



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular



**AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTOPROTETOR DE TRÊS EXTRATOS DE
PLANTAS DA ANTÁRTICA POR DIFERENTES MODELOS
BIOLÓGICOS**

Betina Kappel Pereira

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Co-orientador Profa. Juliana da Silva

Porto Alegre (RS)

2007

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Radiologia Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E no Laboratório de Genética toxicológica da ULBRA. O projeto foi subsidiado pela Fundação de coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior(CAPES), pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) e pelo laboratório de Genotoxicidade-Instituto Royal (GENOTOX Centro de Biotecnologia /UFRGS).

Dedicatória

Aos meus filhos, pela força que sem saber me deram a cada dia de trabalho, e aos meus pais por me ajudarem cuidando dos meus filhos para mim construir este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. João Antônio Pegas Henriques pela orientação e apoio durante a elaboração deste trabalho inclusive pela companhia no Continente gelado.

Ao colega e amigo Renato Moreira Rosa por acreditar no meu trabalho e incansavelmente me apoiar durante a realização dos testes e elaboração desta dissertação.

As profesoressas membros da minha comissão de Acompanhamento, Dr Arthur Feet Neto e Dra. Jenifer Saffi.

Ao professor Dr. Antônio Batista Pereira coordenador de pesquisa terrestre do Programa Antártico Brasileiro por todo apoio e auxílio financeiro neste projeto.

A professora Dra. Juliana da Silva pelo apoio nesta caminhada.

As meus colegas e amigos do laboratório 210 por tornarem as tardes mais produtivas e menos cansativas.

A minha família pelo valioso apoio emocional.

A todos aqueles que de alguma forma tornaram possível a conclusão deste trabalho.

E a Deus pela luz e orientação nos momentos em que ninguém além da força divina poderia ajudar.

Obrigada.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. Introdução	1
1.1. Radiação ultravioleta como agente genotóxico.....	2
1.2. Fotoproteção.....	4
1.3. A radiação ultravioleta no continente antártico.....	8
1.4. Plantas da Antártida avaliadas neste estudo.....	8
1.5. Organismos e metodologias utilizadas neste estudo.....	12
1.5.1. A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo.....	12
1.5.2. Ensaio com células de mamíferos.....	15
1.5.3. Ensaio cometa.....	16
1.5.4. O molusco <i>Cantareus aspersus</i> como modelo de estudo.....	19
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo geral.....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. Protective effects of three extracts from Antarctic plants against ultraviolet radiation in several biological models	22
4. Discussão	56
5. Conclusão	62
5.1. Conclusão geral.....	67
5.2. Conclusões específicas.....	67
6. Perspectivas	64
7. Referências bibliográficas	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

UV	Radiação ultravioleta
UVA	Radiação ultravioleta A (400 a 320 nm)
UVB	Radiação ultravioleta B (320 a 290 nm)
UVC	Radiação ultravioleta C (290 a 100 nm)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
Lys	Lisina
His	histidina
Hom	homocерina
CAN	Canavanina
pH	Potencial hidrogeniônico

RESUMO

O objetivo desse trabalho é avaliar o efeito fotoprotetor de três espécies de plantas da Antártica - *Deschampsia antarctica* Desv. , *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. E *Polytrichum juniperinum* Hedw. Investigou-se a ação do extrato metanólico de cada espécie contra os danos induzidos ao DNA, utilizando a linhagem celular de fibroblasto de pulmão de hamster chinês (células V79) e no molusco *Cantareus aspersus* utilizando o ensaio cometa em animais alimentados com esses vegetais. O perfil mutagênico e antimutagênico destes extratos também foi avaliado através de linhagens haplóides da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As concentrações empregadas desses extratos não foram citotóxicas nem mutagênicas em *S.cerevisiae*. Além disso, o tratamento com todos os extratos melhorou a sobrevivência e diminuiu a taxa de mutagênese induzida por UVC nesse modelo biológico. Os tratamentos empregados diminuíram significativamente os danos ao DNA induzidos pela UVC em células V79, como verificado pelo ensaio cometa. Esses extratos também reduziram a peroxidação lipídica induzida por UVC, mostrando uma clara propriedade antioxidante. Os resultados do ensaio cometa modificado, em células V79, empregando a Endonuclease V, demonstraram uma diminuição na formação de dímeros de ciclobutano piridina após a pré - incubação com estes extratos. O emprego das endonucleases FPG e ENDO III indica um efeito protetor destes extratos contra as lesões oxidativas geradas pelo UVC. Em linhagens de levedura deficientes em fotoliase, o tratamento com os extratos mostrou-se muito menos eficiente na proteção contra os danos citotóxicos da radiação UVC, sugerindo que esta via de reparação do DNA é estimulada por substâncias dos extratos. Em *C.aspersus*, o tratamento com os vegetais na alimentação dos moluscos, foi capaz de proteger contra os danos induzidos por UVC nas células da hemolinfa. Em conclusão, os extratos de *D. antarctica*, *C. quitensis* e *P. juniperinum* parecem possuir propriedades fotoprotetivas, o que pode ser atribuído a moléculas como flavonóides e carotenóides agindo como moléculas absorventes de UV, antioxidantes e estimulando processos de reparação do DNA.

ABSTRACT

This study aimed at deepening the knowledge on the photoprotective effects of three Antarctic plant species – *Deschampsia antarctica* Desv., *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl., and *Polytrichum juniperinum* Hedw. We investigated the protective effect against UV-induced DNA damage in a permanent lung fibroblast cell line derived from Chinese hamsters (V79 cells), and in the snail *Cantareus aspersus*, using the comet assay. The protective, mutagenic, and antimutagenic profile of these extracts also was evaluated using haploid strains of *Saccharomyces cerevisiae*. At the concentration range employed, the extracts were not cytotoxic or mutagenic to *S.cerevisiae*. In addition, the treatment with these extracts enhanced survival, and decreased induced reverse, frameshift, and forward mutations in a dose-response manner in all UV-C doses employed. In addition, they did not generate DNA strand breaks in V79 cells, and the treatment significantly decreased DNA damage induced by UVC. These extracts significantly decreased UVC-induced lipid peroxidation in V79 cells, showing a clear antioxidant property. Moreover, results of comet assay cells, employing Fpg, EndoIII, and Endo V endonuclease in these cells, demonstrated significant reduction of UVC-induced DNA damage, oxidative damage, and production of cyclobutane pyrimidine dimers after pre-incubation with these extracts. The treatment with all tested extracts were much less efficient against UVC-induced cytotoxicity in the yeast strain defective in photolyase as compared to the wild type strain, suggesting that this DNA repair pathway is stimulated by substances present in the extracts. In *C. aspersus*, the treatment was able to protect against UVC-induced damage. In conclusion, *D. antarctica*, *C. quitensis*, and *P. juniperinum* extracts present photoprotective properties, which can be attributed to molecules, such as flavonoids and carotenoids, which act as UV-sorbing molecules and as antioxidants, as well as stimulate DNA-repair processes.

Introdução



INTRODUÇÃO

1.1. Radiação ultravioleta como agente genotóxico

A radiação ultravioleta (UV), proveniente do sol, consiste nas radiações eletromagnéticas compreendidas entre os comprimentos de onda 280 a 380 nm, enquanto a luz visível está incluída na faixa de 380 a 760 nm (HU, 1990; HANNAN *et al.*, 1980; AFAQ & MUKHTAR, 2006). O espectro da radiação UV, principalmente para fins médicos, é dividido em três faixas de comprimento de onda designadas como: UVA (400 a 320 nm), UVB (320 a 290 nm) e UVC (290 a 100 nm). Na superfície terrestre, a radiação UV consiste principalmente da faixa UVA e UVB, uma vez que a penetração na camada de ozônio da atmosfera reduz drasticamente o comprimento de onda para 320 nm.

Em termos de relevância para a saúde humana, a importância deve-se ao comprimento de onda da faixa UVB, uma vez que a radiação UVC é bloqueada pela camada de ozônio estratosférico. No entanto, a maioria dos estudos é realizada com a UVC, pois coincide com o pico de absorção do DNA (260 nm) e constitui-se da faixa mais lesiva dessa radiação.

