.; OLIVEIRA, C. S.; STEFANELLO, M. E. A.; ACCO, A. *Salvia lachnostachys* Benth has antitumor and chemopreventive effects against solid Ehrlich carcinoma. **Molecular Biology Reports**. v. 46, p. 4827-4841, 2019.

DEMIR, E.; TURNA, F.; KAYA, B.; CREUS, A.; MARCOS, R. Mutagenic/recombinogenic effects of four lipid peroxidation products in *Drosophila*. **Food and chemical toxicology**. v. 53, p. 221-227, 2013.

COSTA, R. D. S.; BRASIL, T. C.; SANTOS, C. D. J.; SANTOS, D. B.; BARRETO, M. L.; NEVES, N. M. A.; DE FIGUEIREDO, C. A. Produtos naturais utilizados para tratamento de asma em crianças residentes na cidade de Salvador-BA, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, p. 594-599, 2010.

CSGMT (Collaborative Study Group for the Micronucleus Test). Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. **Mutation Res.**, v. 278, p. 83- 98, 1992.

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v. 402, n. 1-2, p. 151-158, 1998.

DIAB, K. A. S.; ABOUL-ELA, E. In vivo comparative studies on antigenotoxicity of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) pits extract against DNA damage induced by N-Nitroso-N-methylurea in mice. **Toxicology international**. v. 19, n. 3, p. 279, 2012.

DOSUMU, O. O.; IDOWU, P. A.; ONOCHA, P. A.; EKUNDAYO, O. Isolation of 3-(4-hydroxyphenyl) methylpropenoate and bioactivity evaluation of *Gomphrena celosioides* extracts. **EXCLI journal**. v. 9, p. 173, 2010.

EEKEN, J. C.; KLINK, I.; VAN VEEN, B. L.; PASTINK, A.; FERRO, W. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene wts. **Environmental and molecular mutagenesis**. v. 40, n. 4, p. 277-282, 2002.

ENOMOTO, Y.; AN, P. N.; YAMAGUCHI, M.; FUKUSAKI, E.; SHIMMA, S. Mass spectrometric imaging of GABA in the *Drosophila melanogaster* adult head. **Analytical Sciences**. v. 34, n. 9, p. 1055-1059, 2018.

FANK-DE-CARVALHO, S. M.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Arquitetura, anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborescens* Lf (Amaranthaceae). **Acta Botanica Brasilica**. v. 19, p. 377-390, 2005.

FEDEL-MIYASATO, L. E.; KASSUYA, C. A.; AUHAREK, S. A.; FORMAGIO, A. S.; CARDOSO, C. A.; MAURO, M. O.; CUNHA-LAURA, A. L.; MONREAL, A. C. D.; VIEIRA, M. C.; OLIVEIRA, R. J. Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 24, p. 565-575, 2014a.

FEDEL-MIYASATO, L. E. S.; FORMAGIO, A. S. N.; AUHAREK, S. A.; KASSUYA, C. A. L.; NAVARRO, S. D.; CUNHA-LAURA, A. L.; OLIVEIRA, R. J. Antigenotoxic and antimutagenic effects of *Schinus terebinthifolius* Raddi in *Allium cepa* and Swiss mice: a comparative study. **Genetics and Molecular Research**. v. 13, n. 2, p. 3411-3425, 2014b.

FERNÁNDEZ-BERTÓLEZ, N.; LEMA-ARRANZ, C.; FRAGA, S.; TEIXEIRA, J. P.; PÁSARO, E.; LORENZO-LÓPEZ, L.; VALDIGLESIAS, V.; LAFFON, B. Suitability of salivary leucocytes to assess DNA repair ability in human biomonitoring studies by the challenge-comet assay. **Chemosphere**. v. 307, p. 136139, 2022

FERRARI, C. K. B. Oxidative stress pathophysiology: searching for an effective antioxidant protection. **INTERNATIONAL MEDICAL JOURNAL-TOKYO**. v. 8, n. 3, p. 175-184, 2001.

FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. A. F. S. New dietetic compounds with anticarcinogenic properties. **Rev. Bras. Cancerol.** v. 48, p. 375-382, 2002.

FLAGG, E. W.; COATES, R. J.; GREENBERG, R. S. Epidemiologic studies of antioxidants and cancer in humans. *Journal of the American College of Nutrition*. v. 14, n. 5, p. 419-427, 1995.

FIRMO, W. D. C. A.; DE MENEZES, V. D. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; SANTOS NETO, M.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Caderno de Pesquisa**. v. 18, 2012.

GHONIME, M.; EMARA, M.; SHAWKY, R.; SOLIMAN, H.; EL-DOMANY, R.; ABDELAZIZ, A. Immunomodulation of RAW 264.7 murine macrophage functions and antioxidant activities of 11 plant extracts. **Immunological Investigations**. v. 44, n.3, p. 237-252, 2015.

GOMES, E. M.; SOUTO, P. R. F.; FELZENSZWALB, I. Shark-cartilage containing preparation protects cells against hydrogen peroxide induced damage and mutagenesis. **Mutation Research/Genetic Toxicology**. v. 367, n. 4, p. 203-208, 1996.

GRAF, U.; VAN SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**. v. 271, n. 1, p. 59-67, 1992.

HAYASHI, M.; KODAMA, Y.; AWOGI, T.; SUZUKI, T.; ASITA, A. O.; SOFUNI, T. The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin C-and cyclophosphamide-treated rats. **Mutation Research/Genetic Toxicology**. v. 278, n. 2-3, p. 209-213, 1992.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE JR, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research Letters**. v. 245, n. 4, p. 245-249, 1990.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPARY, J. T.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. **Environmental and molecular mutagenesis**. v. 18, n. 4, p. 277-291, 1991.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. EdUFSCar. 2003

IKRAM, M.; SHARIQ, M.; KHAN, A.; FATIMA, S.; SIDDIQUI, M. A. Nemato-toxic analysis of several chopped plant leaves against *Meloidogyne incognita* affecting tomato In vitro and In pots. **Bioinformation**. v. 18, n. 4, p. 354, 2022.

ISHIKAWA, R. B.; LEITÃO, M. M.; KASSUYA, R. M.; MACORINI, L. F.; MOREIRA, F. M. F.; CARDOSO, C. A. L.; COELHO, R. G.; POTT, A.; GELFUSO, G.

M.; CRODA, J.; OLIVEIRA, R. J.; KASSUYA, C. A. L. Anti-inflammatory, antimycobacterial and genotoxic evaluation of *Doliocarpus dentatus*. **Journal of ethnopharmacology**. v. 204, p. 18-25, 2017.

ISHIKAWA, R. B.; VANI, J. M.; DAS NEVES, S. C.; RABACOW, A. P. M.; KASSUYA, C. A. L.; CRODA, J.; CARDOSO, C. A. L.; MONREAL, A. C. D. F.; ANTONIOLLI, A. C. M. B.; CUNHA-LAURA, A. L.; OLIVEIRA, R. J. The safe use of *Doliocarpus dentatus* in the gestational period: Absence of changes in maternal reproductive performance, embryo-fetal development and DNA integrity. **Journal of ethnopharmacology**. v. 217, p. 1-6, 2018.

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. **Genes & development**. v. 9, n. 5, p. 534-546, 1995.

KADA, T.; SHIMOI, K. Desmutagens and bio-antimutagens—their modes of action. **Bioessays**. v. 7, n. 3, p. 113-116, 1987.

KASHYAP, B.; REDDY, P. S. Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. **Journal of cancer research and therapeutics**. v. 8, n. 2, p. 184-191, 2012.

KELLOFF, G. J.; CROWELL, J. A.; STEELE, V. E.; LUBET, R. A.; BOONE, C. W.; MALONE, W. A.; HAWK, E. T.; LIEBERMAN, R.; LAWRENCE, J. A.; KOPELOVICH, L.; ALI, J.; VINER, J. L.; SIGMAN, C. C. Progress in cancer chemoprevention. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 889, n. 1, p. 1-13, 1999.

KLEINER, S. M. Defense plants: foods that fight disease. *The Physician and Sportsmedicine*. v. 25, n. 12, p. 89-90, 1997.

KOBAYASHI, H. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **MMS Commun.** v. 3, p. 103-115, 1995.

KONG, Q.; LILLEHEI, K. O. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. **Medical hypotheses**. v. 51, n. 5, p. 405-409, 1998.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. v. 455, n. 1-2, p. 155-166, 2000.

MACORINI, L. F. B.; MARIS, R. S.; TEIXEIRA, T. C.; ITO, C. N. A.; KURAOKA-OLIVEIRA, A. M.; BACHA, F. B.; MEJIA, A. J. B.; SALVADOR, M. J.; KASSUYA,

C. A. L.; ARENA, A. C. Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from the aerial parts of *Gomphrena celosioides* Mart. in rodents. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 133, p. 105217, 2022.

MACORINI, L. F. B.; RADAI, J. A. S.; MARIS, R. S.; SILVA-FILHO, S. E.; LEITAO, M. M.; ANDRADE, S. F. D.; GELVES, D. I. A.; SALVADOR, M. J.; ARENA, A. C.; KASSUYA, C. A. L. Antiarthritic and antihyperalgesic properties of ethanolic extract from *Gomphrena celosioides* Mart.(Amaranthaceae) aerial parts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2020, 2020.

MANOHARAN, K.; BANERJEE, M. R. β -Carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. **Cell Biology International Reports**. v. 9, n. 9, p. 783-789, 1985.

MANTOVANI, M. S.; BELLINI, M. F.; ANGELI, J. P. F.; OLIVEIRA, R. J.; SILVA, A. F.; RIBEIRO, L. R. β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. v. 658, n. 3, p. 154-161, 2008.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. *Nature reviews immunology*. v. 5, n. 8, p. 606-616, 2005.

MICHIKO, K.; YOSHIYA, H.; SHIGENOBU, W.; MAKOTO, H. Validation of the mouse peripheral blood micronucleus assay using acridine orange supravital staining with urethane. **Mutation Research/Genetic Toxicology**. v. 278, n. 2-3, p. 205-208, 1992.

MORAES, M. E. A.; GSM, S. Aroeira-do-sertão: um candidato promissor para o tratamento de úlceras gástricas. **FUNCAP**. v. 3, p. 5-6, 2001.

MORRIS-SCHAFFER K, MCCOY MJ. A review of the LD50 and its current role in hazard communication. **ACS Chemical Health & Safety Journal**, v.28, n.1, p 25-33, 2021.

MOURA, R. M. X.; PEREIRA, P. S.; JANUARIO, A. H.; DE CASTRO FRANÇA, S.; DIAS, D. A. Antimicrobial screening and quantitative determination of benzoic acid derivative of *Gomphrena celosioides* by TLC-densitometry. **Chemical and pharmaceutical bulletin**. v. 52, n. 11, p. 1342-1344, 2004.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.

NAVARRO, S. D.; BEATRIZ, A.; MEZA, A.; PESARINI, J. R.; DA SILVA GOMES, R.; KARAZIACK, C. B.; CUNHA-LAURA, A. L.; MONREAL, A. C. D.; ROMÃO, W.; LACERDA JÚNIOR, V.; MAURO, M. O.; OLIVEIRA, R. J. A new synthetic

resorcinolic lipid 3-Heptyl-3, 4, 6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: Evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. **European journal of medicinal chemistry**. v.75, p. 132-142, 2014.

NAVARRO, S. D.; PESSATTO, L. R.; MEZA, A.; DE OLIVEIRA, E. J. T.; AUHAREK, S. A.; VILELA, L. C.; LIMA, D. P.; AZEVEDO, R. B.; KASSUYA, C. A. L.; CÁCERES, O. I. A.; GOMES, R. S.; BEATRIZ, A.; OLIVERIA, R. J.; MARTINES, M. A. U. Resorcinolic lipid 3-heptyl-3, 4, 6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one is a strategy for melanoma treatment. **Life sciences**. v. 209, p. 300-312, 2018.

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, n. 3, p. 2-8, 2005.

NEVES, S. C.; DE ARAÚJO, F. H.; CORREA, W. A.; MARTINS, A. C. F.; COELHO, H. R. S.; VILELA, M. L. B.; NASCIMENTO, V. A.; KASSUYA, C. A. L.; LIMA, D. P.; BEATRIZ, A.; OLIVEIRA, R. J.; GOMES, R. D. S. 3-Heptylidene-4, 6-Dimethoxy-3 H-Isobenzofuran-1-One Is Genotoxic, Increases the Frequency of Cell Death, and Potentiates the Effects of Cyclophosphamide and Cisplatin. *Molecules*, v. 28, n. 3, p. 1044, 2023.

NEVES, S. C.; NORONHA, R. C. R.; MONREAL, A. C. D.; DO NASCIMENTO, L. A. S.; CARDOSO, A. L.; TAVARES, F. S.; TURA, B. B.; GOMES, R. S.; KASSUYA, C. A. L.; NUNES, V. K.; SALVADOR, M. J.; OLIVEIRA, R. J. Absence of adverse effects of Blutaparon portulacoides (A. St.-Hil.) Mears in mice exposed during pregnancy. **South African Journal of Botany**. v. 166, p. 52-59, 2024.

NUNES, R. C. S.; NEVES, S. C. D.; SALUSTRIANO, F. R.; VILELA, M. L. B.; NASCIMENTO, V. A. D.; ARUNACHALAM, K.; GOMES, R. S.; KASSUYA, C. A. L.; MOTA, J. S.; OLIVEIRA, R. J. The ethanolic extract of Piper glabratum Kunth is teratogenic and interferes with the ossification process of Swiss mice fetuses. **Pharmaceuticals**. v. 16, n. 3, p. 430, 2023.

MACORINI, L. F. B.; RADAI, J. A. S.; MARIS, R. S.; SILVA-FILHO, S. E.; LEITAO, M. M.; ANDRADE, S. F. D.; GELVES, D. I. A.; SALVADOR, M. J.; ARENA, A. C.; KASSUYA, C. A. L. Antiarthritic and antihyperalgesic properties of ethanolic extract from *Gomphrena celosioides* Mart. (Amaranthaceae) aerial parts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2002, 2020.

Monteiro, S. C.; Brandelli, C. L. C. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. Artmed Editora, 2017.

Moreira, H. D. C.; Bragança, H. B. N. Manual de identificação de plantas infestantes. *Campinas: FMC Agricultural Products*, 2011.

NISHIYAMA, Y.; HIROTA, T.; MORISAKI, T.; HARA, T.; MARUMOTO, T.; IIDA, S. I.; MAKINO, K.; YAMAMOTO, H.; HIRAOKA, T.; KITAMURA, N.; SAYA, H. A human homolog of *Drosophila* warts tumor suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. *FEBS letters*. v. 459, n. 2, p. 159-165, 1999.