A exposição à radiação UVC pode causar dois grandes tipos de lesões aos ácidos nucleicos: os danos diretos e os danos mediados por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (FRIEBERG *et al.*, 2006; SAFFI & HENRIQUES, 2003). Quando o DNA fica exposto a esse agente físico, as bases pirimídicas adjacentes tornam-se covalentemente ligadas, formando uma estrutura de ciclobutano (FRIEBERG *et al.*, 2006; SAFFI & HENRIQUES, 2003). Essa estrutura, resultante da saturação das suas ligações duplas entre os carbonos 5 e 6 é chamada de dímero de pirimidina ou dipirimidina ciclobutano (CPD). A formação dos CPDs acontece de forma muito mais abundante entre as timinas do que entre as citosinas, ou seja a formação dímeros do tipo T-T é significativamente maior do que os do tipo C-C. Dependendo da forma isômera em que esses dímeros se encontram, podem ocorrer grandes distorções na hélice de DNA, o que acarreta na parada obrigatória da replicação. Um outro tipo de lesão no DNA provocado pela radiação UVC é o fotoproduto 6-4, o qual é produzido pela ligação entre o carbono da posição 6 de uma timina com o carbono da posição 4 da timina adjacente e causa uma grande distorção na dupla hélice. Este tipo de fotoproduto é muito mais abundante entre as citosinas do que entre as timinas. Entretanto, quando as citosinas encontram-se metiladas na posição 5, não há a formação do fotoproduto 6-4. Essas lesões são bastante vulneráveis ao ataque alcalino e encontram-se em citosinas localizadas à 3' das pirimidinas. Um outro tipo de

reação fotoquímica de uma base de pirimidina é a adição de uma molécula de água na dupla ligação dos carbonos 5 e 6 para formar 5,6-dihidro-6-hidroxi derivado ou hidrato de citosina. Normalmente, os hidratos são muito instáveis, desidratam-se rapidamente, revertendo para a sua forma original. O hidrato de 5-metilcitosina pode sofrer desaminação, originando hidrato de timina, a qual por desidratação pode ser convertida em timina. Este, provavelmente, seja o mecanismo de indução de mutação pelo UVC em resíduos de citosina. Apesar de serem mais abundantes após a radiação ionizante, as lesões do tipo timina glicóis também são encontradas após exposição à radiação UVC, como resultado da saturação da dupla ligação 5,6 de algumas pirimidinas. Algumas dessas lesões estão ilustradas na figura 1.

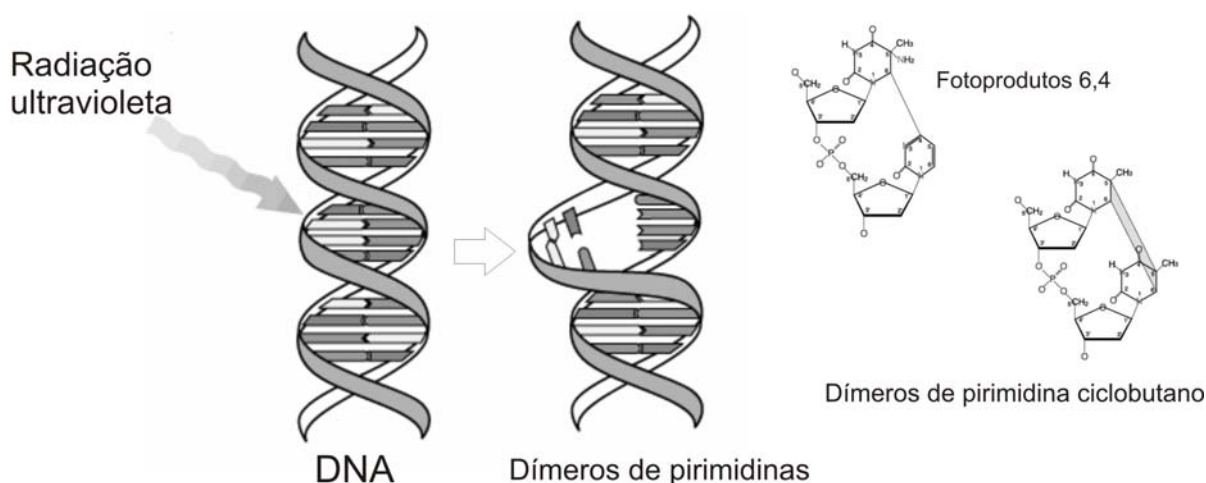


Figura 1. Dímeros de pirimidinas mais comuns, gerados pela radiação UVC no DNA.

A radiação UVC também pode levar à formação de pontes proteína-DNA e pontes intercadeias DNA-DNA. As lesões do tipo pontes intercadeias DNA-DNA induzidas por UVC correspondem a 0,1 a 1% do número total de dímeros de pirimidinas estimado (SAFFI & HENRIQUES, 2003, FRIEBERG *et al.*, 2006). Por causar diversas alterações estruturais nos ácidos nucleicos, a radiação UV é um agente físico ambiental mutagênico e carcinogênico.

A radiação UVC também está diretamente ligada à produção de radicais livres, os quais assim como as espécies reativas de oxigênio de natureza não radicalar, produzem uma série de lesões ao DNA, como bases modificadas, entre as quais destacam-se as timina-glicóis e hidratos de pirimidinas, riboses, quebras simples de cadeia, sítios apurínicos e apirimidínicos e ligações cruzadas entre DNA e proteínas. (SAFFI & HENRIQUES, 2003). O alvo preferencial do ataque de espécies reativas de oxigênio parece ser a guanina e o produto final mais frequente

é a 7-8-dihidroxi-8-oxo-2'-desoxiguanina (BOITEUX *et al.*, 2002; DROGE, 2002; SAFFI & HENRIQUES, 2003; VALKO *et al.*, 2006)

Em vista das possíveis lesões ao material genômico e demais macromoléculas da célula, tais como lipídeos e proteínas, para manter a integridade celular os organismos possuem diversos sistemas de defesa. Para evitar estes tipos de danos no DNA nuclear, as células de mamíferos possuem seis estratégias de defesa: (i) substâncias enzimáticas ou não enzimáticas, distribuídos em todos os compartimentos intracelulares, como vitaminas ou tióis, desintoxicam espécies reativas de oxigênio ou apresentam a capacidade de seqüestrar radicais livres; (ii) os lipídeos de membrana podem ser reparados ou facilmente substituídos; (iii) as proteínas danificadas por oxidação podem ser encaminhadas para a proteólise limitada e substituídas; (iv) o DNA nuclear é compartimentalizado longe das mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos, onde provavelmente há maior produção dos oxidantes; (v) a maior parte do DNA não replicativo é circundado por histona e poliaminas, os quais protegem o DNA contra agentes oxidantes; (vi) a maioria dos tipos de danos produzidos ao DNA podem ser reparados por eficientes mecanismos de reparo enzimáticos, tais como a fotorestauração, o reparo por excisão de nucleotídeos e o reparo por excisão de bases (VALKO *et al.*, 2007).

1.2. Fotoproteção

No contexto da saúde, denomina-se fotoproteção ao conjunto de estratégias químicas e físicas, ambientais ou comportamentais, responsáveis pela minimização dos efeitos lesivos da exposição a radiação solar, com o objetivo de reduzir a incidência de câncer de pele na população humana e outras doenças dermatológicas relacionadas à radiação ultravioleta (AFAQ & MUKHTAR, 2006). Em nível de organismo, a pele é o órgão alvo desses efeitos lesivos, os quais variam de eritema, edema, hiperplasia, hiperpigmentação, imunossupressão e câncer de pele (2003; AFAQ & MUKHATAR, 2006; SVOBODOVÁ *et al.*, 2003).

Em primeira análise, a fotoproteção ambiental constitui uma das estratégias mais efetivas. O ozônio é uma molécula capaz de absorver a radiação ultravioleta e está presente principalmente na estratosfera, entre 10 e 50 km acima da superfície da terra. A camada de ozônio absorve grande quantidade da radiação UVB e toda radiação UVC, mas somente uma pequena quantidade da luz UVA. Essa concentração de ozônio varia naturalmente de acordo com o clima, temperatura, latitude e altitude. As substâncias que depletam essa barreira, tais como os clorofluorcarbonos, tem grande repercussão na exposição terrestre à radiação ultravioleta; dessa forma, desde 1970, o hemisfério sul lida com problemas de redução da

camada de ozônio. Embora outros fatores, como as nuvens, a água do mar e os metais possam absorver ou refletir a radiação ultravioleta, o mais recomendado é evitar a exposição ao sol nos horários de maior luminosidade, como o meio-dia. Nas últimas duas décadas, o governo australiano tem investido em pesquisa de novos tecidos para fabricação de roupas com proteção contra radiação ultravioleta, mas essa estratégia não obteve êxito (AFAQ & MUKHTAR, 2006; MCKENZIE et al., 2007, SINHÁ & HADER, 2002).

Fisiologicamente, os principais mecanismos que minimizam os efeitos lesivos da radiação ultravioleta são os pigmentos e substâncias capazes de absorver diferentes comprimentos de onda da radiação luminosa. Além disso, as defesas antioxidantes previnem as lesões de origem oxidativa aos ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, e os processos que reparam os danos celulares e teciduais (SVOBODOVÁ *et al.*, 2003; SINHÁ & HADER, 2002).

As cianobactérias sintetizam aminoácidos semelhantes a micosporina e escitonemina enquanto os animais, especialmente os humanos, utilizam o processo complexo de melanogênese para proteção ultravioleta (AFAQ & MUKHTAR, 2006). Os vegetais apresentam uma resposta adaptativa interessante à radiação ultravioleta, em razão da existência dos sistemas fotosintéticos e necessidade de exposição solar (ALBERDI *et al.*, 2005). Nas plantas, os carotenóides apresentam papel fundamental como pigmentos acessórios da fotossíntese e também na proteção contra foto-oxidação (GLENN E. BARTLEY & PABLO A. SCOLNIK, 2007). O outro grupo de moléculas primordialmente relacionadas a essa função são os compostos polifenólicos como os flavonóides, (AFAQ & MUKHTAR, 2006; SVOBODOVÁ *et al.*, 2003).

Os compostos polifenólicos são os metabólitos secundários de plantas com uma diversidade estrutural notável, pois compreendem mais de 8000 moléculas naturais. Esse grupo de substâncias apresenta uma grande variedade de atividades biológicas em mamíferos, principalmente desempenhadas pelo grupo dos flavonóides, tais como ação antiviral, antibacteriana, imunoestimulante, hipocolesterolêmica, antioxidante, hepatoprotetora, antihipertensiva, cardioprotetora, antiinflamatória. Nesse grupo, os flavonóides são antioxidantes potentes, capazes de neutralizar espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e quelar íons de metais de transição como ferro e cobre. Além disso, inibem atividades enzimáticas como lipoxigenase, ciclooxigenase, xantina oxidase, succinato desidrogenase e NADH oxidase da membrana mitocondrial, fosfolipase A. Por fim, essas moléculas podem atuar em nível de sinalização redox em cascatas para inibir a degradação de DNA (CHICARO, 2004;

FERGUSON, 2001; SCHMITZ-HOERNER & WEISSENBOECK, 2003; SVOBODOVÁ *et. al.*,2003).

Os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides, possuem um interesse reforçado na proteção da pele pois além de absorção da radiação ultravioleta, essas moléculas possuem potencial antioxidante (SVOBODOVÁ *et. al.*,2003). Na verdade, a pele possui um sistema de defesa antioxidante elaborado, para combater o estresse oxidativo induzido pela exposição à luz solar. Entretanto, a exposição excessiva pode ultrapassar a capacidade dos sistemas de defesa, promovendo o dano oxidativo e suas conseqüências teciduais. Em termos de antioxidantes com potencial fotoprotetor destacam-se os tocoferóis, o ascorbato e os beta-carotenos (STEENVOORDEN,1997).

Nos humanos, os flavonóides ingeridos a partir da dieta são distribuídos aos tecidos expostos a luz, como a pele e os olhos, com fins de fotoproteção (STHAL,2007). Exemplificando os benefícios dessas moléculas na saúde humana nesse contexto, uma dieta enriquecida em genisteína, uma isoflavona da soja, é capaz de prevenir eficientemente a fotocarcinogênese em ratos. Da mesma maneira, os flavonóides presentes no chá verde parecem ser os compostos responsáveis pelo efeito fotoprotetor em humanos (AFAQ & MUKHTAR, 2006). Recentemente, em voluntários humanos, uma dieta de 12 semanas enriquecidas em alguns flavanóis protegeu contra o eritema induzido por ultravioleta (STAHL, 2007).

O uso de substâncias fotoprotetoras de aplicação tópica parece ser uma das medidas preventivas mais práticas e eficazes na redução de um grande número de doenças ligadas a exposição ultravioleta como queratoses actínicas, carcinoma celular escamoso, carcinoma celular escamoso não basal e melanomas, além do envelhecimento precoce. Existem diversos agentes, orgânicos (denominados filtros químicos) e inorgânicos (conhecidos como filtros físicos), utilizados em formulações de protetores solares com dois mecanismos de ação distintos, os quais podem estar inter-relacionados: a capacidade de absorção da radiação ultravioleta antes de atingir o epitélio e a ação antioxidante das moléculas, minimizando os danos oxidativos a biomoléculas. Dezenas de compostos foram aprovados pelo FDA desde 1978 para uso em fotoprotetores, tais como o dióxido de titânio, óxido de zinco, derivados do ácido p-aminobenzoico, cinamatos, salicilatos, derivados do ácido acrílico, benzofenonas e siloxanos (LAUTENSCHLAGER *et al.*,2007). Dessa forma, o uso de produtos da biossíntese vegetal, para fotoproteção tópica ou pela ingestão na dieta constitui-se alvo importante na farmacologia atual (AFAQ & MUKHTAR, 2006).

Na figura 2, as principais estratégias fotoprotetoras estão esquematizadas.

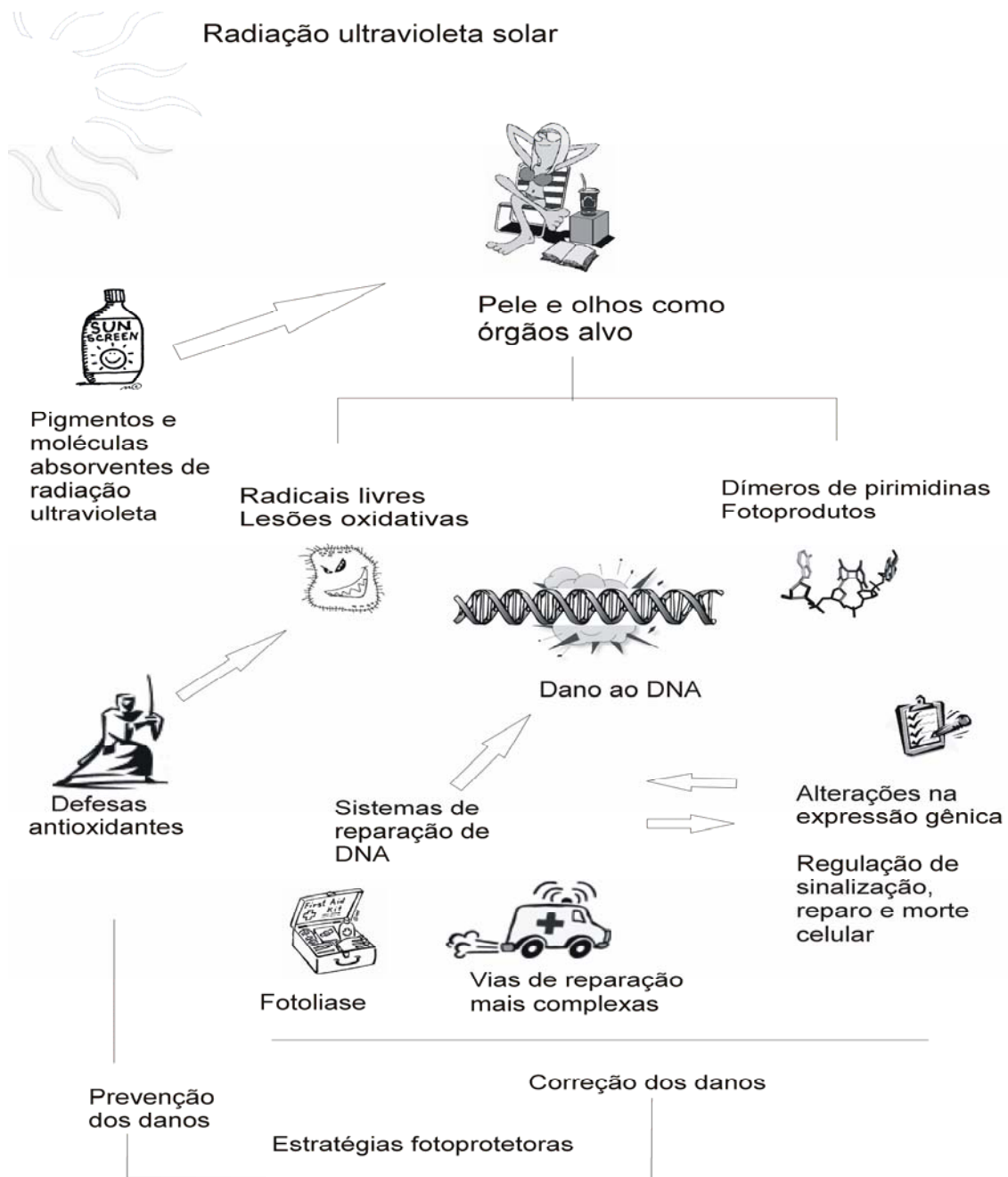


Figura 2. Principais vias de danos ao DNA causados pela radiação ultravioleta e mecanismos atuantes na fotoproteção, tanto na correção dos danos quanto na prevenção das lesões.

1.3. A radiação ultravioleta no continente antártico

As determinações dos níveis estratosféricos de ozônio na Antártica ao longo das últimas décadas mostraram uma correlação direta entre o decréscimo da concentração de ozônio estratosférico e o aumento da incidência da radiação ultravioleta na superfície terrestre. Este tipo de análise é feito a partir da comparação entre períodos com o mesmo ângulo solar (os equinócios de outono e primavera) e as análises demonstram um fator próximo a dois, isto é, a radiação UV-B na primavera é em geral o dobro da observada no outono (KIRCHHOFF, 2002; MCKENZIE *et al.*, 2007). Além disso, o frio extremo e o vórtex polar promovem as reações com os clorofluorcarbonetos, elevando a incidência de radiação ultravioleta nessa área do globo (GROB *et al.*, 2001 ; HOLM-HANSEN *et al.*, 1993; SMITH *et al.*, 2002 ; SINHA & HÄDER, 2002)

Estas condições extremas tornam o continente Antártico um ambiente propício para se estudar efeitos da radiação ultravioleta sobre diferentes organismos. Sabendo que tais condições são favoráveis ao desenvolvimento de mecanismo de sobrevivência, espécies de plantas da região são em potencial produtoras de agentes fotoprotetores (SMITH *et al.*, 2002).