OLIVEIRA, R. J.; PEREIRA, F. P. A. N.; SILVEIRA, I. O. M. F.; LIMA, R. V.; BERNO, C. R.; PESARINI, J. R.; ANTONIOLLI-SILVA, A. C. M. B.; MONREAL, A. C. D.; ADILSON, B.; LIMA, D. P.; GOMES, R. D. S. Assessment of the toxicogenic effects and cell death potential of the ester (Z)-methyl 4-((1, 5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2, 3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl) amino)-4-oxobut-2-anoate in combination with cisplatin, cyclophosphamide and doxorubicin. **Genetics and Molecular Biology**. v. 42, p. 399-410, 2019.

OLIVEIRA, E. J. T.; PESSATTO, L. R.; DE FREITAS, R. O. N.; PELIZARRO, B. I.; RABACOW, A. P. M.; VANI, J. M.; MONREAL, A. C. D.; MANTOVANI, M. S.; AZEVEDO, R. B.; ANTONIOLLI-SILVA, A. C. M. B.; GOMES, R. S.; OLIVEIRA, R. J. New Bis copper complex ((Z)-4-((4-chlorophenyl) amino)-4-oxobut-2-enoyl) oxy): Cytotoxicity in 4T1 cells and their toxicogenic potential in Swiss mice. **Toxicology and applied pharmacology**. v. 356, p. 127-138, 2018.

OLIVEIRA, V. C.; CONSTANTE, S. A. R.; POLLONI, L.; ORSOLIN, P. C.; SILVA-OLIVEIRA, R. G.; MACHADO, N. M.; OLIVEIRA-JUNIOR, R. J.; NEPOMUCENO, J. C. Protective effect of aspirin against mitomycin C-induced carcinogenicity, assessed by the test for detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. **Drug and Chemical Toxicology**. v. 41, n. 3, p. 330-337, 2018.

OLIVEIRA, R. J.; SANTOS, N. C. L.; PESARINI, J. R.; OLIVEIRA, B. C.; BERNO, C. R.; ARAÚJO, F. H. S.; SILVEIRA, I. O. M. F.; NASCIMENTO, R. O.; ANTONIOLLI-SILVA, A. C. M. B.; MONREAL, A. C. D.; BEATRIZ, A.; LIMA, D. P.; GOMES, R. S. Assessment of genetic integrity, splenic phagocytosis and cell death potential of (Z)-4-((1, 5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2, 3dihydro-1H-pyrazol-4-yl) amino)-4-oxobut-2-enoic acid and its effect when combined with commercial chemotherapeutics. **Genetics and molecular biology**. v. 41, p. 154-166, 2018.

OLIVEIRA, R. J.; DA SILVEIRA, I. O. M. F.; DAS NEVES, S. C.; MITSUYASU, B.; MARTINS, A. C.; BERNO, C.; MOHAMMAD, J.; RAJ, H.; ARAUJO, F. H. S.; HORTELAN, C. R.; MACHADO, L.; SILVA JUNIOR, E. N.; VILELA, M. L. B.; NASCIMENTO, V. A.; BEATRIZ, A.; GOMES, R. S. ZIM, a Norbornene Derived from 4-Aminoantipyrine, Induces DNA Damage and Cell Death but in AssOciation Reduces the Effect of Commercial Chemotherapeutics. **Chemical Research in Toxicology**. v. 36, n. 1, p. 66-82, 2022.

OLIVEIRA, R. J.; MATUO, R.; DA SILVA, A. F.; MATIAZI, H. J.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, L. R. Protective effect of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. **Toxicology in vitro**. v. 21, n. 1, p. 41-52, 2007.

OLIVEIRA, R. J.; NAVARRO, S. D.; DE LIMA, D. P.; MEZA, A.; PESARINI, J. R.; GOMES, R. S.; KARAZIACK, C. B.; MAURO, M. O.; CUNHA-LAURA, A. L.; MONREAL, A. C. D.; ROMÃO, W.; LACERDA JÚNIOR, V.; BEATRIZ, A. A novel cytosporone 3-Heptyl-4, 6-dihydroxy-3H-isobenzofuran-1-one: synthesis; toxicological, apoptotic and immunomodulatory properties; and potentiation of mutagenic damage. **BMC câncer**. v. 15, n. 1, p. 1-15, 2015.

OLIVEIRA, R. J.; RIBEIRO, L. R.; DA SILVA, A. F.; MATUO, R.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of β -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in vitro**. v. 20, n. 7, p. 1225-1233, 2006.

OLIVEIRA, R. J.; SALLES, M. J. S.; DA SILVA, A. F.; KANNO, T. Y. N.; DOS SANTOS LOURENÇO, A. C.; FREIRIA, G. A.; MATIAZI, H. J.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Effects of the polysaccharide β -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 53, n. 3, p. 164-173, 2009.

OLIVEIRA, R. J.; SALLES, M. J. S.; SILVA, A. F. D.; KANNO, T. Y. N.; LOURENÇO, A. C. D. S.; LEITE, V. D. S.; MATIAZI, H. J.; PESARINI, J. P.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. In vivo evaluation of the antimutagenic and antigenotoxic effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* in acute treatment with multiple doses. **Genetics and Molecular Biology**. v. 36, p. 413-424, 2013.

OLUWABUNMI, I. J.; ABIOLA, T. Gastroprotective effect of methanolic extract of *Gomphrena celosioides* on indomethacin induced gastric ulcer in Wistar albino rats. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**. v. 5. n. 1, p. 41, 2015.

Organisation for Economic Co-operation and Development. Test No. 425: acute oral toxicity: up-and-down procedure. **OECD publishing**, 2008.

Organisation for Economic Co-operation and Development. Test No. 421: reproduction/developmental toxicity screening. **OECD publishing**, 2015.

ORSOLIN, P. C.; SILVA-OLIVEIRA, R. G.; NEPOMUCENO, J. C. Modulating effect of synthetic statins against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**. v. 81, p. 111-119, 2015.

ORTIZ, H. C.; DAS NEVES, S. C.; KASSUYA, C. A. L.; COELHO, H. R. S.; MARTINS, A. C.; VILELA, M. L. B.; NASCIMENTO, V. A.; KARAPPUSAMY, A.; STEFANELLO, M. E. A.; OLIVEIRA, R. J.; GOMES, R. S. The ethanolic extract of *Salvia lachnostachys* Benth is not maternotoxic, does not alter reproductive performance, but has teratogenic potential. **BMC Complementary Medicine and Therapies**. v. 23, n. 1, p. 145, 2023.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and biophysical research communications**. v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

POMILIO, A. B.; BUSCHI, C. A.; TOMES, C. N.; VIALE, A. A. Antimicrobial constituents of *Gomphrena* martiana and *Gomphrena* boliviana. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 36, n. 2, p. 155-161, 1992.

PRACHI, C.N.; KUMAR, D.; KASANA, M.S. Medicinal plants of Muzaffarnagar district used in treatment of urinary tract and kidney stones. **Indian J. Tradit. Knowl.** v. 8, p. 191-195, 2009.

PROMRAKSA, B.; PHETCHARABURANIN, J.; NAMWAT, N.; TECHASEN, A.; BOONSIRI, P.; LOILOME, W. Evaluation of anticancer potential of Thai medicinal herb extracts against cholangiocarcinoma cell lines. **PloS one**. v. 14, n. 5, p. e0216721, 2019.

Rates, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

REZENDE, G. C. D.; NORONHA, R. C. R.; ORTIZ, H. C.; DO NASCIMENTO, L. A. S.; DAS NEVES, S. C.; VENTURA SAID, Y. L.; CARDOSO, A. L.; MESCOUTO, V. A.; VILELA, M. L. B.; NASCIMENTO, V. A.; COELHO, H. R. S.; KASSUYA, C. A. L.; PEDROSO, T. F.; SALVADOR, M. J.; OLIVEIRA, R. J. Absence of maternal-fetal adverse effects of *Alternanthera littoralis* P. Beauv. following treatment during pregnancy in mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Part A, p. 1-14, 2023.

ROCHA, R. S.; KASSUYA, C. A. L.; FORMAGIO, A. S. N.; MAURO, M. O.; ANDRADE-SILVA, M.; MONREAL, A. C. D.; CUNHA-LAURA, A. L.; VIEIRA, M. C.; OLIVEIRA, R. J. Analysis of the anti-inflammatory and chemopreventive potential and description of the antimutagenic mode of action of the *Annona crassiflora* methanolic extract. **Pharmaceutical biology**. v. 54, n. 1, p. 35-47, 2016.

SALUSTRIANO, F. R.; MONREAL, A. C. D.; DAS NEVES, S. C.; DE OLIVEIRA, G. M.; DE OLIVEIRA, D. D. M.; VILELA, M. L. B.; NASCIMENTO, V. A.; MARTINS, A. C. F.; SAROJA, B.; KARUPPUSAMY, A.; COELHO, H. R. S.; KASSUYA, C. A. L.; GELVES, D. I. A.; SALVADOR, M. J.; OLIVEIRA, R. J.; GOMES, R. D. S. The ethanolic extract of *Gomphrena* celosioides Mart. does not alter reproductive performance or embryo-fetal development, nor does it cause chromosomal damage. **Pharmaceutics**. v. 14, n. 11, p. 2369, 2022.

SANGARE, M.; KLOTOE, J. R.; DOUGNON, V.; ATEGBO, J. M.; LALEYE, A.; EDORH, P.; FAH, L.; SENOU, M.; LOKO, F.; DRAMANE, L. K. Evaluation of the hepatoprotective activity of *Gomphrena* celosioides (Amaranthaceae) on Wistar rats intoxicated with tetrachloride carbon. **Int. J. Curr. Res.** v. 4, p. 67-72, 2012.

SANTOS, H. S.; CRUZ, W. M. S. The antioxidant vitamin nutritional therapy and the chemotherapy treatment in oncology. [A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes eo tratamento quimioterápico oncológico]. **Rev. Bras. Cancerol.** v. 47, p. 303-308, 2001.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** v. 5, p. 371-400, 2003.

SCHMID, W. The micronucleus test. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects. v. 31, n. 1, p. 9-15. 1975.

SCHNEIDER, B. U. C.; MEZA, A.; BEATRIZ, A.; PESARINI, J. R.; CARVALHO, P. C. D.; MAURO, M. D. O.; KARAZIACK, C. B.; CUNHA-LAURA, A. L.; MONREAL, A. C. D.; MATUO, R.; LIMA, D. P.; OLIVEIRA, R. J. Cardanol: toxicogenetic assessment and its effects when combined with cyclophosphamide. **Genetics and molecular biology.** v. 39, p. 279-289, 2016.

SENNA, L.; SIQUEIRA, J. C.; MARCHIORETTO, M. S. *Gomphrena* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2015.

SHARMA, N. E. H. A.; VIJAYVERGIA, R. Study of primary metabolites and antimicrobial activity of *Gomphrena celosioides* Mart. **Int. J. Pharm. Bio. Sci.** v. 3, n 2, p. 424-431, 2011.

SILVA, B. C.; OLIVEIRA, R. G. S.; VASCONCELOS, M. A. Efeito modulador do óleo essencial do limão Taiti (*Citrus latifolia*) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas.** v. 19, n. 1, p. 72-77, 2020.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research.** v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SOULEYMANE, M.; KONAN, G.; HOUPHOUET, F. Y.; SOULEYMANE, M.; ADOU, F. Y.; ALLICO, J. D. Antioxidant in vivo, in vitro activity assessment and acute toxicity of aqueous extract of *Gomphrena celosioides* (Amaranthaceae). **Experiment.** v. 23, n. 3, p. 1601-1610, 2014.

SPANÓ, M. A.; FREI, H.; WÜRGLER, F. E.; GRAF, U. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. **Mutagenesis.** v. 16, n. 5, p. 385-394, 2001.

SPEIT, G.; HANELT, S.; HEIBIG, R.; SEIDEL, A.; HARTMANN, A. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. **Toxicology letters.** v. 88, n. 1-3, p. 91-98, 1996.

SURH, Y. J.; SHLYANKEVICH, M.; LEE, J. W.; YOO, J. K. Inhibition of covalent DNA binding and mutagenicity of benzo [a] pyrene by isopropyl-2-(1, 3-dithietane-2-ylidene)-2-[N-(4-methylthiazol-2-yl) carbamoyl] acetate (YH439), a novel hepatoprotective agent. **Mutation Research/Genetic Toxicology**. v. 367, n. 4, p. 219-224, 1996.

CARVALHO, S. M. F. D.; GOMES, M. R. D. A.; SILVA, P. Í. T.; BÃO, S. N. Leaf surfaces of *Gomphrena* spp.(Amaranthaceae) from Cerrado biome. **Biocell**. v. 34, n. 1, p. 23-35, 2010.

TAKIM, F. O.; OLAWOYIN, O. K.; OLANREWaju, W. A. Growth and development of *Gomphrena celosioides* mart under screen house conditions in ilorin, southern Guinea savanna zone of Nigeria. **Agrosearch**. v. 13, n. 2, p. 59-66, 2013.

TUCKER, J. D.; PRESTON, R. J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**. v. 365, n. 1-3, p. 147-159, 1996.

UPADHYAY, P.; SHUKLA, R.; MISHRA, S. K. Acute and sub-acute toxicity study of hydro-alcoholic leaves extract of *Reinwardtia indica* in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 111, p. 36-41, 2019.

VASCONCELOS, M. A.; ORSOLIN, P. C.; OLIVEIRA, V. C.; LIMA, P. M. A. P.; NAVES, M. P. C.; DE MORAIS, C. R.; NICOLAU-JUNIOR, N.; BONETTI, A. M.; SPANÓ, M. A. Modulating effect of vitamin D3 on the mutagenicity and carcinogenicity of doxorubicin in *Drosophila melanogaster* and in silico studies. **Food and Chemical Toxicology**. v. 143, p. 111549, 2020.

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 and Chemical Toxicology**. v, 101, p. 1-7, 2017.

VASCONCELOS, P. C. P.; SPESSOTTO, D. R.; MARINHO, J. V.; SALVADOR, M. J.; JUNIOR, A. G.; KASSUYA, C. A. L. Mechanisms underlying the diuretic effect of *Gomphrena celosioides* Mart.(Amaranthaceae). **Journal of ethnopharmacology**. v. 202, p. 85-91, 2017a.

VASCONCELOS, P. C. P.; TIRLONI, C. A. S.; PALOZI, R. A. C.; LEITÃO, M. M.; CARNEIRO, M. T. S.; SCHAEGLER, M. I.; SILVA, A. O.; SOUZA, R. I. C.; SALVADOR, M. J.; GASPAROTTO JUNIOR, A.; KASSUYA, C. A. L. Diuretic herb *Gomphrena celosioides* Mart.(Amaranthaceae) promotes sustained arterial pressure reduction and protection from cardiac remodeling on rats with renovascular hypertension. **Journal of ethnopharmacology**. v. 224, p. 126-133, 2018.