1.4. Plantas da Antártica avaliadas neste estudo

Devido às condições extremas de temperatura e localização geográfica isolada, embora existam cerca de 380 espécies de líquens e 130 espécies de briófitas, existem apenas duas espécies de plantas vasculares na Antártica: *Deschampsia antarctica* e *Colobanthus quitensis* (Figura 3). Durante o verão, época do ano em que há intensa incidência de luz, e as temperaturas são mais amenas, a germinação e reprodução dessas espécies é mais propícia (SMITH, 2003). Essas plantas são bastante importantes para o ecossistema local e são eficientes monitores das alterações sofridas pelo continente nos últimos anos. Tais espécies, despertam interesse científico, pois apresentam uma resistência fisiológica notável às condições climáticas sob as quais estão expostas (SMITH, 2003).

A *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*) (Figura 3) é a única gramínea que cresce na Antártica marítima. As temperaturas baixas e a incidência constante de luz são circunstâncias típicas durante a estação de crescimento nesta latitude. Planta perene que cresce em áreas de degelo de locais onde ocorre criosolos. É uma planta com distribuição descontínua, principalmente na Ilha Rei George, Arquipélago das Shetland do Sul, onde é freqüente em áreas de degelo, porém inexplicavelmente não ocorre na Península Fildes. *D. antarctica*

geralmente crescem associadas com, *Colobanthus quitensis*, sendo que em habitats onde o solo é abundante predomina a primeira, já onde o solo é raso predomina a segunda. Esta espécie é encontrada em locais que não sofrem influência das colônias de aves, porém os espécimes são mais vigorosos em ambientes ricos em nitrogênio, próximo a colônias de aves, onde existe guano. Permanece sob o gelo durante o inverno e quando ocorre o degelo reinicia seu crescimento durante o verão, flores anualmente durante no período de dezembro a janeiro. Até o momento não foi identificados animais que se alimentem dessa planta.

Em termos de descrição botânica encontram-se folhas medindo 12-15x0,2 mm; lâmina setácea, convoluta, glabra; lígula 2-9 mm, acuminada, bainha redonda, estriada, glabra; colmo 3,8-4 cm, ascendente até ereto, fino, glabro; panícula 6-15 cm, laxa, estendida na maturidade, verde a púrpura, 2-4 ramos inferiores filiformes; espiguetas com 2 flores, ráquila inter-flora 1-1,5 mm. Gluma lanceoladas, acuminadas, escabras, 3,8-6,7mm; lema 1,8-3,3 mm, lanceolada, irregularmente 4-dentada no ápice, glabra, reta ou curvada; pálea 2-2,5 mm, oblonga. Anteras 0,25-0,8 mm, autocompatível, frequentemente cleistógama (MOORE, 1983). Em termos anatômicos e ultraestruturais, a resposta ao estresse ambiental, expressa-se como células com mesófilo irregular, grandes espaços intercelulares na camada parenquimática, células epidérmicas buliformes e modificações na vascularização das folhas, surgimento de estruturas atípicas ao redor dos plastídeos e alteração na superfície dos cloroplastos (GIELWANOWSKA *et al.*,2005)

D. antarctica possui uma resposta fisiológica importante em relação às condições ambientais. Por exemplo. *D. antarctica* produz mais de 13 polipeptídeos com peso na ordem de 10 kDa com função anti-congelante, as quais são secretadas para o apoplasto com fins de tolerância à baixa temperatura. Essa espécie é a primeira planta no qual a ação anti-congelante é constitutiva (BRAVO *et al.*,2005)

A variação na incidência de UVB solar em regiões com depleção da camada de ozônio estratosférica altera o crescimento, reduz a produção de biomassa em torno de 50% e aumenta o conteúdo de fenilpropanóides, em especial de ácido p-coumarico, ácido caféico, ácido ferúlico e aumenta também o conteúdo de flavonóides solúveis e insolúveis, principalmente moléculas derivadas da luteolina e orientina (RHULAND *et al.*,2005). De fato, a radiação ultravioleta, a qual estimula a biossíntese de diversos metabólitos secundários, principalmente flavonóides (ALBERDI, 2002). Os genes envolvidos na produção desses compostos fenólicos

apresentam expressão constitutiva maior em espécimes localizados nas regiões de maior incidência de radiação ultravioleta com redução da camada de ozônio estratosférica (DAY, 2001; VAN DER STAAL *et al.*, 2002).

A atividade antioxidante da *D. antarctica* é muito importante para a sobrevivência da espécie nas condições de frio e exposição intensa a ultravioleta (TORRES, 2004). Experimentos de avaliação da expressão gênica diferencial em resposta a baixas temperaturas, situação que também promove a elevação na produção de espécies reativas de oxigênio também mostraram importantes mecanismos moleculares para adaptação em condições extremas (GIDECKEL *et al.*, 2003). Os flavonóides com função antioxidante desempenham papel central nesses mecanismos adaptativos. Embora ainda existam poucos estudos a respeito das estruturas desses derivados fenólicos presentes nessa espécie, os componentes majoritários parecem ser derivados C-glicosilflavonas, a 7-O-metilorientina, o 2'-O-beta-arabinopiranosídeo e a orientina. Os componentes minoritários incluem a 2'-O-beta-arabinopiranosídeo de orientina, isoswertisina, derivados acilados, isoswertiajaponina e tricina (WEBBY & MARKHAM, 1994).

Colobanthus quitensis (Kunth) Bartl Caryophyllaceae (Figura 3) é uma vegetal perene que cresce em áreas de degelo de locais onde ocorre criosolos. É uma planta com distribuição descontínua, principalmente na Ilha Rei George, Arquipélago das Shetland do Sul, onde é freqüente em áreas de degelo, porém inexplicavelmente não ocorre na Península Fildes. *C. quitensis* geralmente crescem associadas com *Deschampsia antarctica*, sendo que em habitats onde o solo é raso predomina a primeira, já onde o solo é mais abundante e profundo predomina a segunda. Ocorrem em locais que não sofrem influência das colônias de aves, porém os espécimes são mais vigorosos em ambientes ricos em nitrogênio, próximo a colônias de aves onde existe guano. Permanece sob o gelo durante o inverno e quando ocorre o degelo reinicia seu crescimento durante o verão, flores anualmente durante no período de dezembro a janeiro. Até o momento não foi identificados animais que se alimentem dessa planta.

Em termos de descrição botânica, apresenta caule simples ou ramificado formando densos e curtos cespedes, ramificações 0,5 – 7 cm; folhas com dimensões 10-25 X 0,6-1,6 mm, lineares até linear triangula, obtuso a sub-pontiaguda, curtamente mucronado, membranácea afilando na base, membranácea, raramente subcoriácea; flores com tamanho equivalente as folhas usualmente excendo; sépalas 4-5 X 0,6-1,6 mm, ovais a triangulares, geralmente obtusa,

curtamente mucronada no ápice, margem membranosa; cápsula equivalente ou raramente excedendo as sépalas; sementes 0,5-1 mm triangulares até reniformes, lisas, vermelho-amarronzada (MOORE,1983).

A incidência de radiação ultravioleta estimula a produção de pigmentos fotossintéticos e o espessamento do mesófilo das folhas de *C. quitensis* (RUHLAND & DAY 2001 e 2005; VAN DER STAAL *et al.*,2002) encontraram um aumento significativo nos níveis de concentração de pigmentos que absorvem UV-B e um nível menor na concentração de clorofila-b em espécimes expostas a ambientes com altas intensidades de radiação UV-B, novamente expondo os mecanismos adaptativos dessa espécie.

Além das duas plantas vasculares, citadas acima, existe o musgo *Polytrichum juniperinum* o qual possui características peculiares, apesar de ser briófita e estar mais abaixo na escala evolutiva. É uma planta perene que cresce em áreas de degelo de locais onde ocorre criosolos exceto em locais com muita umidade como, por exemplo, linhas de drenagem. É uma planta ornitocoprófila, logo não ocorre em áreas que sofrem ação do guano. Permanece sob o gelo durante o inverno e quando ocorre o degelo reinicia seu crescimento durante o verão, raramente forma esporófito. Até o momento não foi identificados animais que alimentam-se dos gametófitos dessa planta. Apresenta por características: gametófitos heterotáticos, verde escuro; caulídeo ereto, simples ou ramificado; região de transição, triangular, arredondada; epiderme mono ou bi-estratificada; células do córtex muito grandes, cilindro central, trilobado. Para esta espécie conforme descrição encontrada na bibliografia ocorre desde a antártica até a Amazônia, mostrando-se desta forma resistente a mudanças drásticas de ambiente sem por isso sofrer grandes alterações.



Figura 3. O continente antártico e as principais espécies de plantas vasculares e briófitas nativas.

Segundo SMITH (2003) o aumento da radiação UV-B não tem efeito negativo sobre *Colobanthus*, *Deschampsia*, e alguns musgos da Antártica. Essa condição provoca o aumento de produção de substâncias fotoprotetoras (flavonóides) (WEBBY & MARKHAM, 1994). Embora estudos fisiológicos e moleculares avaliem a produção dessas moléculas em diferentes tecidos e órgãos dessas espécies, não existem trabalhos avaliando a atividade antioxidante ou fotoprotetora com fins de isolamento de moléculas responsáveis pelo efeito e a respeito dos

mecanismos moleculares envolvidos com fins de obtenção de novas moléculas para quimioprevenção contra radiação ultravioleta.

1.5. Organismos e metodologias utilizadas neste estudo

1.5.1. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular com ciclo eucarioto típico e completo e tem sido amplamente estudada, tornando-se ferramenta importante nas pesquisas biomédicas em razão da sua simplicidade e similaridade genética, bioquímica e funcional com mamíferos em vários aspectos. Dessa maneira, esse organismo é um modelo útil para o melhor entendimento de diversas funções biológicas principalmente na biologia do câncer, estudos de genética toxicológica e doenças humanas. Além disso, é utilizada na indústria química e de alimentos; na indústria farmacêutica, com ênfase na produção de proteínas terapêuticas, incluindo proteínas humanizadas, vacinas e probióticos; e na tecnologia ambiental, com fins de bioremediação, tratamento de resíduos e recuperação do solo (ASTURGEON *et al.*,2006; FORSBURG, 2001; LAFON *et al.*, 2007; LUSHCHAK, 2006; MENACHO-MARQUEZ & MURGUÍA, 2007; SIMON & BEDALOV, 2004; ASTURGEON *et al.*,2006; STEINMETZ ET AL.,2002;).

Algumas das propriedades que fazem a levedura particularmente apropriada para estudos biológicos incluem seu rápido crescimento, segurança, possuir um sistema genético bem definido e mais significativamente, o conhecimento da seqüência completa do seu genoma. *S.cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarioto a possuir o genoma completamente seqüenciado e depositado em bases de dados especializadas (como <http://www.yeastgenome.org>) e também existem ferramentas moleculares apropriadas para manipulação gênica e estudos de expressão, como o transcriptoma, proteoma, metaboloma e interatoma (PEÑA-CASTILLO, L.; HUGHES, T.R., 2007)

Os estudos em levedura foram muito úteis para a elucidação funcional de genes e proteínas, uma vez que existe uma facilidade imensa na construção de linhagens mutantes por meio de disrupção gênica e em estudos de complementação fenotípica por meio de genética reversa (WILLIAMSON,2002). A levedura também possui um sistema de transformação de DNA altamente versátil, sendo viáveis com numeroso marcadores genéticos; plasmídeos podem ser introduzidos nas células tanto como moléculas replicativas, quanto para integração

no genoma. Diferente do que ocorre em outros microrganismos, a integração de uma sequência de DNA procede exclusivamente via recombinação homóloga. Igualmente, a recombinação homóloga, combinada ao alto grau de conversão gênica das leveduras, possibilitou o desenvolvimento de técnicas para substituição direta de seqüências de DNA geneticamente modificadas, no lugar de sua cópia normal no cromossomo. Deste modo, genes intactos, mesmo daqueles dos quais não se conhece mutações, podem ser convenientemente substituídos por alelos modificados. Também exclusivo a leveduras, transformações podem ser conduzidas com oligonucleotídeos sintéticos, permitindo a produção conveniente de numerosas formas alteradas de proteínas. Estas técnicas têm sido extensivamente exploradas em análises que vão desde a regulação até relação estrutura-atividade de proteínas, incluindo mutagênese e reparação (PRINGLE *et al.*, 1997; BROWN & TUIE, 1998; BURKE *et al.*, 2000).

Esse organismo também foi pioneiro em estudos de interação gênica com uso de mutantes e interações proteína-proteína por meio do sistema duplo-híbrido e na compreensão de muitos eventos metabólicos que ocorrem nas organelas citoplasmáticas BOONE, C. *et al.*, 2007).

Ao contrário da maioria dos microrganismos, linhagens da levedura *S. cerevisiae* são estáveis tanto em estado haplóide quanto diplóide. Assim, mutações recessivas podem ser convenientemente isoladas e manifestadas em linhagens haplóides, e testes de complementação e segregação gênica podem ser plenamente estudados em linhagens diplóides.

A levedura é geneticamente bem caracterizada, especialmente quanto à sua resposta a agentes causadores de danos ao DNA nas pesquisas sobre mutagênese e reparo do DNA e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo e homeostase metálica (BRENDEL, *et al.*, 2003; BOEIRA *et al.*, 2002; MARIS *et al.*, 2001; MOURA, *et al.*, 2007; PUNGARTNIK *et al.*, 2002; ROSA *et al.*, 2004).

Os ensaios com leveduras têm sido de grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais ou farmacológicos e servem para complementar os ensaios de mutagenicidade realizados em bactérias (TOUSSAINT & CONCONI, 2006). Esses ensaios são rápidos, sensíveis, econômicos e reprodutíveis, apresentando resultados confiáveis na identificação biológica. Além disto, a levedura possui um sistema endógeno de ativação metabólica constituído por um complexo enzimático (citocromo P-450) e detoxificação, sem a necessidade da adição de um sistema exógeno, sendo, desta forma, uma vantagem sobre os ensaios bacterianos (MORENO *et al.*, 1991; PAULA-RAMOS *et al.*, 1991). Para avaliação de toxicidade genética, experimentos de mutações reversas são os mais comumente utilizados.

Estes se baseiam na restauração ou compensação de um defeito gênico responsável por um requerimento nutricional (ZIMMERMANN, 1975; ZIMMERMANN & SCHEEL, 1984). A restauração se deve à uma reversão exata do defeito original, enquanto que a compensação pode ser devido à uma mutação secundária dentro do gene (mutação supressora interna) ou por uma mutação externa, como no caso dos alelos “nonsense” (HAWTHORNE & LEOPOLD, 1974). Para que seja identificada a mutação reversa é necessário a utilização de uma linhagem com alterações genéticas adequadas, como por exemplo, a linhagem haplóide XV 185-14c (VON BORSTEL *et al.*, 1971). Esta linhagem permite a detecção de dois tipos de mutações locus específicas: reversões do alelo ocre *lys1-1* ou do alelo “missense” *his1-7*, e reversões por deslocamento de quadro de leitura do DNA “frameshift” verificadas no locus *hom3-10*. As células revertentes podem ser detectadas pela semeadura em placas contendo meio seletivo no qual o fator de crescimento inicialmente requerido não está presente, ou está em quantidades muito pequenas, permitindo um “background” de crescimento.

As mutações gênicas resultantes também podem ser facilmente quantificadas usando-se um marcador fenotípico, como por exemplo, a sensibilidade à canavanina. Muitas linhagens selvagens expressam um transportador de arginina chamado Can1p. A canavanina é um análogo estrutural tóxico da arginina. O mesmo transportador que internaliza a arginina, faz a importação de canavanina do ambiente levando as células à morte. Neste sentido, mutações no gene *CAN1*, induzidas por drogas mutagênicas, podem tornar as células resistentes aos efeitos tóxicos da canavanina, aumentando a sobrevivência das células em presença de canavanina quando comparadas a tratamentos não mutagênicos (BRENDDEL & HENRIQUES, 2001).

Muitos agentes químicos e físicos que induzem mutagênese podem aumentar a frequência de recombinação em células diplóides, como um reflexo de danos induzidos no DNA. Algumas substâncias carcinogênicas, no entanto, são negativas em testes que detectam mutagênese, mas induzem recombinação, sugerindo que estes fenômenos podem estar interligados (KUPIEC, 2000). No *crossingover*, ou permuta, ocorre a troca recíproca de segmentos de DNA entre dois cromossomos homólogos, sendo então utilizadas linhagens diplóides heterólogas de *S. cerevisiae* podem ser utilizadas para detecção deste fenômeno (ZIMMERMANN, 1975; PARRY & PARRY 1984; HENRIQUES *et al.*, 1987; KUPIEC, 2000; ROSA *et al.*, 2004).