VIEIRA, C. C. J.; MERCIER, H.; CHU, E. P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. *Gomphrena* species (globe amaranth): In vitro culture and production of secondary metabolites. In Medicinal and aromatic plants VII . Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 257-270, 1994,

WAGNER, W. L.; HERBST, D. R.; SOHMER, S. H. Manual of the Flowering Plants of Hawai'i, Vols. 1 and 2 (No. Edn 2). University of Hawai'i and Bishop Museum Press, 1999.

WATERS, M. D.; BRADY, A. L.; STACK, H. F.; BROCKMAN, H. E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**. v. 238, n. 1, p. 57-85, 1990.

WEISBURGER, J. H. Eat to live, not live to eat. **Nutrition**. v. 16, n. 9, p. 767-773, 2000.

WEISBURGER, J. H. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. **Food and chemical toxicology**. v. 37, n. 9-10, p. 943-948, 1999.

YU, T.; BACHMAN, J.; LAI, Z. C. Mutation analysis of large tumor suppressor genes LATS1 and LATS2 supports a tumor suppressor role in human cancer. **Protein & Cell**. v. 6, n. 1, p. 6-11, 2015.

ZHANG, S.; HUNTER, D. J.; FORMAN, M. R.; ROSNER, B. A.; SPEIZER, F. E.; COLDITZ, G. A.; MANSON, J. E.; HANKINSON, S. E.; WILLETT, W. C. Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risk of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 91, n. 6, p. 547-556, 1999.

Original Article

The ethanolic extract of *Gomphrena celosioides* is not carcinogenic and has antigenotoxic effects and chemopreventive Properties

O extrato etanólico de *Gomphrena celosioides* não é carcinogênico e tem efeito antigenotóxico e propriedades quimiopreventivas

M. M. M. D. Levenhagen^a , S. C. Neves^a , N. M. Machado^b , B. C. Silva^b , R. G. S. Oliveira^b , C. A. L. Kassuya^c , M. J. Salvador^d  and R. J. Oliveira^a 

^aUniversidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Centro de Estudos em Células-Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica – CeTroGen, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Campo Grande, MS, Brasil

^bCentro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM, Laboratório de Citogenética e Mutagenese – LABCIM, Patos de Minas, MG, Brasil

^cUniversidade Federal da Grande Dourados – UFGD, Faculdade de Ciências da Saúde, Dourados, MS, Brasil

^dUniversidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Vegetal, Campinas, SP, Brasil

Abstract

Gomphrena celosioides, popularly known as perpétua, perpétua brava, bachelor's button and prostate globe amarath, is used for the treatment of urinary tract disorders, kidney stones, for skin diseases, infectious diseases, gastrointestinal and respiratory conditions. Rich in phenolic acids and flavonoids, this plant has therefore a potential for use in cancer prevention. Given the above, the present research aimed to evaluate the carcinogenic effect of the ethanolic extract of *G. celosioides* (EEGc) in an alternative model of *Drosophila melanogaster* and the genotoxic and antigenotoxic effects in Swiss mice. The larval survival test and the detection of epithelial tumor clones were performed in *D. melanogaster*. The tested EEGc concentrations were 0.96, 1.92, 3.85 and 7.70 mg/mL. In Swiss mice, the genotoxicity and antigenotoxicity of doses of 100, 1,000 and 2,000 mg/Kg were evaluated. The results showed that EEGc at a concentration of 7.70 mg/mL reduced ($p < 0.05$) larval survival. However, EEGc was not carcinogenic, and the lowest concentration (0.96 mg/mL) prevented ($p < 0.05$) the basal occurrence of epithelial tumors. In mice, EEGc at the highest dose (2,000mg/Kg) increased the frequency of genomic lesions ($p < 0.05$). Yet, none of the doses caused chromosomal lesions ($p > 0.05$). When associated with cyclophosphamide, EEGc was antigenotoxic ($p < 0.05$). The percentages of reduction of genomic damage ranged from 33.39 to 63.23% and of chromosomal damage from 20.00 to 77.19%. In view of the above, it is suggested that EEGc is not carcinogenic, has an antigenotoxic effect and chemopreventive properties.

Keywords: medicinal plant, Amaranthaceae, comet, micronucleus, splenic phagocytosis.

Resumo

Gomphrena celosioides, conhecida popularmente por perpétua, perpétua brava, bachelor's button e prostate globe amarath, é utilizada na medicina popular para o tratamento de distúrbios do trato urinário e pedra nos rins e para doenças de pele, infecciosas, gastrointestinais e respiratórias. Essa planta é rica em ácidos fenólicos e flavonóides e, portanto, tem potencial para uso na prevenção de câncer. Frente ao exposto, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar o efeito carcinogênico do extrato etanólico de *G. celosioides* (EEGc) em modelo alternativo de *Drosophila melanogaster* e os efeitos genotóxicos e antigenotóxicos em camundongos Swiss. Em *D. melanogaster* foi realizado o teste de sobrevivência larval e para a detecção de clones de tumores epiteliais. As concentrações testadas do EEGc foram de 0,96, 1,92, 3,85 e 7,70 mg/mL. Em camundongos Swiss avaliou-se a genotoxicidade e antigenotoxicidade das doses de 100, 1.000 e 2.000 mg/Kg. Os resultados demonstraram que o EEGc na concentração de 7,70 mg/mL reduziu ($p < 0,05$) a sobrevivência larval. No entanto, o EEGc não é carcinogênico e a menor concentração (0,96 mg/mL) preveniu ($p < 0,05$) a ocorrência basal de tumores epiteliais. Nos camundongos o EEGc na maior dose (2.000mg/Kg) aumentou a frequência de lesões genômicas ($p < 0,05$). Porém, nenhuma das doses causou lesões cromossômicas ($p > 0,05$). Quando associado à ciclofosfamida o EEGc foi antigenotóxico ($p < 0,05$). As porcentagens de redução de danos genômicos variaram de 33,39 a 63,23% e de danos cromossômicos de 20,00 a 77,19%. Frente ao exposto, sugere-se que o EEGc não é carcinogênico, tem efeito antigenotóxico e propriedade quimiopreventiva.

Palavras-chave: planta medicinal, Amaranthaceae, cometa, micronúcleo, fagocitose esplênica.

*e-mail: rodrigo.oliveira@ufms.br

Received: February 13, 2024 – Accepted: July 8, 2024



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. Introduction

Gomphrena celosioides, in Brazil popularly known as “perpétua” or “perpétua brava” and in other countries as “bachelor’s button” and “prostate globe amaralht” (Myers et al., 2000; Fank-DeCarvalho and Graciano-Ribeiro, 2005; Vasconcelos et al., 2018), is a weed little consumed by wild animals (Fank-DeCarvalho and Graciano-Ribeiro, 2005). However, it is widely used in popular medicine for the treatment of urinary tract disorders and kidney stones (Prachi et al., 2009; Sharma and Vijayvergia, 2011; Vasconcelos et al., 2017a; Vasconcelos et al., 2018), in infectious skin diseases (Marcorini et al., 2020), gastrointestinal and respiratory illnesses (Vasconcelos et al., 2017a).

In spite of being little consumed by wild animals (Fank-DeCarvalho and Graciano-Ribeiro, 2005), its use is described as safe. According to Souleymane et al. (2014), the median lethal dose (LD50), in acute toxicity, for aqueous extract of *G. celosioides* is greater than 4000mg/Kg. For the ethanolic extract, it is higher than 2,000mg/kg (Macorini et al., 2022). In Addition, our group demonstrated that the ethanolic extract is also safe when administered to pregnant females and, therefore, did not cause genetic damage and did not alter reproductive performance and embryo-fetal development (Salustriano et al., 2022).

This use safety, which includes the absence of genotoxic damage, is a reliable indication to evaluate chemopreventive or antigenotoxic effects for *G. celosioides*. This fact is further corroborated by the constituents present in the ethanolic extract, which are phenolic acids and flavonoids (Vasconcelos et al., 2017a). Chemical compounds classes that can act as antioxidants, being antioxidants important as chemoprotectors (Kong and Lillehei, 1998; Santos; Cruz, 2001).

Given the above, the present research aimed to evaluate the carcinogenic effect of the ethanolic extract of *G. celosioides* (EEGc) in an alternative model of *Drosophila melanogaster* and the genotoxic and antigenotoxic effects in Swiss mice.

2. Materials and Methods

2.1. Botanical material and extract preparation

The ethanolic extract of *G. celosioides* was produced from aerial parts of the plant according to the method described in previous publications by our study group (Vasconcelos et al., 2017a; Salustriano et al., 2022). The EEGc evaluated in this study was also used by Vasconcelos et al. (2017a) and Salustriano et al. (2022) and the characteristics of the extract were, therefore, previously described in the literature.

Nevertheless, the extracts have been tested to confirm the same composition over the years (Vasconcelos et al., 2017a). Plant samples were collected in April 2014 in Paranaíba, Mato Grosso do Sul, Brazil [lat: -19.666667 long: -51.183333 WGS84], analyzed and cataloged by professor Dr. Josafá Carlos de Siqueira, at the Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ).

A voucher specimen was archived in the Herbarium of the Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo (FFCLRP/USP) under number

Anexo

SPFR-2962. The species was registered in the National Registry System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SISGEN) under the codes AF99A04 and ASEC80E.

2.2. Chemical agents

EEGc was solubilized in Tween 80 (1%) and subsequently diluted with distilled water. The concentrations used in the test for the detection of epithelial tumor clones by Epithelial Tumor Test (ETT) in *D. melanogaster* were 0.96, 1.92, 3.85 and 7.70 mg/mL. These concentrations were defined in a pilot experiment (data not shown).

The doses used in the study with mice were 100, 1,000 and 2,000mg/kg of body weight (b.w.) by gavage (orally – p.o.). According to Vasconcelos et al. (2017a), the dose of 100 mg/kg has a diuretic effect and that is the reason it was chosen as an effective and therapeutic dose. The other two doses were based on the study by Salustriano et al. (2022) and according to this study, the dose of 1,000mg/Kg is a safe dose (10x higher) than the effective/therapeutic dose (Brasil, 2020; OECD, 2015) and the dose of 2,000mg/Kg was established as the limiting dose according to the acute oral toxicity guidelines (OECD, 2008).

Doxorubicin (Rubidox, Bergamo, Brazil), diluted in distilled water, was used as a positive control, at a concentration of 2.17mg/mL (0.4mM) (Vasconcelos et al., 2017b), for the clone detection test of ETT in *D. melanogaster*.

Cyclophosphamide (Fosfaseron, Itaca Laboratorios, REG. MS No. 1.2603.0056.002-1; Lot 063020, Brazil), diluted in distilled water, was used as a positive control, at a dose of 100 mg/kg b.w. intraperitoneally (i.p.), for tests with Swiss mice (Oliveira et al., 2023; Correa et al., 2024).

2.3. Experiment I

2.3.1. Survival test and detection of epithelial tumor clones in *D. melanogaster*

The epithelial tumors were evaluated in an alternative model of *D. melanogaster* (fly model).

The mutant lines of *D. melanogaster*: Multiple Wing Hair (mwh/mhw) and wts/TM3 were grown alone (Figure 1). Then, males of the mwh/mhw lineage and virgin females of the wts/TM3 lineage were selected and crossed (Figure 2; Figure 3).

Laying took place in a suitable laying medium (bottles containing a solid agar base (3% agar in water) and a layer of fresh biological yeast and sugar). After 72 ± 4 hours, the flasks were washed with reverse osmosis water and marked trans-heterozygous (wts+/-mwh) and balanced heterozygous (TM3, Sb1 +/- mwh) larvae were obtained using a sieve.

To assess toxicity, the hatch test was performed (Rand, 2014). To this end, 50 larvae were transferred to glass bottles containing 1.5 g of instant mashed potato medium (brand Yoki Alimentos S. A., São Paulo, Brazil), as an alternative culture medium for *Drosophila* (Spano et al., 2001), moistened with 5 mL of different EEGc concentrations (0.96, 1.92, 3.85 and 7.70 mg/mL).

Tween 80 (1%) was used for the negative control and Doxorubicin (2.17mg/mL) for the positive control (Vasconcelos et al., 2017b). At the end of the collection,

the numbers of live and dead larvae were evaluated and described as a percentage. For the dose to be used in the next test, at least 70% of the larvae needed to be alive (Vasconcelos et al., 2017b).



Figure 1. Females and Males of *D. melanogaster* Multiple Wing Hair (*mwh/mwh*) and *wtS/Sb¹* mutant lines.

A second group of bottles, with the same treatments, was prepared for the ETT test and the offspring were awaited to hatch. The descendants carrying the *wtS*+/+*mwh* genotype were separated and identified by the presence of phenotypic wild hair (long and thin). The descendants, which have short and thick hair, belonging to the balanced heterozygous progeny (which have the presence of the balancing gene *TM3, Sb1*) were discarded since they do not have the gene under study.

After the metamorphosis process, adult flies were collected and preserved in bottles containing 70% ethanol. 200 individuals (males and females) of each concentration were analyzed, with genotype (*wtS*+/+), which have normal (long) hair. Short-haired flies (Stubble) were not analyzed, as they do not have the *wtS* gene. The individuals were analyzed in a hollow plate containing glycerin (Glycerol $C_3H_8O_3$) using brushes and a stereoscopic magnifying glass. The presence of tumors was counted in each of the segments (eyes, head, wings, body, legs, dumbbells). In the end, all tumors per individual were added together (Vasconcelos et al., 2017b).