Além da resposta mutagênica e recombinogênica, os ensaios em levedura permitem investigar os mecanismos moleculares envolvidos na geração e reparação do dano. Um método utilizado para determinação da natureza das lesões induzidas por agentes químicos no DNA,

consiste em comparar a sensibilidade de mutantes deficientes em uma via de reparo do DNA com uma linhagem selvagem isogênica proficiente naquele tipo de reparo (MELO *et al.* 1986; PAULA-RAMOS *et al.* 1991; PASQUAL *et al.* 1993; BOEIRA *et al.*, 2002; ROSA *et al.* 2004). Quando um mutante deficiente em uma via de reparação do DNA apresenta uma sensibilidade maior que a linhagem selvagem proficiente na reparação, pode-se inferir que a substância estudada induz o tipo de lesão incapaz de ser reparada pela mutante. De maneira análoga, linhagens isogênicas deficientes em defesas antioxidantes têm sido utilizadas para o estudo do mecanismo de ação de agentes físicos e químicos que interferem com o estado redox celular (HENRIQUES *et al.*, 1987; BRENNAN & SCHIESTL, 1998; MARIS *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2001; BOEIRA *et al.*, 2002; PICADA *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2005)

Dessa maneira, mais de 1000 laboratórios em todo o mundo já utilizaram este organismo como modelo de estudo, sendo uma excelente ferramenta para desenvolvimento de modelos de biologia celular, molecular e genética (MUSTACCHI *et al.*, 2006)

1.5.2 Ensaio com células de mamíferos

Os ensaios com células de mamíferos em cultura datam de 1968 e as primeiras linhagens celulares utilizadas para esse propósito foram os fibroblastos de pulmão de hamster chinês, conhecida como linhagem V79, e as células de ovário de hamster chinês (BRADLEY *et al.*, 1981).

As células V79 possuem interessantes propriedades para ensaios de toxicologia genética: fácil cultivo e manutenção; crescimento rápido e curto período de adaptação; tempo de geração entre 12 e 16 horas e capacidade de iniciar rápido crescimento exponencial a partir de um pequeno inóculo. Além disso, possuem uma elevada eficiência de clonagem, em torno de 75-95%, pertencem ao gênero masculino e apresentam cariótipo estável (22 ± 1) (BRADLEY *et al.*, 1981). Essas células recuperam-se rapidamente após estoque em nitrogênio líquido, o que permite criopreservação sem afetar características celulares e comprometer os ensaios, graças a baixa frequência de mutação espontânea (BRADLEY *et al.*, 1981). Sendo assim o emprego de células V79 em estudos de genotoxicidade é indiscutível. Para avaliação de lesões ao DNA utiliza-se principalmente o ensaio cometa.

Os elementos básicos de estruturas e reparação de DNA nas células V79 são similares, mas não idênticos, aos de células humanas. De tal forma, as conseqüências da interação química de xenobióticos com o DNA seja de células humanas seja de células V79 é similar. Portanto, os resultados obtidos em células V79 são extremamente relevantes para humanos,

sendo inclusive mais importantes que a extrapolação dos dados obtidos em procariotos (BRADLEY *et al.*, 1981). As células V79 têm sido amplamente empregadas em estudos de diversas áreas, como estresse oxidativo (KANG *et al.* 2005; KIM *et al.* 2007), mutagênese e reparação de DNA (BAUM *et al.* 2005; CAMPA *et al.* 2004; DENG *et al.* 2006; HU *et al.* 2006; JAGETIA *et al.* 2007; OSADA *et al.* 2005; SLAMENOVA *et al.* 2007; SPEIT *et al.* 2007).

1.5.3. Ensaio Cometa

O ensaio cometa combina a simplicidade da técnica bioquímica de detecção de quebras no DNA com a utilização de poucas células e corresponde a um ensaio citogenético. As vantagens dessa técnica incluem rapidez, baixo custo, sensibilidade na detecção de dano no DNA, obtenção de dados em células individuais e o uso de um pequeno número de células para análise. Este ensaio tem a possibilidade de aplicação, teoricamente, em qualquer suspensão de células eucarióticas, independente destas estarem em proliferação ou não (COLLINS *et al.*, 1997; COLLINS, 2004; HARTMANN *et al.*, 2001) O teste Cometa ou eletroforese de célula única em gel foi descrito por Östling e Johanson, em 1984 e o princípio básico do ensaio leva em conta o comportamento do DNA em células individualizadas e sua organização dentro do núcleo. Para a realização do ensaio, as células são embebidas em agarose, têm as suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares extraídas com altas concentrações de sais, restando apenas o nucleóide (parte de DNA do núcleo). Quando o DNA é submetido à eletroforese, ele migra no gel de agarose, sendo esta migração relacionada com o tamanho da molécula. Pequenos fragmentos migram com maior velocidade que a matriz nuclear. Desta forma, células com DNA danificado formam, após a migração, a figura de um cometa, consistindo de uma cabeça (matriz nuclear) e uma cauda (DNA quebrado). A extensão que o DNA migrou está, muitas vezes, correlacionada com a quantidade do dano ocorrido, sendo uma cauda mais longa indicação de um grau maior de quebra no DNA (TICE, 1995; COLLINS *et al.*, 1997; LEE & STEINERT, 2003; VILLELA *et al.*, 2007)

O ensaio cometa é um teste de genotoxicidade que detecta danos primários no DNA, induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (Lee e Steinert, 2003; Villela et al. 2003 e 2007). Portanto, é capaz de detectar em células individuais, quebras simples e duplas de fita de DNA, eventos de reparo por excisão incompletos, lesões alcalilábéis, danos oxidativos em bases do DNA e crosslinks entre DNA-DNA, DNA-proteína e DNA-droga (SINGH, 2000;

BOLOGNESI *et al.*, 2004), sendo possível quantificar o dano mas não identificar com clareza qual desses eventos foi responsável pela indução deste.

Existem dois protocolos principais disponíveis para execução do teste, estabelecidos de acordo com o pH: a) versão neutra (pH 7-8), conforme o método original de Östling e Johanson (1984) que utiliza eletroforese em tampão com pH neutro, detectando quebras duplas nas moléculas de DNA e “crosslinks”; e b) versão alcalina (pH > 13), desenvolvida por SINGH *et al.* (1998) a partir do método original, que realiza a eletroforese em tampão alcalino, produzindo assim desnaturação do DNA e detectando quebras de fita única e dupla, sítios alcalilábeis, ligações cruzadas e sítios de reparação por excisão incompletas. Este protocolo é o mais utilizado por ser o mais abrangente, pois além de detectar danos diretos, torna possível a detecção de danos indiretos como lesões por metilação e adutos, os quais, sendo alcalilábeis, se expressam como quebras simples frente ao tratamento alcalino usado no ensaio. Pode ainda ser utilizado o protocolo levemente alcalino com eletroforese em tampão com pH 12,1, que se diferencia do pH > 13 por não detectar danos alcalilábeis (Tabela 1) (LEE & STEINERT, 2003; VILLELA *et al.*, 2003; VILLELA *et al.*, 2007; TICE *et al.*, 2000).

Tabela 1: Correlação entre o valor de pH da eletroforese do ensaio cometa com o tipo de dano no DNA que pode ser detectado.

<i>Tipo de dano</i>	<i>pH 7-8</i>	<i>pH 12,1</i>	<i>pH > 13</i>
Quebras duplas	X	X	X
Quebras simples		X	X
Reparo por excisão		X	X
Crosslinks	X	X	X
Danos alcalilábeis			X

O ensaio cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação.

Diferente das mutações, as lesões detectadas por este teste podem ser reparadas (LEE E STEINERT, 2003; COLLINS *et al.*, 1997). A análise dos resultados pode ser realizada visualmente em microscópio óptico normal, quando as células são coradas com nitrato de prata ou em microscópio de fluorescência quando coradas com brometo de etídeo. As células são classificadas de acordo com o tamanho da cauda em relação à cabeça (núcleo) em 4

classes de danos: classe 0: sem cauda (sem dano); classe 1: com uma pequena cauda menor que o diâmetro da cabeça; classe 2: com o comprimento da cauda entre uma e duas vezes o diâmetro da cabeça; classe 3: com uma cauda longa superior a duas vezes o diâmetro da cabeça; e classe 4: cauda longa e mais espalhada (em forma de leque) do que a classe 3 (Figura 4). Atualmente, a importância e o interesse aumentado pelo teste Cometa levou ao desenvolvimento de sistemas analisadores de imagens, que servem para quantificar a cromatina que migrou para fora do núcleo (COLLINS *et al.*, 1997; VILLELA *et al.*, 2007).

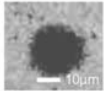
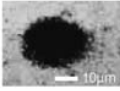
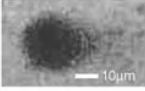
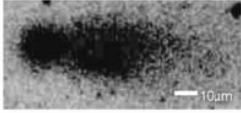

Células Cometa	Cabeça/Cauda	Classe de Danos
	Sem Cauda	0
	≤ 1	1
	1 – 2	2
	≥ 2	3
	Sem Cabeça	4

Figura 4. Diferentes classes de danos (adaptado de: Villela *et al.*, 2007).