2.4. Experiment 2

2.4.1. Animals and experimental design

Forty male mice (*Mus musculus*) of the Swiss lineage with an average weight of 40g were used. The animals

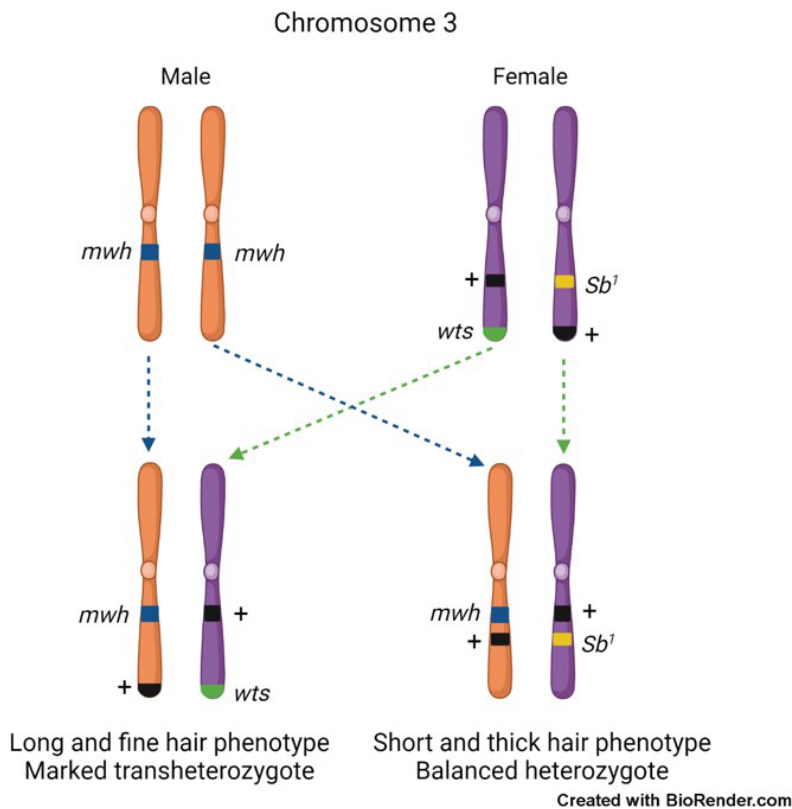


Figure 2. Didactic diagram of the lineage cross between males of the *mwh/mwh* and virgin females of the *wtS/Sb¹*. Chromosome 3 is represented containing the genotypes *mwh/mwh* and *wtS/Sb¹*. + indicates the wild-type allele.

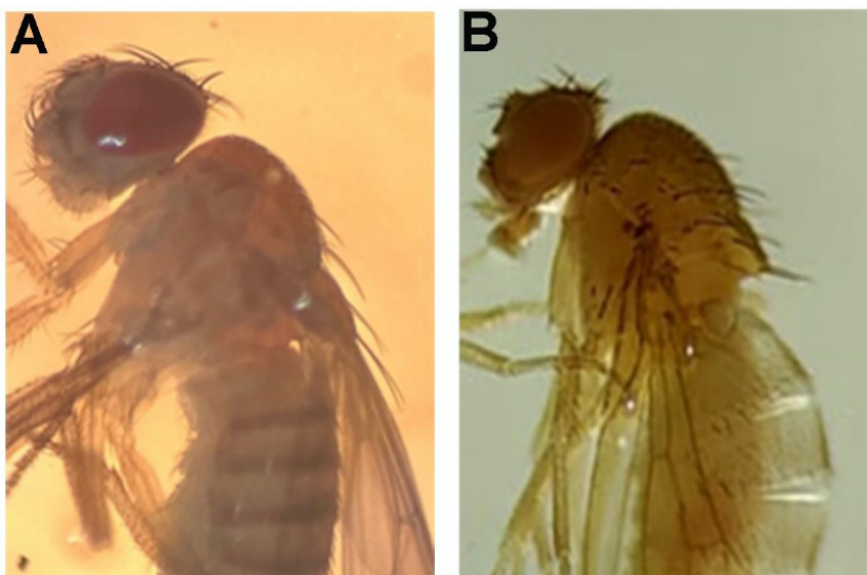


Figure 3. Phenotypic appearance of the descendants of males from the mwh/mhw lineage and virgin females from the wts/Sb¹ lineage. The offspring (males or females) with the long-hair phenotype (A) will present the mwh/wts genotype and those with the short-hair phenotype (B) will present the mwh/Sb¹ genotype.

underwent an adaptation period of 7 days, placed in mini-isolators (Alesco® ventilated rack) lined with shavings from *Pinus* sp. The animals were fed standard commercial food (Nuvital®) and filtered water under a free access system. Lighting was controlled by photoperiod (12h light/12h dark) and temperature maintained at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and humidity at 55 ± 10 .

The research was carried out in accordance with the protocols of the Universal Declaration of Animal Rights and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS) under opinion number 965/2018.

Animals were distributed into 8 experimental groups ($n = 5$): Negative Control Group (CN) – the animals were treated with 0.1mL/10g of body weight (b.w.) of the EEGc vehicle (Tween 80 – 1%) via oral (v.o.) and 0.1mL/10g p.c. the cyclophosphamide vehicle (distilled water) intraperitoneally (i.p.); Positive Control Group (Cyclophosphamide) – the animals were treated with 0.1mL/10g p.c., p.o.) of the EEGc vehicle (Tween 80 – 1%) and 100mg/Kg of Cyclophosphamide (p.c., i.p.); Genotoxicity Groups EEGc100, EEGc1,000 and EEGc2,000 – the animals were treated with 100, 1,000 and 2,000 mg/kg (p.c.; v.o.) of EEGc, respectively + 0.1mL/10g (p.c., i.p.) of the cyclophosphamide vehicle (distilled water); Antigenotoxicity Groups EEGc100+Cycle, EEGc1,000+Cycle and EEGc2,000+Cycle – the animals were treated with 100, 1,000 and 2,000 mg/Kg (p.c.; p.o.) of EEGc, respectively + 100mg/Kg of Cyclophosphamide (p.c., i.p.) (Figure 4).

2.4.2. Biological tests

Peripheral blood samples were collected through puncture of the tail vein, 24, 48 and 72 hours after administration of the test compounds. After 24 hours,

peripheral blood was analyzed using the comet assay. At 24, 48 and 72 hours, peripheral blood was analyzed using the micronucleus technique. After these collections, the animals were euthanized by cervical dislocation followed by laparotomy for collection, weighing and macroscopic analysis of the organs (heart, lung, spleen, liver and kidneys). The spleen was used for evaluation of splenic phagocytosis after weighing. The biometric parameters were composed of the initial weight, final weight and absolute and relative weight of the organs.

2.4.2.1. Comet assay

The comet assay was performed according to Singh et al. (1988) and evaluated according to Kobayashi (1995). Twenty microliters of peripheral blood (20μL) were homogenized in 120μL of LPM agarose (0.5%). The mixture was then deposited on slides pre-covered with common agarose (5%). The slides were covered with a glass coverslip and cooled to 4°C for 20 minutes. Then, after removing the coverslips, the slides were immersed in a lysis solution (89.0mL of lysis stock – 2.5M NaCl, 100.0mM EDTA, 10.0mM Tris, pH 10.0 corrected with solid NaOH; 1.0mL of Triton X-100 and 10.0mL of DMSO).

Lysis occurred for 1 hour at 4°C in a dark place. Then, the slides were placed in the electrophoresis vat and immersed in a buffer with pH >13.0 (300.0mM NaOH and 1.0mM EDTA) and DNA denaturation occurred for a period of 20 minutes at 4°C under the shelter from the light. Then, electrophoresis was performed at 25.0V and 300.0mA (1.25v/cm) for 20min. The slides were neutralized with buffer at pH 7.5 (0.4M Tris-HCl) for 3 cycles of 5 minutes each and left to air dry. Then, the slides were fixed with absolute ethyl alcohol for 10 minutes.

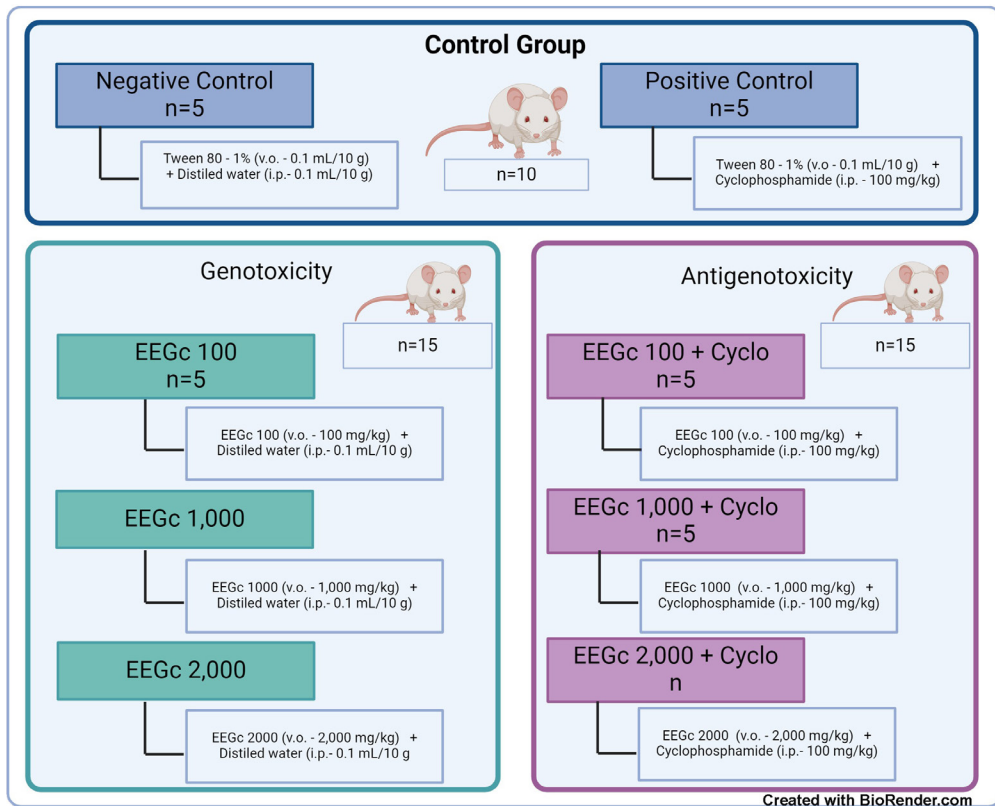


Figure 4. Mice experimental groups design: Negative Control Group – 0.1mL/10g body weight (b.w.) of the EEGc vehicle (Tween 80 – 1%) orally (p.o.) and 0.1mL/10g p.c. the cyclophosphamide vehicle (distilled water) intraperitoneally (i.p.); Positive Control Group – Cyclophosphamide (Cyclo) – 0.1mL/10g of Tween 80 (1%) (p.c., p.o.) and 100mg/Kg of Cyclophosphamide (p.c., i.p.); Genotoxicity Groups EEGc100, EEGc1,000 and EEGc2,000 – 100, 1,000 and 2,000 mg/Kg (p.c.; v.o.) of EEGc, respectively + 0.1mL/10g of distilled water (p.c., i.p.); Antigenotoxicity Groups EEGc100+Cyclo, EEGc1,000+Cyclo and EEGc2,000+Cyclo – 100, 1,000 and 2,000 mg/Kg (p.c.; p.o.) of EEGc, respectively + 100mg/Kg of Cyclophosphamide (p.c., i.p.).

They were then stained with 100µL of ethidium bromide (20x10–3mg/mL). The slides were analyzed under an epifluorescence microscope (Bioval®) at 40x magnification, with a 420–490nm excitation filter and a 520nm barrier filter. 200 cells/animal were analyzed and classified into: class 0 – undamaged nucleoids that do not have a tail; class 1 – nucleoids with a tail smaller than the diameter of the nucleoid; class 2 – nucleoids with tails measuring between 1 and 2 times the diameter of the nucleoid; class 3 – nucleoids with a tail twice the diameter of the nucleoid (Kobayashi, 1995). Nucleoids from apoptotic cells, which are completely fragmented, are generally not counted (Speit et al., 1996).

2.4.2.2. Micronucleus assay in peripheral blood

Samples of 20µl of peripheral blood were deposited on a slide previously prepared with 20µl of Acridine Orange (1.0mg/ml) and covered with a coverslip. The slides were stored in a –20°C freezer for at least 15 days. 2,000 cells/animal were analyzed under an epifluorescence microscope (Motic®; Model BA 410), with a 420–490nm excitation filter and 520nm barrier filter, at 400x magnification, as described by Hayashi et al. (1990), modified by Oliveira et al. (2009).

2.4.2.3. Splenic phagocytosis Assessment

The splenic phagocytosis test was performed by macerating 1/3 of the spleen in physiological solution using a Pasteur pipette. After successive aspirations, one hundred microliters of the cell suspension were placed on a slide previously stained with Acridine Orange (1 mg/mL). The slide was then covered with a coverslip and stored in a freezer for at least 15 days, until further analysis under a fluorescence microscope with a 420–490nm excitation filter and 520nm barrier filter, and 400x magnification. 200 cells/animal were analyzed. The assessment of the presence or absence of phagocytosis was performed as established by Hayashi et al. (1992) and modified by Carvalho et al. (2015).

2.5. Damage reduction percentage (RD%) calculation

Damage reduction percentages for the comet and micronucleus assays were scored according to Manoharan and Banerjee (1985) and Waters et al. (1990).

$$RD\% = \left[\frac{\text{Positivecontrolmean} - \text{Associatedgroupmean}}{\text{Positivecontrolmean} - \text{Negativecontrolmean}} \right] \times 100 \quad (1)$$

2.6. Statistical analysis

In order to evaluate the results of the epithelial tumor test in *D. melanogaster*, the non-parametric Mann–Whitney U test was used. In tests with mice, parametric data were analyzed by ANOVA/Tukey. Data were presented as mean ± standard deviation and the significance level established was $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Experiment I – Survival, estimation of somatic cell damage and tumor frequency in *D. melanogaster*

The survival test demonstrated that only the highest concentration of EEGc (7.70mg/mL) reduced ($p < 0.05$) the survival rate of *D. melanogaster* larvae. However, all concentrations tested showed survival greater than 80% (Figure 5) and, therefore, were maintained for the subsequent test since the minimum acceptable survival is 70% (Vasconcelos et al., 2017b).

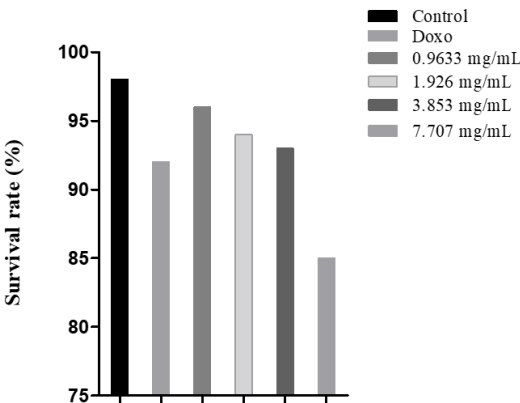


Figure 5. Survival rate of larvae treated with EEGc at concentrations of 0.96, 1.92, 3.85 and 7.70 mg/mL. Tween 80 (1%) was used for the negative control and doxorubicin for the positive control with the concentration of (2.17mg/mL).

ETT demonstrated that Doxorubicin increased ($p < 0.05$) the frequency of tumor clones by 19.14x, proving its carcinogenic effect. The EEGc did not show a carcinogenic effect ($p > 0.05$). Even the lowest concentration tested (0.96mg/mL) reduced ($p < 0.05$) the basal frequency of tumors observed in the negative control (Table 1).

3.2. Experiment II – Genotoxic and antigenotoxic evaluation in mice

The evaluation of biometric parameters demonstrated that the initial weight, final weight and relative and absolute weight of the heart, lung, liver, kidneys and spleen were similar ($p > 0.05$) between the different experimental groups (Figure 6).

Assessment of genomic damage, using the comet assay, demonstrated that cyclophosphamide was genotoxic and increased ($p < 0.05$) the frequency of DNA damage by 12.04x. Isolated EEGc was not genotoxic ($p > 0.05$) at the two lowest doses. However, the highest dose (EEGc2000) was genotoxic and increased ($p < 0.05$) the frequency of genomic lesions by 5.37x. The EEGc associated with cyclophosphamide was antigenotoxic ($p < 0.05$) for all doses tested and the percentages of damage reduction were 63.23, 49.91 and 33.39% for doses of 100, 1,000 and 2,000mg /Kg, respectively (Table 2).

The evaluation of chromosomal damage, using the micronucleus assay, demonstrated that cyclophosphamide is genotoxic and increased ($p < 0.05$) the frequency of chromosomal damage by 3.59x, 3.13x and 2.87x at times 24, 48h and 72h. Isolated EEGc was not genotoxic ($p > 0.05$) at any of the doses and at any of the times analyzed. However, the three doses were antigenotoxic ($p < 0.05$) at 24 and 48h. The percentages of damage reduction were 64.42, 77.19 and 52.63% in 24h and 71.43, 63.26 and 40.82% for 48h in doses of 100, 1,000 and 2,000mg/Kg, respectively. Within 72 hours, EEGc was not antigenotoxic ($p > 0.05$) and the percentages of damage reduction were 20.00, 36.67 and 63.33% for doses of 100, 1,000 and 2,000mg/Kg, respectively (Table 3).

The splenic phagocytosis assay demonstrated that none of the treatments (cyclophosphamide alone, EEGc alone and EEGc associated with cyclophosphamide) induced phagocytic activation ($p > 0.05$) (Figure 7).

Table 1. Frequency of tumor clones observed in *D. melanogaster*, heterozygous for the *wt*s tumor suppressor gene, treated with different concentrations of the EEGc.

Treatment EEGc	Total Flies	Number of tumors							Frequency
		Eye	Head	Wing	Body	Leg	Halter	Total	
NC	200	0	0	6	5	3	0	14	0,07
Doxo	200	0	3	186	21	58	1	269	1.34*
0.96	200	0	0	6	0	0	0	6	0.03*
1.92	200	0	0	7	2	4	0	13	0.06
3.85	200	0	3	5	5	3	0	16	0.08
7.70	200	0	3	8	6	5	0	22	0.11

Caption: EEGc – Ethanolic extract of *G. cellosioides*. NC – Negative control – Tween 80 (1%); Doxo - Positive Control – Doxorubicin (2.17mg/mL). Frequency – Amount of tumors / number of flies analyzed; *Indicates a statistically significant difference in relation to the negative control group. Statistical test: Mann Whitney ($p < 0.05$).

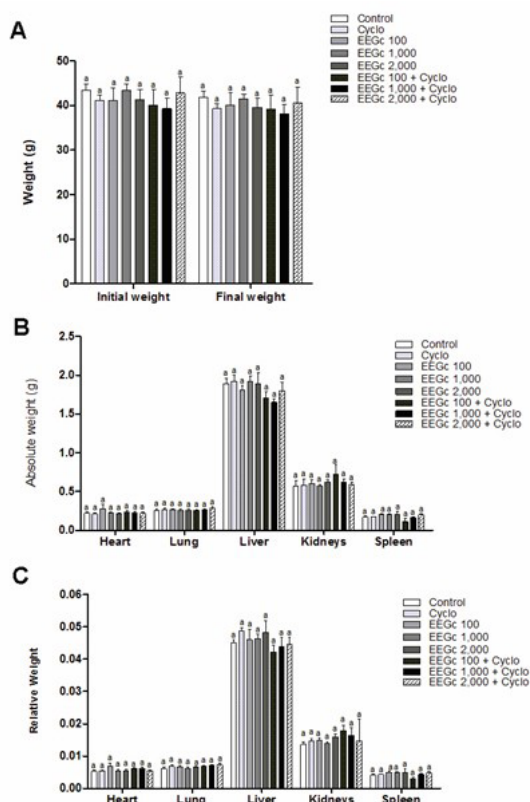


Figure 6. Mean values $\pm$ standard deviation of biometric parameters of animals treated with EEGc alone or in association with cyclophosphamide. A – Initial weight and final weight; B – Absolute weight of the organs; C – Relative weight of the organs. Negative Control Group (Control) – 0.1mL/10g of body weight (b.w.) of the EEGc vehicle (Tween 80 – 1%) orally (p.o.) and 0.1mL/10g p.c. the cyclophosphamide vehicle (distilled water) intraperitoneally (i.p.); Positive Control Group (Cyclo) – 0.1mL/10g of Tween 80 (1%) (p.c., p.o.) and 100mg/Kg of Cyclophosphamide (p.c., i.p.); Genotoxicity Groups EEGc100, EEGc1,000 and EEGc 2,000 – 100, 1,000 and 2,000 mg/Kg (p.c.; v.o.) of EEGc, respectively + 0.1mL/10g of distilled water (p.c., i.p.); Antigenotoxicity Groups EEGc100+Cyclo, EEGc1,000+Cyclo and EEGc2,000+Cyclo – 100, 1,000 and 2,000 mg/Kg (p.c.; p.o.) of EEGc, respectively + 100mg/Kg of Cyclophosphamide (p.c., i.p.). Statistical test: ANOVA/Tukey. Different letters above the bar indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

4. Discussion

This study is pioneering in demonstrating that EEGc is not carcinogenic in *D. melanogaster* and has a chemopreventive effect on DNA damage induced by cyclophosphamide in Swiss mice. Furthermore, *G. celosioides* has already been described with low antitumor effect in vitro. The EEGc presented IC₅₀ above 1,000 μ g/mL in cells of the KKU-100 (JCRB 1568) and KKU-213 (JCRB 1557) lineages (Promraksa et al., 2019) and above 250 μ g/mL for ethanolic and aqueous extracts in HepG2 cells (Chassagne et al., 2017). Additionally, the literature described that EEGc was not genotoxic in pregnant female Swiss mice (Salustriano et al., 2022).

The present study showed that EEGc has the potential to significantly reduce the survival of *D. melanogaster* larvae

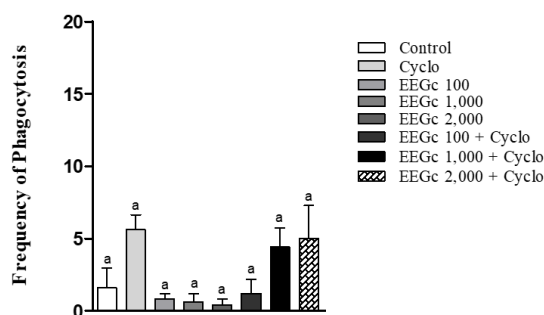


Figure 7. Mean values $\pm$ standard deviation of the frequency of cells with phagocytosis in the spleen of animals treated with EEGc alone or in association with cyclophosphamide. Negative Control Group (Control) – 0.1mL/10g of body weight (b.w.) of the EEGc vehicle (Tween 80 – 1%) orally (p.o.) and 0.1mL/10g p.c. the cyclophosphamide vehicle (distilled water) intraperitoneally (i.p.); Positive Control Group (Cyclo) – 0.1mL/10g of Tween 80 (1%) (p.c., p.o.) and 100mg/Kg of Cyclophosphamide (p.c., i.p.); Genotoxicity Groups EEGc100, EEGc1,000 and EEGc2,000 – 100, 1,000 and 2,000 mg/Kg (p.c.; v.o.) of EEGc, respectively + 0.1mL/10g of distilled water (p.c., i.p.); Antigenotoxicity Groups EEGc100+Cyclo, EEGc1,000+Cyclo and EEGc2000+Cyclo – 100, 1,000 and 2,000 mg/Kg (p.c.; p.o.) of EEGc, respectively + 100mg/Kg of Cyclophosphamide (p.c., i.p.). Statistical test: ANOVA/Tukey. Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$). Statistical test: ANOVA/Tukey. Different letters above the bar indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

at concentrations equal to or greater than 7.70 mg/mL. However, all doses evaluated in the survival test were used for the ETT because larval survival was greater than 70% and this indicated that the concentrations tested did not affect larval development to the point of compromising the development of subsequent tests. The literature describes that survival of at least 70% of larvae is ideal for choosing doses that can be used in the ETT. Therefore, a mortality rate above 30% can compromise subsequent tests by not reaching the minimum number of adult individuals required for analyzes (Demir et al., 2013; Orsolin et al., 2015).

At ETT, it was observed that the lowest concentration of EEGc (0.96mg/mL) was able to significantly reduce the basal frequency of epithelial tumors in *D. melanogaster*. This effect suggests that the extract may have antitumor potential. However, its effect would possibly not be in the treatment of cancer since the chemotherapy effect, simulated in culture tests with cholangiocarcinoma cell lines (KKU-100 and KKU-213), has already refuted this hypothesis (Chassagne et al., 2017; Promraksa et al., 2019). Thus, it is inferred that its effect may be correlated with the prevention of DNA lesions that can predispose the individual to the development of cancer and, consequently, it would also have an effect on reducing the occurrence of this disease.

It is also noteworthy that the other EEGc concentrations (1.92 and 3.85mg/mL), including the concentration that significantly reduced larval survival (7.70mg/mL) do not have a carcinogenic effect in the alternative ETT model in *D. melanogaster*. This result allows us to infer safety of use since there is correspondence between the results obtained in the

Table 2. Mean values ± standard deviation of the frequency of cells with DNA damage, distribution of cells by damage classes, score and percentage of DNA damage reduction in animals treated with the EEGc alone or in combination with cyclophosphamide (Cyclo).

Experimental Groups	Cells with DNA damage	Classes				Score	%RD
		0	1	2	3		
Control	10.20±2.03 ^a	189.80±2.03	10.20±2.03	0.00±0.00	0.00±0.00	10.20±2.03 ^a	
Cyclo	122.80±8.31 ^d	76.20±9.24	112.80±8.01	10±1.58	0.00±0.00	132.80±8.88 ^d	
Genotoxicity							
EEGc 100	35.80±3.63 ^{a,b}	164.20±3.62	35.80±3.62	0.00±0.00	0.00±0.00	35.80±3.62 ^{a,b}	
EEGc 1,000	39.60±5.84 ^{a,b}	160.40±5.84	39.60±5.84	0.00±0.00	0.00±0.00	39.60±5.84 ^{a,b}	
EEGc 2,000	54.80±6.96 ^{b,c}	145.20±6.96	54.80±6.96	0.00±0.00	0.00±0.00	54.80±6.96 ^{b,c}	
Antigenotoxicity							
EEGc 100 + Cyclo	51.60±12.63 ^{b,c}	148.80±12.41	50.80±12.18	0.40±0.24	0.00±0.00	51.60±12.63 ^{b,c}	63.23%
EEGc 1,000 + Cyclo	66.60±9.82 ^{b,c}	133.40±9.82	66.60±9.82	0.00±0.00	0.00±0.00	66.60±9.82 ^{b,c}	49.91%
EEGc 2,000 + Cyclo	85.20±3.37 ^c	112.80±4.49	84.60±2.98	0.60±0.40	0.00±0.00	85.80±3.76 ^c	33.39%

Legend: Negative Control Group (Control) – 0.1mL/10g body weight (b.w.) of the EEGc vehicle (Tween 80 – 1%) orally (p.o.) and 0.1mL/10g p.c. the cyclophosphamide vehicle (distilled water) intraperitoneally (i.p.); Positive Control Group (Cyclo) – 0.1mL/10g of Tween 80 (1%) (p.c., p.o.) and 100mg/Kg of Cyclophosphamide (p.c., i.p.); Genotoxicity Groups EEGc100, EEGc1,000 and EEGc2,000 – 100, 1,000 and 2,000 mg/Kg (p.c.; v.o.) of EEGc, respectively + 0.1mL/10g of distilled water (p.c., i.p.); Antigenotoxicity Groups EEGc100+Cyclo, EEGc1,000+Cyclo and EEGc2,000+Cyclo – 100, 1,000 and 2,000 mg/Kg (p.c.; p.o.) of EEGc, respectively + 100mg/Kg of Cyclophosphamide (p.c., i.p.). Statistical test: ANOVA/Tukey. Different letters indicate statistically significant differences (p<0.05). %RD – Percentage of DNA Damage Reduction. Statistical test: ANOVA/Tukey. Different letters indicate statistically significant differences (p<0.05).

Table 3. Mean values ± standard deviation of the frequency of micronuclei and percentage of reduction in DNA damage in animals treated with the EEGc alone or associated with cyclophosphamide (Cyclo).

Experimental Groups	Micronuclei Frequency			%DR		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Control	4.40±0.75 ^{a,b}	4.60±1.03 ^{a,b}	3.20±0.37 ^{a,b}			
Cyclo	15.80±0.66 ^d	14.40±0.93 ^d	9.20±1.16 ^c			
Genotoxicidade						
EEGc 100	2.80±0.66 ^a	6.40±0.81 ^{a,b,c}	2.80±0.37 ^a			
EEGc 1,000	4.80±0.92 ^{a,b}	4.00±1.30 ^{a,b}	4.40±0.75 ^{a,b,c}			
EEGc 2,000	4.40±1.03 ^{a,b}	3.60±0.81 ^a	7.20±1.32 ^{a,b,c}			
Antigenotoxicidade						
EEGc 100 + Cyclo	8.00±0.89 ^{b,c}	7.40±0.93 ^{a,b,c}	8.00±2.07 ^{b,c}	68.42%	71.43%	20.00%
EEGc 1,000 + Cyclo	7.00±1.67 ^{a,b,c}	8.20±1.07 ^{b,c}	7.00±0.84 ^{a,b,c}	77.19%	63.26%	36.67%
EEGc 2,000 + Cyclo	9.80±0.86 ^c	10.40±1.03 ^{c,d}	5.40±0.51 ^{a,b,c}	52.63%	40.82%	63.33%

Legend: Control Group (Control) – 0.1mL/10g body weight (b.w.) of the EEGc vehicle (Tween 80 – 1%) orally (p.o.) and 0.1mL/10g p.c. the cyclophosphamide vehicle (distilled water) intraperitoneally (i.p.); Positive Control Group (Cyclo) – 0.1mL/10g of Tween 80 (1%) (p.c., p.o.) and 100mg/Kg of Cyclophosphamide (p.c., i.p.); Genotoxicity Groups EEGc100, EEGc1,000 and EEGc2,000 – 100, 1,000 and 2,000 mg/Kg (p.c.; v.o.) of EEGc, respectively + 0.1mL/10g of distilled water (p.c., i.p.); Antigenotoxicity Groups EEGc100+Cyclo, EEGc1,000+Cyclo and EEGc2,000+Cyclo – 100, 1,000 and 2,000 mg/Kg (p.c.; p.o.) of EEGc, respectively + 100mg/Kg of Cyclophosphamide (p.c., i.p.). Statistical test: ANOVA/Tukey. Different letters indicate statistically significant differences (p<0.05). %RD – Percentage of DNA Damage Reduction. Statistical test: ANOVA/Tukey. Different letters indicate statistically significant differences (p<0.05).

models in *D. melanogaster* and those obtained in mammals (Eeken et al., 2002; Nepomuceno, 2015). The correspondence may be attributed due to the evolutionary conservation of tumor suppressor genes between *D. melanogaster* and mammals (Eeken et al., 2002). Furthermore, more than 50 genes have been mapped and characterized as tumor suppressor genes in *D. melanogaster*. Eight of them have

a function in the embryonic development of the fly, 12 in brain development, 19 are expressed in cells of the imaginal discs, 25 in hematopoietic development and 10 in adult gonads (Justice et al., 1995) and among these genes, the most important wts (Nishiyama et al., 1999). It is also noteworthy that *D. melanogaster* has an enzyme system similar to that of mammals (Graf and Van Schaik, 1992).