O ensaio cometa fornece uma informação um pouco limitada a respeito dos danos ao DNA, uma vez que não é possível distinguir lesões que não manifestem-se como quebras de cadeia, como por exemplo, as oxidações das bases nitrogenadas. Uma alternativa para aumentar a especificidade dos danos reconhecidos pelo teste e assim, torna-lo mais sensível a lesões do DNA, é o emprego de endonucleases de reparação de DNA antes da eletroforese. Quando os nucléoides são incubados com essas enzimas, os sítios específicos reconhecidos por esses agentes são incisados e a partir disso, geram uma quebra de cadeia de DNA que pode então ser detectada pelo ensaio cometa. Dessa forma, a diferença entre o índice de dano de uma amostra

tratada com uma enzima de reparação de DNA para um dano específico e a mesma amostra não tratada (ou incubada somente com o tampão de reação) fornece a quantificação da lesão em análise. Essa adaptação torna o ensaio cometa uma poderosa ferramenta na elucidação dos mecanismos genotóxicos (GIOVANNELLI *et al.*, 2003; SAUVAGIO *et al.*, 2002). As enzimas mais empregadas estão envolvidas na remoção de danos oxidativos, como a endonuclease III (EndoIII) e a formamidopiridina DNA glicosilase (Fpg), que detectam purinas e piridinas oxidadas respectivamente (DIZDAROGLU 2005; KARAKAYA *et al.*; 1997). Para identificação da formação de dímeros de pirimidina pode ser utilizada a endonuclease V (EndoV) (SAN CAR,2000).

1.5.4. O molusco *Cantareus aspersus* como modelo de estudo

O molusco *Cantareus aspersus* (anteriormente *Helix aspersa*) é um organismo amplamente utilizado como biomonitor, por ser bastante resistente, possuir aclimatação fácil e já existir descrição para o ensaio cometa para moluscos terrestres em avaliação ecotoxicológica. Além disso, a aplicação do ensaio cometa empregando radiação ultravioleta em outros moluscos tem sido recentemente descrita com sucesso, sem a necessidade de uso de agentes químicos tóxicos e mutagênicos (VILLELA *et al.*, 2007). Resultado similar, quanto ao uso de UV como controle positivo, foi observado recentemente para mexilhão-dourado (VILLELA *et al.*, 2007).

A eficiência de *C. aspersus* no monitoramento ambiental já foi descrito anteriormente em relação à dosagem de metais e atividade do citocromo P450 em resposta a exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (ISMERT, 2002, YASOSHIMA & TAKANO, 2001). Este último trabalho também sugere o *C. aspersus* seja um bom biomonitor por apresentar metabolismo tão complexo quanto mamíferos, demonstrando diferenças entre tecidos e efeito dose-resposta para naftaleno (YASOSHIMA & TAKANO, 2001).

Objetivos



Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito fotoprotetor dos extratos de *Polytrichum juniperinum*, *Deschampsia antarctica* e *Colobanthus quitensis*, in vivo e in vitro utilizando diversos modelos biológicos e inferir o grupo de metabólitos secundários envolvidos no efeito protetor assim como sugerir um mecanismo para esse processo.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar o efeito genotóxico e mutagênico do extrato metanólico bruto de *Polytrichum juniperinum*, *Deschampsia antarctica* e *Colobanthus quitensis* provenientes da Antártica na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (linhagem V79) em cultura e no molusco *Cantareus aspersus*.

2.2.2. Determinar o potencial antigenotóxico e antimutagênico do extrato dessas plantas em linhagens de *S. cerevisiae* proficiente e deficiente em reparação por fotoreativação expostas à radiação UVC.

2.2.3. Avaliar o efeito fotoprotetor dos extratos dessas plantas em culturas de células V79 expostas à radiação, utilizando o Ensaio Cometa alcalino.

2.2.4. Identificar que tipos de lesões induzidas pela radiação UVC são fotoprotetidas pelos extratos dessas três plantas em células V79, utilizando a versão modificada do teste cometa com enzimas endonucleases de reparação de DNA.

2.2.5. Identificar os principais grupos químicos de metabólitos secundários presentes nos extratos dessas plantas e quantificar o conteúdo total de flavonóides.

2.2.6. Correlacionar o possível efeito fotoprotetor observado contra a radiação UVC com os grupos químicos presentes nos extratos.



Capítulo I

Protective effects of three extracts from Antarctic plants against ultraviolet radiation in several biological models

Submetido para

Environmental and molecular mutagenesis

Protective effects of three extracts from Antarctic plants against ultraviolet radiation in several biological models

Betina Kappel Pereira¹, Renato Moreira Rosa¹, Temenouga Nikolova Guecheva¹, Alexandre Ferraz², Juliana da Silva², Antônio Batista Pereira³, João Antonio Pêgas Henriques^{1,2*}.

¹Centro de Biotecnologia e Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15005, 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

²Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil, 92425-900, Canoas Rio Grande do Sul, Brasil.

³Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.

* Corresponding author

Prof. João Antonio Pêgas Henriques

Departamento de Biofísica- Prédio 43422- Laboratório 210

Campus do Vale – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Avenida Bento Gonçalves 9500, Bairro Agronomia–CEP 91501-970

Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 51 33086069

Fax: +55 5133087003

E-mail: pegas@cbiot.ufrgs.br

ABSTRACT

This study aimed at deepening the knowledge on the photoprotective effects of three Antarctic plant species – *Deschampsia antarctica* Desv., *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl., and *Polytrichum juniperinum* Hedw. We investigated the protective effect against UV-induced DNA damage in a permanent lung fibroblast cell line derived from Chinese hamsters (V79 cells), and in the snail *Cantareus aspersus*, using the comet assay. The protective, mutagenic, and antimutagenic profile of these extracts also was evaluated using haploid strains of *Saccharomyces cerevisiae*. At the concentration range employed, the extracts were not cytotoxic or mutagenic to *S.cerevisiae*. In addition, the treatment with these extracts enhanced survival, and decreased induced reverse, frameshift, and forward mutations in a dose-response manner in all UV-C doses employed. In addition, they did not generate DNA strand breaks in V79 cells, and the treatment significantly decreased DNA damage induced by UVC. These extracts significantly decreased UVC-induced lipid peroxidation in V79 cells, showing a clear antioxidant property. Moreover, results of comet assay cells, employing Fpg, EndoIII, and Endo V endonuclease in these cells, demonstrated significant reduction of UVC-induced DNA damage, oxidative damage, and production of cyclobutane pyrimidine dimers after pre-incubation with these extracts. The treatment with all tested extracts were much less efficient against UVC-induced cytotoxicity in the yeast strain defective in photolyase as compared to the wild type strain, suggesting that this DNA repair pathway is stimulated by substances present in the extracts. In *C. aspersus*, the treatment was able to protect against UVC-induced damage. In conclusion, *D. antarctica*, *C. quitensis*, and *P. juniperinum* extracts present photoprotective properties, which can be attributed to molecules, such as flavonoids and carotenoids, which act as UV-sorbing molecules and as antioxidants, as well as stimulate DNA-repair processes.

KEYWORDS: *Deschampsia antarctica* Desv., *Colobanthus quitensis* Bartl., *Polytrichum juniperinum*, photoprotection, ultraviolet radiation, yeast

1. INTRODUCTION

Several studies suggest that a large fraction of human cancers can be attributed to environmental risk factors, and hence can be prevented by avoiding exposure to identified causative factors. However, cancer causation is largely exogenous, and considerable attention has been recently focused on a new alternative approach, called chemoprevention. The term 'chemoprevention' refers to the reduction of cancer risk by favoring the intake of specific protective factors in order to suppress or to reverse the carcinogenic process [1].

In the last few years, attention has focused on the anticancer properties of plant secondary metabolites, and their important role in disease prevention [2]. Many plant extracts have exhibited potent cancer chemopreventive property, as shown in research studies published during in the last decade [1,3-5]. Most of these extracts are known to exert their antioxidant effects either by quenching reactive oxygen species (ROS), or by stimulating cellular antioxidant defenses [6-8].

The skin, as an interface between the body and its environment, acts as a barrier against the harmful effects of various exogenous physical and chemical agents, including ultraviolet (UV) radiation [9]. Therefore, the overexposure to UV radiation is linked to the development of severe burns, hyperpigmentation, photoallergy and phototoxicity, skin cancer and chronic skin damage, and premature skin aging [10,11]. Previous studies indicated that many effects of UV radiation, including carcinogenesis, solar erythema, and premature skin aging, are associated with the generation of ROS (reactive oxygen species) [10]. ROS are capable of damaging most cellular constituents, including DNA, either by direct action on DNA or through reaction with other cellular constituents to produce ROS. The major form of oxidative DNA damage are DNA single-strand breaks and modified bases, which results in DNA breaks or alkali-labile sites during the repair process, and which can be detected by comet assay [7,12,13]. At a molecular level, UV radiation also directly damages DNA, and the cyclobutane pyrimidine dimers are the main formed products, capable of interfering with DNA replication, which is important in photo-induced carcinogenesis [14,15]. Although the skin possesses an elaborate system to deal with UV-induced damage, the use of active photoprotectives is recommended, and hence the need to develop protective reagents is an active field of study. In recent years, natural compounds, which possess antioxidant and anti-inflammatory properties, have been

subject of considerable interest as protective agents for reducing UV-induced skin damage [5,8,16,17].