These facts impelled the study to be continued. But no longer in the alternative model of *D. melanogaster* but in an animal model that more closely resembles humans and the model chosen was Swiss mice. The results with mice suggest that EEGc is not toxic since classic clinical signs of intoxication were not observed such as diarrhea, tremors, excessive salivation, convulsions, hypoactivity, ataxia, lethargy, tail curvature, hair standing on end, opacity of the eyes and mucous membranes, and/or reduction in food and water consumption, among others (OECD, 2008; Corso et al., 2019; Nunes et al., 2023; Rezende et al., 2023; Correa et al., 2024). This fact is confirmed by the absence of significant variations in weights at the beginning and end of the experiment. Since weight reduction is understood as an important indicator of toxicity (Upadhyay et al., 2019; Salustriano et al., 2022; Neves et al., 2023, 2024; Nunes et al., 2023; Oliveira et al., 2023; Ortiz et al., 2023; Rezende et al., 2023; Correa et al., 2024) as well as variations in the absolute and relative weights of organs (Oliveira et al., 2018a; Oliveira et al., 2018b).

Besides, it is noteworthy that the literature has already reported that acute toxicity for EEGc is greater than 2,000mg/Kg in Wistar rats for both sexes (males and females) (Macorini et al., 2022). This study even used the same extract used by us. It is also remarkable that this extract was classified in Category 5, according to the Globally Harmonized System, which is the least toxic or non-toxic (OECD, 2008; Macorini et al., 2022). In relation to the aqueous extract of *G. celosioides*, it was found that the acute toxicity is greater than 4000 mg/kg (Konan et al., 2014). Regarding subacute toxicity, the literature states that doses 75, 150 and 300mg/Kg, administered repeatedly over 28 days, have low toxicological potential in male and female Swiss mice (Macorini et al., 2022). These results support the findings of this study.

Complementary data to acute and subacute toxicity, which can corroborate the safety of use, are genotoxicity studies. Thus, this study suggests, in a pioneering way, that EEGc can cause DNA lesions, at the genomic level (assessed by the comet assay), at a dose equal to or greater than 2,000mg/Kg since this dose caused a 5.37x increase in frequency of damage observed in the control group. It is also noteworthy that the lowest doses showed a tendency to increase the frequency of injuries by 3.51x and 3.88x for doses of 100 and 1,000mg/Kg, respectively.

These results reveal a dose response curve, when an increase in dose generates an increase in the frequency of genomic lesions. At first, this data requires attention. However, when evaluating the frequency of chromosomal damage, it was found that EEGc was not genotoxic, that is, none of the doses tested increased the frequency of micronuclei. These data suggest that genomic damage (assessed by the comet test) was not fixed in the cellular genome in the form of chromosomal damage (assessed by the micronucleus test) indicating the absence of genotoxicity. This fact was corroborated by the absence of splenic phagocytosis observed for all experimental groups.

Previously, our research group had already reported that this EEGc did not cause chromosomal damage and did not activate splenic phagocytosis in treatments with these same doses, for up to 18 consecutive days, in pregnant

female Swiss mice (Salustriano et al., 2022). These facts reinforce the safety of using EEGc as this extract did not present acute toxicity and has a low potential for subacute toxicity (Macorini et al., 2022), did not present genotoxicity in pregnant females and did not activate splenic phagocytosis (Salustriano et al., 2022) and the genomic damage observed in this study was not fixed in the cellular genome as indicated by our micronucleus assay results.

Genomic damage can be repaired (Fernández-Bertólez et al., 2022) and, therefore, may not be fixed in the cellular genome, causing less damage to the organism (Navarro et al., 2014; Oliveira et al., 2015; Correa et al., 2024). It is assumed that this fact, already reported in the literature, also occurred in this study. Furthermore, it is known that one of the main functions of the spleen is to promote blood filtration by removing damaged cells from it, including those with DNA damage, micronucleated cells, for example; senescent cells; and intraerythrocytic inclusions.

Thus, the study by Hayashi et al. (1990) served as the basis for more recent researches that use this methodology to measure the phagocytic activity of the spleen in response to genotoxic or antigenotoxic action (Navarro et al. 2014; Oliveira et al., 2015, 2018a, b, 2019, 2023; Berno et al., 2016; Schneider et al., 2016; Araujo et al., 2017; Ishikawa et al., 2017; Navarro et al., 2018; Ishikawa et al., 2018; Salustriano et al., 2022; Neves et al., 2023; Rezende et al., 2023; Correa et al., 2024; Neves et al., 2024). Therefore, as the spleen is involved in immunomodulation processes and phagocytosis is effective in sequestering anucleated or micronucleated cells, this action can mask the genotoxic effects of a substance or extract. Thus, the combination of genotoxicity and splenic phagocytosis methodologies strengthens the hypotheses tested by providing more robust data (Carvalho et al. 2015) and thus we can infer that EEGc is not genotoxic.

Another unprecedented finding from this study is the antigenotoxic effect of EEGc. Until now, the literature consulted did not indicate the chemopreventive effect of this extract. EEGc was able to reduce genomic damage (assessed by the comet) by up to 63.23%, with the lowest dose being the most effective (100mg/Kg). They were also efficient in preventing chromosomal damage (assessed by the micronucleus assay) by up to 77.19%, with the intermediate dose, in the 24-hour assessment, being the most efficient. For the antigenotoxicity data, the dose response pattern was not established.

The antigenotoxic and/or chemopreventive effect is the ability of a product to reduce the frequency of DNA damage. This effect can be due to desmutagenesis when, in short, one compound binds to another, preventing the genotoxic/mutagenic effect through an adsorption process, for example; or by bioantimutagenesis. In this other case, after damage occurs, the compound modulates the body's enzymes in an attempt to favor the correction of the genotoxic/mutagenic damage. Therefore, enzymes act as modulators of repair and replication (Kada and Shimoi, 1987; De Flora, 1998; Oliveira et al., 2006, 2007, 2009, 2013, 2014; Mantovani et al., 2008; Fedel-Miyasato et al., 2014a, b; Diab and Aboul-Ela, 2012; Rocha et al., 2016).

The daily use of antigenotoxic compounds could be a good cancer prevention strategy and the daily use of antigenotoxic compounds is called chemoprevention (Gomes et al., 1996; Surh et al., 1996; ALaqeel, 2024; Mughal et al., 2024; Dyshlyuk et al., 2024). For a long time, the literature has recorded an inversely proportional association between the consumption of fruits and vegetables and the development of cancer (Flagg et al., 1995; Weisburger, 1999, 2000; Zhang et al., 1999; Ferrari, 2001; Ferrari and Torres, 2002) and this fact encourages the need to eat adequately using natural and antigenotoxic products (Amaral et al., 2021).

Classical literature also records that the main natural inhibitors of carcinogenesis/genotoxicity are represented by antioxidants that are free radical blockers and also by cell death inducers, enzyme inhibitors, angiogenesis inhibitors, growth factor antagonists, hormones and injury repairers. of DNA (Kleiner, 1997; Kellof et al., 1999)

According to Salvador et al. (2012) in the genus *Gomphrena*, steroids, terpenoids, ecdysteroids, flavonoids, aurantiamide and protoalkaloids were isolated. According to Vasconcelos et al. (2017a), the aerial parts of *G. celosioides* are rich in malic acid, caffeic acid, ferulic acid, vanillic acid, catechin, Irisone B, Dimethoxy-flavone and caffeoyl-glucose. Thus, the presence of phenolic acids and flavonoids is verified, in the genus and species, and these chemical compounds can act as antioxidants.

Antioxidants, in general, act to protect against the formation of DNA-damaging substances and to intercept free radicals (which, once formed, begin their DNA-damaging activities) (Kong; Lillehei, 1998; Santos; Cruz, 2001; ALaqeel, 2024). Thus, the antigenotoxic and/or chemopreventive effect of EEGc can be attributed to its constituents.

In light of the above, it is considered that EEGc is safe to use and has a low genotoxic potential, as genomic damage is not fixed in the form of chromosomal damage in the cellular genome. Furthermore, EEGc showed a chemopreventive effect, which suggests therapeutic applicability in the prevention of DNA lesions that can increase the predisposition to cancer.

Acknowledgements

The authors are grateful to Prof. Dr. Josafá Carlos de Siqueira for plant material identification, to Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende for consulting on the Epithelial Tumor Test to FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Grant process: 21/09693-5), to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Process: 306603/2022-5, and 427859/2018-2), to FAEPEX-UNICAMP, to FUNDECT (Fundação de Apoio ao desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul) and to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for financial support and scholarships.

References

ALAQEEL, N.K., 2024. Antioxidants from different citrus peels provide protection against cancer. *Brazilian Journal of Biology*

= *Revista Brasileira de Biologia*, vol. 84, pp. e271619. <http://doi.org/10.1590/1519-6984.271619>.

AMARAL, L.A., DA SILVA FLEMING DE ALMEIDA, T., OLIVEIRA DE SOUZA, G.H., BARANOSKI, A., SOUZA MARIS, R., BITTENCOURT JUNIOR, F.F., MURINO RAFACHO, B.P., DUENHAS MONREAL, A.C., LEITE KASSUYA, C.A., MILAN BROCHADO ANTONIOLLI-SILVA, A.C., FREITAS DOS SANTOS, E. and OLIVEIRA, R.J., 2021. The use of natural fiber-rich food product is safe and reduces aberrant crypt foci in a pre-clinical model. *Nutrients*, vol. 13, no. 8, pp. 2708. <http://doi.org/10.3390/nu13082708>. PMID:34444868.

ARAÚJO, F.H.S.D., FIGUEIREDO, D.R.D., AUHAREK, S.A., PESARINI, J.R., MEZA, A., GOMES, R.D.S., MONREAL, A.C.D., ANTONIOLLI-SILVA, A.C.M.B., LIMA, D.P., KASSUYA, C.A.L., BEATRIZ, A. and OLIVEIRA, R.J., 2017. In vivo chemotherapeutic insight of a novel isocoumarin (3-hexyl-5, 7-dimethoxy-isochromen-1-one): Genotoxicity, cell death induction, leukometry and phagocytic evaluation. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 40, no. 3, pp. 665-675. <http://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0316>. PMID:28898353.

BERNO, C.R., RÔS, B.T., DA SILVEIRA, I.O., COELHO, H.R., ANTONIOLLI, A.C., BEATRIZ, A., DE LIMA, D.P., MONREAL, A.C., SOUSA, F.G., DA SILVA GOMES, R. and OLIVEIRA, R.J., 2016. 4-Aminoantipyrine reduces toxic and genotoxic effects of doxorubicin, cisplatin, and cyclophosphamide in male mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 805, pp. 19-24. <http://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.05.009>. PMID:27402479.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2020 [viewed 7 July 2019]. *Guia Para a Condução de Estudos não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos* [online]. Brasília: ANVISA. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/pesquisa-clinica/manuais-e-guias/guia-para-a-conducao-de-estudos-nao-clinicos-de-toxicologia-e-seguranca-farmacologica-necessarios-ao-desenvolvimento-de-medicamentos-versao-2.pdf/view>.

CARVALHO, P.C., SANTOS, E.A., SCHNEIDER, B.U.C., MATUO, R., PESARINI, J.R., CUNHA-LAURA, A.L., MONREAL, A.C., LIMA, D.P., ANTONIOLLI, A.C. and OLIVEIRA, R.J., 2015. Diaryl sulfide analogs of combretastatin A-4: Toxicogenetic, immunomodulatory and apoptotic evaluations and prospects for use as a new chemotherapeutic drug. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 40, no. 3, pp. 715-721. <http://doi.org/10.1016/j.etap.2015.08.028>. PMID:26410090.

CHASSAGNE, F., DEHARO, E., PUNLEY, H. and BOURDY, G., 2017. Treatment and management of liver diseases by Khmer traditional healers practicing in Phnom Penh area, Cambodia. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 202, pp. 38-53. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.002>. PMID:28284791.

CORREA, W.A., DAS NEVES, S.C., OLIVEIRA, R.J., KASSUYA, C.A., NAVARRO, S.D., FAUSTINO MARTINS, A.C., SAROJA, B., MITSUYASU, B., OSTACIANA MAIA FREITAS DA SILVEIRA, I., VITOR, N., COELHO, H.R.S., VILELA, M.L.B., DO NASCIMENTO, V.A., DE LIMA, D.P., BEATRIZ, A. and DA SILVA GOMES, R., 2024. Chemotherapeutic Mechanism of Action of the Synthetic Resorcinolic Methyl 3, 5-dimethoxy-2-octanoylbenzoate. *Chemical Research in Toxicology*, vol. 37, no. 2, pp. 259-273. <http://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.3c00269>. PMID:38183658.

CORSO, C.R., STIPP, M.C., ADAMI, E.R., DA SILVA, L.M., MARIOTT, M., DE ANDRADE, S.F., DE SOUZA RAMOS, E.A., KLASSEN, G., BELTRAME, O.C., QUEIROZ-TELLES, J.E., DE OLIVEIRA, C.S., STEFANELLO, M.É.A. and ACCO, A., 2019. *Salvia lachnostachys* Benth has antitumor and chemopreventive effects against solid Ehrlich carcinoma. *Molecular Biology Reports*, vol. 46, no. 5, pp. 4827-4841. <http://doi.org/10.1007/s11033-019-04931-3>. PMID:31270760.

DE FLORA, S., 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*, vol. 402, no. 1-2, pp. 151-158. [http://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00292-3](http://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00292-3). PMID:9675264.

- DEMIR, E., TURNA, F., KAYA, B., CREUS, A. and MARCOS, R., 2013. Mutagenic/recombinogenic effects of four lipid peroxidation products in *Drosophila*. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 53, pp. 221–227. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.053>. PMID:23238235.
- DIAB, K.A.S. and ABOUL-ELA, E., 2012. In vivo comparative studies on antigenotoxicity of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) pits extract against DNA damage induced by N-Nitroso-N-methylurea in mice. *Toxicology International*, vol. 19, no. 3, pp. 279–286. <http://doi.org/10.4103/0971-6580.103669>. PMID:23293467.
- DYSHLYUK, L.S., FOTINA, N.V., MILENTYEVA, I.S., IVANOVA, S.A., IZGARYSHEVA, N.V. and GOLUBTSOVA, Y.V., 2024. Antimicrobial and antioxidant activity of Panax ginseng and Hedysarum neglectum root crop extracts. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 84, pp. e256944. <http://doi.org/10.1590/1519-6984.256944>. PMID:35293535.
- EKEN, J.C., KLING, I., VAN VEEN, B.L., PASTINK, A. and FERRO, W., 2002. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene *wts*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 40, no. 4, pp. 277–282. <http://doi.org/10.1002/em.10119>. PMID:12489118.
- FANK-DE-CARVALHO, S.M. and GRACIANO-RIBEIRO, D., 2005. Arquitetura, anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborescens* Lf (Amaranthaceae). *Acta Botanica Brasileira*, vol. 19, no. 2, pp. 377–390. <http://doi.org/10.1590/S0102-33062005000200021>.
- FEDER-MIYASATO, L.E.S., KASSUYA, C.A.L., AUHAREK, S.A., FORMAGIO, A.S.N., CARDOSO, C.A.L., MAURO, M.O., CUNHA-LAURA, A.L., MONREAL, A.C.D., VIEIRA, M.C. and OLIVEIRA, R.J., 2014a. Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 24, no. 5, pp. 565–575. <http://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.08.004>.
- FEDER-MIYASATO, L.E.S., FORMAGIO, A.S.N., AUHAREK, S.A., KASSUYA, C.A.L., NAVARRO, S.D., CUNHA-LAURA, A.L., MONREAL, A.C., VIEIRA, M.C. and OLIVEIRA, R.J., 2014b. Antigenotoxic and antimutagenic effects of *Schinus terebinthifolius* Raddi in *Allium cepa* and Swiss mice: a comparative study. *Genetics and Molecular Research*, vol. 13, no. 2, pp. 3411–3425. <http://doi.org/10.4238/2014.April.30.2>. PMID:24841786.
- FERNÁNDEZ-BERTÓLEZ, N., LEMA-ARRANZ, C., FRAGA, S., TEIXEIRA, J.P., PÁSARO, E., LORENZO-LÓPEZ, L., VALDIGLESIAS, V. and LAFFON, B., 2022. Suitability of salivary leucocytes to assess DNA repair ability in human biomonitoring studies by the challenge-comet assay. *Chemosphere*, vol. 307, no. Pt 4, pp. 136139. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136139>. PMID:36007734.
- FERRARI, C.K.B. and TORRES, E.A.F.S., 2002. New dietetic compounds with anticarcinogenic properties. *Revista Brasileira de Cancerologia*, vol. 48, pp. 375–382. <http://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2002v48n3.2212>.
- FERRARI, C.K.B., 2001. Oxidative stress pathophysiology: searching for an effective antioxidant protection. *International Medical Journal-Tokyo*, vol. 8, no. 3, pp. 175–184.
- FLAGG, E.W., COATES, R.J. and GREENBERG, R.S., 1995. Epidemiologic studies of antioxidants and cancer in humans. *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 14, no. 5, pp. 419–427. <http://doi.org/10.1080/07315724.1995.10718532>. PMID:8522720.
- GOMES, E. M., SOUTO, P. R. F. and FELZENSZWALB, I., 1996. Shark-cartilage containing preparation protects cells against hydrogen peroxide induced damage and mutagenesis. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, vol. 367, no. 4, pp. 203–208. [http://doi.org/10.1016/S0165-1218\(96\)90078-6](http://doi.org/10.1016/S0165-1218(96)90078-6).
- GRAF, U. and VAN SCHAIK, N., 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, vol. 271, no. 1, pp. 59–67. [http://doi.org/10.1016/0165-1161\(92\)90032-H](http://doi.org/10.1016/0165-1161(92)90032-H). PMID:1371830.
- HAYASHI, M., KODAMA, Y., AWOGI, T., SUZUKI, T., ASITA, A. O. and SOFUNI, T., 1992. The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin C- and cyclophosphamide-treated rats. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, vol. 278, no. 2–3, pp. 209–213. [http://doi.org/10.1016/0165-1218\(92\)90236-S](http://doi.org/10.1016/0165-1218(92)90236-S).
- HAYASHI, M., MORITA, T., KODAMA, Y., SOFUNI, T. and ISHIDATE JUNIOR, M., 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research*, vol. 245, no. 4, pp. 245–249. [http://doi.org/10.1016/0165-7992\(90\)90153-B](http://doi.org/10.1016/0165-7992(90)90153-B). PMID:1702516.
- ISHIKAWA, R.B., LEITÃO, M.M., KASSUYA, R.M., MACORINI, L.F., MOREIRA, F.M.F., CARDOSO, C.A.L., COELHO, R.G., POTT, A., GELFUSO, G.M., CRODA, J., OLIVEIRA, R.J. and KASSUYA, C.A.L., 2017. Anti-inflammatory, antimycobacterial and genotoxic evaluation of *Dolioscarpus dentatus*. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 204, pp. 18–25. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2017.04.004>. PMID:28392458.
- ISHIKAWA, R.B., VANI, J.M., DAS NEVES, S.C., RABACOW, A.P.M., KASSUYA, C.A.L., CRODA, J., CARDOSO, C.A.L., MONREAL, A.C.D.F., ANTONIOLLI, A.C.M.B., CUNHA-LAURA, A.L. and OLIVEIRA, R.J., 2018. The safe use of *Dolioscarpus dentatus* in the gestational period: absence of changes in maternal reproductive performance, embryo-fetal development and DNA integrity. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 217, pp. 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2018.01.034>. PMID:29408581.
- JUSTICE, R.W., ZILIAN, O., WOODS, D.F., NOLL, M. and BRYANT, P.J., 1995. 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. *Genes & Development*, vol. 9, no. 5, pp. 534–546. <http://doi.org/10.1101/gad.9.5.534>. PMID:7698644.
- KADA, T. and SHIMO, K., 1987. Desmutagens and bio-antimutagens—their modes of action. *BioEssays*, vol. 7, no. 3, pp. 113–116. <http://doi.org/10.1002/bies.950070305>. PMID:3318817.
- KELLOFF, G.J., CROWELL, J.A., STEELE, V.E., LUBET, R.A., BOONE, C.W., MALONE, W.A., HAWK, E.T., LIEBERMAN, R., LAWRENCE, J.A., KOPELOVICH, L., ALI, I., VINER, J.L. and SIGMAN, C.C., 1999. Progress in cancer chemoprevention. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 889, no. 1, pp. 1–13. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08718.x>. PMID:10668477.
- KLEINER, S.M., 1997. Defense plants: foods that fight disease. *The Physician and Sportsmedicine*, vol. 25, no. 12, pp. 89–90. <http://doi.org/10.3810/psm.1997.12.1428>.
- KOBAYASHI, H., 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS Commun.*, vol. 3, pp. 103–115.
- KONAN, G., HOUPHOUET, F.Y., SOULEYMANE, M., ADOU, F.Y., ALLICO, J.D. and JEAN, D.N., 2014. Antioxidant In Vivo, In Vitro Activity Assessment and Acute Toxicity of Aqueous Extract of *Gomphrena Celosioides* (Amaranthaceae). *The Experiment*, vol. 23, no. 3, pp. 1601–1610.
- KONG, Q. and LILLEHEI, K.O., 1998. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. *Medical Hypotheses*, vol. 51, no. 5, pp. 405–409. [http://doi.org/10.1016/S0306-9877\(98\)90036-6](http://doi.org/10.1016/S0306-9877(98)90036-6). PMID:9848469.
- MACORINI, L.F.B., RADAI, J.A.S., MARIS, R.S., SILVA-FILHO, S.E., LEITAO, M.M., ANDRADE, S.F.D., GELVES, D.I.A., SALVADOR, M.J., ARENA, A.C. and KASSUYA, C.A.L., 2020. Antiarthritic and antihyperalgesic properties of ethanolic extract from *Gomphrena celosioides* Mart. (Amaranthaceae) aerial parts. *Evidence-Based*

- Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2020, no. 1, pp. 4170589. <http://doi.org/10.1155/2020/4170589>. PMID:33014104.
- MACORINI, L.F.B., MARIS, R.S., TEIXEIRA, T.C., ITO, C.N.A., KURAOKA-OLIVEIRA, A.M., BACHA, F.B., MEJIA, A.J.B., SALVADOR, M.J., KASSUYA, C.A.L. and ARENA, A.C., 2022. Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from the aerial parts of *Gomphrena celosioides* Mart. in rodents. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 133, pp. 105217. <http://doi.org/10.1016/j.yrtph.2022.105217>. PMID:35792246.
- MANOHARAN, K. and BANERJEE, M.R., 1985. β -Carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biology International Reports*, vol. 9, no. 9, pp. 783-789. [http://doi.org/10.1016/0309-1651\(85\)90096-7](http://doi.org/10.1016/0309-1651(85)90096-7). PMID:2931184.
- MANTOVANI, M.S., BELLINI, M.F., ANGELI, J.P.F., OLIVEIRA, R.J., SILVA, A.F. and RIBEIRO, L.R., 2008. β -Glucans in promoting health: prevention against mutation and cancer. *Mutation Research*, vol. 658, no. 3, pp. 154-161. <http://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.07.002>. PMID:17827055.
- MUGHAL, T.A., ALI, S., HASSAN, A., KAZMI, S.A.R., SALEEM, M.Z., SHAKIR, H.A., NAZER, S., FAROOQ, M.A., AWAN, M.Z., KHAN, M.A., ANDLEEB, S., MUMTAZ, S., MUMTAZ, S., TAHIR, H.M. and GULZAR, N., 2024. Phytochemical screening, antimicrobial activity, in vitro and in vivo antioxidant activity of *Berberis lycium* Royle root bark extract. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 84, pp. e249742. <http://doi.org/10.1590/1519-6984.249742>.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., DA FONSECA, G.A. and KENT, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, vol. 403, no. 6772, pp. 853-858. <http://doi.org/10.1038/35002501>. PMID:10706275.
- NAVARRO, S.D., BEATRIZ, A., MEZA, A., PESARINI, J.R., GOMES, R.S., KARAZIACK, C.B., CUNHA-LAURA, A.L., MONREAL, A.C., ROMÃO, W., LACERDA JÚNIOR, V., MAURO, M.O. and OLIVEIRA, R.J., 2014. A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3, 4, 6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 75, pp. 132-142. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.01.057>. PMID:24531226.
- NAVARRO, S.D., PESSATTO, L.R., MEZA, A., DE OLIVEIRA, E.J.T., AUHAREK, S.A., VILELA, L.C., DE LIMA, D.P., DE AZEVEDO, R.B., KASSUYA, C.A.L., CÁCERES, O.I.A., DA SILVA GOMES, R., BEATRIZ, A., OLIVEIRA, R.J. and MARTINES, M.A.U., 2018. Resorcinolic lipid 3-heptyl-3, 4, 6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one is a strategy for melanoma treatment. *Life Sciences*, vol. 209, pp. 300-312. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.022>. PMID:30102904.
- NEPOMUCENO, J.C., 2015. Using the *Drosophila melanogaster* to assessment carcinogenic agents through the test for detection of epithelial tumor clones (Warts). *Advanced Techniques in Biology & Medicine*, vol. 3, no. 3, pp. 2-8. <http://doi.org/10.4172/2379-1764.1000149>.
- NEVES, S.C., DE ARAÚJO, F.H., CORREA, W.A., MARTINS, A.C.F., COELHO, H.R.S., VILELA, M.L.B., DO NASCIMENTO, V.A., KASSUYA, C.A.L., DE LIMA, D.P., BEATRIZ, A., OLIVEIRA, R.J. and GOMES, R.D.S., 2023. 3-Heptylidene-4, 6-Dimethoxy-3 H-Isobenzofuran-1-One is genotoxic, increases the frequency of cell death, and potentiates the effects of cyclophosphamide and cisplatin. *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 28, no. 3, pp. 1044. <http://doi.org/10.3390/molecules28031044>. PMID:36770711.
- NEVES, S.C., NORONHA, R.C.R., MONREAL, A.C.D., DO NASCIMENTO, L.A.S., CARDOSO, A.L., TAVARES, F.S., TURA, B.B., GOMES, R.S., KASSUYA, C.A.L., NUNES, V.K., SALVADOR, M.J. and OLIVEIRA, R.J., 2024. Absence of adverse effects of *Blutaparon portulacoides* (A. St.-Hil.) Mears in mice exposed during pregnancy. *South African Journal of Botany*, vol. 166, pp. 52-59. <http://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.01.017>.
- NISHIYAMA, Y., HIROTA, T., MORISAKI, T., HARA, T., MARUMOTO, T., IIDA, S.I., MAKINO, K., YAMAMOTO, H., HIRAOKA, T., KITAMURA, N. and SAYA, H., 1999. A human homolog of *Drosophila* warts tumor suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. *FEBS Letters*, vol. 459, no. 2, pp. 159-165. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01224-7](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01224-7). PMID:10518011.
- NUNES, R.C.S., NEVES, S.C.D., SALUSTRIANO, F.R., VILELA, M.L.B., NASCIMENTO, V.A.D., ARUNACHALAM, K., GOMES, R.D.S., KASSUYA, C.A.L., MOTA, J.D.S. and OLIVEIRA, R.J., 2023. The ethanolic extract of *Piper glabratum* Kunth is teratogenic and interferes with the ossification process of Swiss mice fetuses. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, vol. 16, no. 3, pp. 430. <http://doi.org/10.3390/ph16030430>. PMID:36986529.
- OLIVEIRA, R.J., RIBEIRO, L.R., DA SILVA, A.F., MATUO, R. and MANTOVANI, M.S., 2006. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of β -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. *Toxicology In Vitro*, vol. 20, no. 7, pp. 1225-1233. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.04.001>. PMID:16716562.
- OLIVEIRA, R.J., MATUO, R., DA SILVA, A.F., MATIAZI, H.J., MANTOVANI, M.S. and RIBEIRO, L.R., 2007. Protective effect of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. *Toxicology In Vitro*, vol. 21, no. 1, pp. 41-52. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.07.018>. PMID:17055696.
- OLIVEIRA, R.J., SALLES, M.J., DA SILVA, A.F., KANNO, T.Y., LOURENÇO, A.C., FREIRIA, G.A., MATIAZI, H.J., RIBEIRO, L.R. and MANTOVANI, M.S., 2009. Effects of the polysaccharide β -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 53, no. 3, pp. 164-173. <http://doi.org/10.1016/j.yrtph.2008.12.007>. PMID:19168112.
- OLIVEIRA, R.J., SALLES, M.J.S., SILVA, A.F.D., KANNO, T.Y.N., LOURENÇO, A.C.D.S., LEITE, V.D.S., MATIAZI, H.J., PESARINI, J.R., RIBEIRO, L.R. and MANTOVANI, M.S., 2013. In vivo evaluation of the antimutagenic and antigenotoxic effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* in acute treatment with multiple doses. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 36, no. 3, pp. 413-424. <http://doi.org/10.1590/S1415-47572013005000028>. PMID:24130450.
- OLIVEIRA, R.J., CARRIJO, M.G., NOGUEIRA, T.D., PESARINI, J. R., DE DAVID, N., MAURO, M.O., STEFANELLO, M., ÉLIDA, A., KASSUYA, C.A.L. and ANTONIOLLI, A.C.M.B., 2014. Avaliação da citotoxicidade, mutagenicidade e antimutagenicidade do extrato etanólico de *Gochnatia polymorpha*. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, vol. 9, no. 3, pp. 101-106.
- OLIVEIRA, R.J., NAVARRO, S.D., DE LIMA, D.P., MEZA, A., PESARINI, J.R., DA SILVA GOMES, R., KARAZIACK, C.B., DE OLIVEIRA MAURO, M., CUNHA-LAURA, A.L., MONREAL, A.C., ROMÃO, W., JÚNIOR, V.L. and BEATRIZ, A., 2015. A novel cytosporone 3-Heptyl-4, 6-dihydroxy-3H-isobenzofuran-1-one: synthesis; toxicological, apoptotic and immunomodulatory properties; and potentiation of mutagenic damage. *BMC Cancer*, vol. 15, no. 1, pp. 1-15. <http://doi.org/10.1186/s12885-015-1532-2>. PMID:26228542.
- OLIVEIRA, E.J.T., PESSATTO, L.R., DE FREITAS, R.O.N., PELIZARO, B.I., RABACOW, A.P.M., VANI, J.M., MONREAL, A.C.D., MANTOVANI, M.S., DE AZEVEDO, R.B., ANTONIOLLI-SILVA, A.C.M.B., DA SILVA GOMES, R. and OLIVEIRA, R.J., 2018a. New Bis copper complex ((Z)-4-((4-chlorophenyl) amino)-4-oxobut-2-enoyl) oxy): cytotoxicity in 4T1 cells and their toxicogenic potential in Swiss

- mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 356, pp. 127-138. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2018.08.004>. PMID:30092250.
- OLIVEIRA, V.C., CONSTANCE, S.A.R., POLLONI, L., ORSOLIN, P.C., SILVA-OLIVEIRA, R.G., MACHADO, N.M., DE OLIVEIRA-JÚNIOR, R.J. and NEPOMUCENO, J.C., 2018b. Protective effect of aspirin against mitomycin C-induced carcinogenicity, assessed by the test for detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. *Drug and Chemical Toxicology*, vol. 41, no. 3, pp. 330-337. <http://doi.org/10.1080/01480545.2017.1415926>. PMID:29281929.
- OLIVEIRA, R.J., PEREIRA, F.P.A.N., SILVEIRA, I.O.M.F.D., LIMA, R.V., BERNO, C.R., PESARINI, J.R., ANTONIOLLI-SILVA, A.C.M.B., MONREAL, A.C.D., ADILSON, B., LIMA, D.P. and GOMES, R.D.S., 2019. Assessment of the toxicogenic effects and cell death potential of the ester (Z)-methyl 4-((1, 5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2, 3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl) amino)-4-oxobut-2-anoate in combination with cisplatin, cyclophosphamide and doxorubicin. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 42, no. 2, pp. 399-410. <http://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0279>. PMID:31259359.
- OLIVEIRA, R.J., DA SILVEIRA, I.O.M.F., DAS NEVES, S.C., MITSUYASU, B., MARTINS, A.C., BERNO, C., MOHAMMAD, J., RAJ, H., DE ARAUJO, F.H.S., HORTELAN, C.R., MACHADO, L., DA SILVA JÚNIOR, E.N., VILELA, M.L.B., NASCIMENTO, V.A., BEATRIZ, A. and DA SILVA GOMES, R., 2023. ZIM, a Norbornene Derived from 4-Aminoantipyrine, Induces DNA Damage and Cell Death but in Association Reduces the Effect of Commercial Chemotherapeutics. *Chemical Research in Toxicology*, vol. 36, no. 1, pp. 66-82. <http://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.2c00275>. PMID:36548215.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD, 2008. *Test No. 425: acute oral toxicity: up-and-down procedure*. Paris: OECD Publishing. <http://doi.org/10.1787/9789264264618-en>.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD, 2015. *Test No. 421: reproduction/developmental toxicity screening*. Paris: OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264242692-en>.
- ORSOLIN, P.C., SILVA-OLIVEIRA, R.G. and NEPOMUCENO, J.C., 2015. Modulating effect of synthetic statins against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 81, pp. 111-119. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.004>. PMID:25846503.
- ORTIZ, H.C., DAS NEVES, S.C., KASSUYA, C.A.L., COELHO, H.R.S., MARTINS, A.C.F., VILELA, M.L.B., NASCIMENTO, V.A., KARUPPUSAMY, A., STEFANELLO, M.É.A., OLIVEIRA, R.J. and DA SILVA GOMES, R., 2023. The ethanolic extract of *Salvia lachnostachys* Benth is not maternotoxic, does not alter reproductive performance, but has teratogenic potential. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, vol. 23, no. 1, pp. 145.
- PRACHI, C.N., KUMAR, D. and KASANA, M.S., 2009. Medicinal plants of Muzaffarnagar district used in treatment of urinary tract and kidney stones. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, vol. 8, pp. 191-195.
- PROMRAKSA, B., PHETCHARABURANIN, J., NAMWAT, N., TECHASEN, A., BOONSIRI, P. and LOILOME, W., 2019. Evaluation of anticancer potential of Thai medicinal herb extracts against cholangiocarcinoma cell lines. *PLoS One*, vol. 14, no. 5, pp. e0216721. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0216721>. PMID:31120926.
- RAND, M.D., 2014. A method of permeabilization of *Drosophila* embryos for assays of small molecule activity. *Journal of Visualized Experiments*, vol. 51634, no. 89, pp. 51634. <http://doi.org/10.3791/51634>. PMID:25046169.
- REZENDE, G.C.D., NORONHA, R.C.R., ORTIZ, H.C., DO NASCIMENTO, L.A.S., DAS NEVES, S.C., VENTURA SAID, Y.L., CARDOSO, A.L., DE MESCOUTO, V.A., VILELA, M.L.B., DO NASCIMENTO, V.A., COELHO, H.R.S., LEITE KASSUYA, C.A., PEDROSO, T.F., SALVADOR, M.J. and OLIVEIRA, R.J., 2023. Absence of maternal-fetal adverse effects of *Alternanthera littoralis* P. Beauv. following treatment during pregnancy in mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, vol. 86, no. 16, pp. 543-556. <http://doi.org/10.1080/15287394.2023.2223624>. PMID:37340982.
- ROCHA, R.S., KASSUYA, C.A.L., FORMAGIO, A.S.N., MAURO, M.D.O., ANDRADE-SILVA, M., MONREAL, A.C.D., CUNHA-LAURA, A.L., VIEIRA, M.C. and OLIVEIRA, R.J., 2016. Analysis of the anti-inflammatory and chemopreventive potential and description of the antimutagenic mode of action of the *Annona crassiflora* methanolic extract. *Pharmaceutical Biology*, vol. 54, no. 1, pp. 35-47. <http://doi.org/10.3109/13880209.2015.1014567>. PMID:25885939.
- SALUSTRIANO, F.R., MONREAL, A.C.D., DAS NEVES, S.C., DE OLIVEIRA, G.M., DE OLIVEIRA, D.D.M., VILELA, M.L.B., DO NASCIMENTO, V.A., MARTINS, A.C.F., SAROJA, B., KARUPPUSAMY, A., COELHO, H.R.S., KASSUYA, C.A.L., GELVES, D.I.A., SALVADOR, M.J., OLIVEIRA, R.J. and GOMES, R.D.S., 2022. The ethanolic extract of *Gomphrena celosioides* Mart. does not alter reproductive performance or embryo-fetal development, nor does it cause chromosomal damage. *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 11, pp. 2369. <http://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112369>. PMID:36365187.
- SALVADOR, M.J., ANDREAZZA, N.L., PASCOAL, A.C.R.F., PEREIRA, P.S., FRANÇA, S.C., ZUCCHI, O.L.A.D. and DIAS, D.A., 2012. Bioactive Chemical Constituents and Biotechnological Production of Secondary Metabolites in Amaranthaceae Plants, Gomphreneae Tribe. *Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites*, vol. 1, pp. 124-158. <http://doi.org/10.2174/978160805114411201010124>.
- SANTOS, H.S. and CRUZ, W.M.S., 2001. The antioxidant vitamin nutritional therapy and the chemotherapy treatment in oncology. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes eo tratamento quimioterápico oncológico]. *Revista Brasileira de Cancerologia*, vol. 47, pp. 303-308. <http://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2001v47n3.2309>.
- SCHNEIDER, B.U.C., MEZA, A., BEATRIZ, A., PESARINI, J.R., CARVALHO, P.C.D., MAURO, M.D.O., KARAZIACK, C.B., CUNHA-LAURA, A.L., MONREAL, A.C., MATUO, R., LIMA, D.P. and OLIVEIRA, R.J., 2016. Cardanol: toxicogenetic assessment and its effects when combined with cyclophosphamide. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 39, no. 2, pp. 279-289. <http://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2015-0170>. PMID:27303909.
- SHARMA, N.E.H.A. and VIJAYVERGIA, R., 2011. Study of primary metabolites and antimicrobial activity of *Gomphrena celosioides* Mart. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, vol. 3, no. 2, pp. 424-431.
- SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R. and SCHNEIDER, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, vol. 175, no. 1, pp. 184-191. [http://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](http://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0). PMID:3345800.
- SOULEYMANE, M., KONAN, G., HOUPHOUET, F.Y., SOULEYMANE, M., ADOU, F.Y. and ALLICO, J.D., 2014. Antioxidant in vivo, in vitro activity assessment and acute toxicity of aqueous extract of *gomphrena celosioides* (Amaranthaceae). *Experiment*, vol. 23, no. 3, pp. 1601-1610.
- SPANÓ, M.A., FREI, H., WÜRGLER, F.E. and GRAF, U., 2001. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis*, vol. 16, no. 5, pp. 385-394. <http://doi.org/10.1093/mutage/16.5.385>. PMID:11507237.
- SPEIT, G., HANELT, S., HEIBIG, R., SEIDEL, A. and HARTMANN, A., 1996. Detection of DNA effects in human cells with the

- comet assay and their relevance for mutagenesis. *Toxicology Letters*, vol. 88, no. 1-3, pp. 91-98. [http://doi.org/10.1016/0378-4274\(96\)03723-X](http://doi.org/10.1016/0378-4274(96)03723-X). PMID:8920722.
- SURH, Y.J., SHLYANKEVICH, M., LEE, J.W. and YOO, J.K., 1996. Inhibition of covalent DNA binding and mutagenicity of benzo [a] pyrene by isopropyl-2-(1, 3-dithietane-2-ylidene)-2-[N-(4-methylthiazol-2-yl) carbamoyl] acetate (YH439), a novel hepatoprotective agent. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, vol. 367, no. 4, pp. 219-224. [http://doi.org/10.1016/S0165-1218\(96\)90080-4](http://doi.org/10.1016/S0165-1218(96)90080-4).
- UPADHYAY, P., SHUKLA, R. and MISHRA, S.K., 2019. Acute and sub-acute toxicity study of hydro-alcoholic leaves extract of *Reinwardtia indica* in rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 111, pp. 36-41. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.056>. PMID:30576932.
- VASCONCELOS, P.C.P., SPESSOTTO, D.R., MARINHO, J.V., SALVADOR, M.J., GASPAROTTO JUNIOR, A. and KASSUYA, C.A.L., 2017a. Mechanisms underlying the diuretic effect of *Gomphrena celosioides* Mart.(Amaranthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 202, pp. 85-91. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.007>. PMID:28315456.
- VASCONCELOS, M.A., ORSOLIN, P.C., SILVA-OLIVEIRA, R.G., NEPOMUCENO, J.C. and SPANÓ, M.A., 2017b. Assessment of the carcinogenic potential of high intense-sweeteners through the test for detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 101, pp. 1-7. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.028>. PMID:28027980.
- VASCONCELOS, P.C.P., TIRLONI, C.A.S., PALOZI, R.A.C., LEITÃO, M.M., CARNEIRO, M.T.S., SCHÄEDLER, M.I., SILVA, A.O., SOUZA, R.I.C., SALVADOR, M.J., GASPAROTTO JUNIOR, A. and KASSUYA, C.A.L., 2018. Diuretic herb *Gomphrena celosioides* Mart.(Amaranthaceae) promotes sustained arterial pressure reduction and protection from cardiac remodeling on rats with renovascular hypertension. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 224, pp. 126-133. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2018.05.036>. PMID:29842964.
- WATERS, M.D., BRADY, A.L., STACK, H.F. and BROCKMAN, H.E., 1990. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutation Research*, vol. 238, no. 1, pp. 57-85. [http://doi.org/10.1016/0165-1110\(90\)90039-E](http://doi.org/10.1016/0165-1110(90)90039-E). PMID:2406585.
- WEISBURGER, J.H., 1999. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 37, no. 9-10, pp. 943-948. [http://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00086-1](http://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00086-1). PMID:10541449.
- WEISBURGER, J.H., 2000. Eat to live, not live to eat. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, vol. 16, no. 9, pp. 767-773. [http://doi.org/10.1016/S0899-9007\(00\)00400-7](http://doi.org/10.1016/S0899-9007(00)00400-7). PMID:11032452.
- ZHANG, S., HUNTER, D.J., FORMAN, M.R., ROSNER, B.A., SPEIZER, F.E., COLDITZ, G.A., MANSON, J.E., HANKINSON, S.E. and WILLETT, W.C., 1999. Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 91, no. 6, pp. 547-556. <http://doi.org/10.1093/jnci/91.6.547>. PMID:10088626.