The aim of this work was to deepen our knowledge on the photoprotective effects of three Antarctic plant species – *Deschampsia antarctica* Desv., *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. and *Polytrichum juniperinum* Hedw. We investigated the protective effect against UV-induced DNA damage in a permanent lung fibroblast cell line derived from Chinese hamsters (V79 cells) and in the snail *Cantareus aspersus*, using comet assay. The protective, mutagenic, and antimutagenic profile of these extracts also was evaluated using haploid strains of the simple eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. This information is very important for the assessment of the safety of a possible future pharmacological application of these extracts, and to explore their potential pharmacological properties.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Chemicals

All the solvents were bi-distilled, and stored in dark flasks. Anhydrous sodium sulfate was of analytical grade, and heated at 300°C before used. Amino acids (L-histidine, L-threonine, L-methionine, L-tryptophan, L-leucine, L-lysine), nitrogen bases (adenine and uracyl), L-canavanine, quercetin, and narigenin were purchased from Sigma (St. Louis, USA). Yeast extract, Bacto-peptone, and Bacto-agar were obtained from Difco Laboratories (Detroit, MI, USA). Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, L-glutamine, and antibiotics were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). Low-melting point agarose and agarose were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). T4 endonuclease V (Endo V) was kindly provided by Dr. Carlos F. M. Menck, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences – University of Sao Paulo, Brazil. Formamidopyrimidine DNA-glycosylase (FPG, also known as MutM), and endonuclease III (EndoIII, also known as Nth) were obtained from BioLabs (New England).

2.2 Plant material

The plants *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*), *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*), and *Polytrichum juniperinum* Hedw. (*Bryophyta* – *Polytrichaceae*) were collected in the ice free-areas near Arctowski Polish Station Region, Admiralty Bay, King

George Island (61°50' - 62°15' S and 57°30' - 59°00' W), Antarctica. The plants were dried at 40°C, stored in dark bags, and stored in a freezer.

2.3. Preparation of methanolic crude extract

The dried and powdered aerial parts of *Deschampsia*, *Colobanthus*, and *Polytrichum* were submitted to extraction using methanol (powder/solvent ratio = 1:10 w/v) by maceration (3 x 24h) at room temperature. The mixture was evaporated to dryness under reduced pressure at rotary evaporator at 40-50°C to obtain the crude extract.

2.4. Phytochemical screening

The preliminary chemical analysis of the secondary metabolite groups of the three species was performed using standard screening methods [18]. Thin layer chromatography (TLC) analyses of the methanolic crude extracts were performed to detect the presence of flavonoids and phenolic acids, according to methods described by Wagner and co-workers [19]. TLC was carried out on silica gel GF254, using ethyl acetate: acetic acid: formic acid: water (100:11:11:27) and chloroform/methanol (9:1) as eluent. The standards of the substances utilized for comparing the R_f values, as well as chromatography experiments, were: guajaverin, 3-methoxy-quercetin, hiperoside, quercetin, rutin, isoquercetin, luteoline, chlorogenic acid, kaempferol. Chromatograms were sprayed with Natural Reagent/PEG 4000, and visualized at 365-nm wavelength. The flavonoids and the phenolic acids used as reference substances appear as orange-yellow and blue spots, respectively.

2.5. Determination of total flavonoids, flavones, and flavonols

Flavones and flavonols were expressed as quercetin equivalents [20]. Quercetin was used to build the calibration curve (standard solutions of 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 80.0 and 100.0 mg/mL) in 80% ethanol (V/V). Briefly, 0.5 mL of an extract was mixed with 1.5 mL of 95% ethanol (V/V), 0.1 mL of 10% aluminum chloride (m/V), 0.1 mL of 1 mol/L potassium acetate and 2.8 mL water. The volume of 10% (m/V) aluminum chloride was replaced by the same volume of distilled water in the blank. After incubation at room temperature for 30 minutes, the absorbance of the reaction mixture was measured at 415 nm. Flavanones in the sample were expressed as naringenin equivalents. Naringenin was used to build the calibration curve (standard solution of 0.125, 0.25, 0.30, 0.50, 1.00 and 2.00 mg/mL in methanol). One mL of an

extract was separately mixed with 2 mL of 1% 2,4-dinitrophenylhydrazine (m/V) and 2 mL of methanol at 50 °C over a water-bath for 50 min. After cooling to room temperature, the solution was mixed with 5 mL of 1% potassium hydroxide (m/V) in 70% ethanol (V/V). Then, 1 mL of the mixture was removed, centrifuged at 1000 g for 10 min, and the supernatant was filtered through Whatman No. 1 filter paper. The filtrate was adjusted to 25 mL. The absorbance of the filtrate was measured at 495 nm.

2.6. Assays with *Saccharomyces cerevisiae*

2.6.1. Strains and media

The haploid strains XV185-14c (*MAT α ade2-2 arg4-17 his1-7 lys1-1 trp5-48 hom3-10*), and N123 (*MAT α his1-7*) were used for mutagenesis evaluation. The strain defective in DNA photolyase encoded by *PHR1* gene (*MAT α his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0 phr1::KanMX4*) and its isogenic wild type strain, BY4741, purchased from EUROSCARF, were employed in the investigation of mechanism of the protective effect. Media, solutions, and buffers were prepared according to Burke and co-workers [21]. Complete medium YPD, containing 0.5% yeast extract, 2% bacto-peptone, and 2% glucose, was used for routine growth of yeast cells. For plates, the medium was solidified with 2% bactoagar. The minimal medium (MM) contained 0.67% yeast nitrogen base with no amino acids, 2% glucose, and 2% bacto-agar was supplemented with the appropriate amino acids. The synthetic complete medium (SC) was MM supplemented with 2 mg adenine, 2 mg arginine, 5 mg lysine, 1 mg histidine, 2 mg leucine, 2 mg methionine, 2 mg uracyl, 2 mg tryptophan, and 24 mg threonine per 100 mL MM. For mutagenesis of the XV-185-14c strain, the omission media lacking lysine (SC-lys), histidine (SC-his), or homoserine (SC-hom) were used. For assays of forward mutation of the N123 strain, the syntethic medium with no arginine was supplemented with 60 μ g/mL canavanine.

2.6.2. Yeast growth and UVC exposure

Stationary-phase cultures were obtained by inoculation of an isolated colony into liquid YPD, and, after 48 h incubation at 30 °C with aeration by shaking, the cultures grew to $1-2 \times 10^8$ cells/mL. Cells were harvested, and washed twice with phosphate buffered saline solution (PBS; Na₂HPO₄, and NaH₂PO₄; 20mM; pH7.4). Cell concentration and percentage of budding cells in each culture were determined in a Neubauer chamber by microscope counts. For

irradiation with UVC, cells were plated onto appropriated medium, and exposed to a given dose of ultraviolet light (254 nm) at room temperature in a dark room, using Stratalinker UV Crosslinker 1800 (Stratagene, California). After exposure, plates were incubated in the dark at 30°C for 3-5 days.

2.6.3. Detection of reverse and frameshift mutation in *S. cerevisiae*

A suspension of 2×10^8 cells/mL in stationary growth phase was incubated at 30 °C for 3 h with various concentrations of each methanolic crude extract in PBS. When the protective effect was investigated, cells were incubated with these extracts, washed, and plated onto adequate media for UVC exposure. Cell survival was determined on SC (3-5 days, 30 °C), and mutation induction (LYS, HIS or HOM revertants) on the appropriate omission media (7-10 days, 30 °C). Whereas *his1-7* is a non-suppressible missense allele, and reversions result from mutation at the locus itself [22], *lys1-1* is a suppressible ochre nonsense mutant allele [23,24], which can be reverted either by locus-specific or by a forward mutation in a suppressor gene [23,25]. True reversions and forward (suppressor) mutations at the *lys1-1* locus were differentiated according to Schuller and von Borstel [26], where the reduced adenine content of the SC-lys medium shows locus reversions as red colonies, and suppressor mutations as white colonies. It is believed that *hom3-10* contains a frameshift mutation due to its response to a series of diagnostic mutagens [25]. Assays were repeated at least four times, and plating was performed in triplicate for each dose.

2.6.4. Detection of forward mutation in *S. cerevisiae*

The N123 strain was used for this analysis [27]. A suspension of 2×10^8 cells/mL in stationary growth phase was incubated at 30 °C for 3 h with various concentrations of each methanolic crude extract in PBS. When the protective effect was investigated, cells were incubated with these extracts, washed, and plated onto adequate media for UVC exposure. Appropriate dilutions of cells were plated onto SC plates to determine cell survival, and onto SC media supplemented with 60 µg/mL canavanine for determination of forward mutation in locus *CAN1*. In order to determine protective effect, cells were exposed to UVC, and after 4-5 days incubation at 30 °C, mutants were counted.

2.6.5. Investigation of the role of DNA photolyase role in the protective effect of the extracts

For this purpose, survival assays were performed using wild type and *phr1*Δ strains treated with the extracts before exposure to UVC. Relative sensitivity was assayed by suspending 2×10^8 cells/mL of stationary cultures in 1 mL PBS containing different concentrations of each extract and incubation with aeration by rotary shaking at 30 °C for 3 h. After this treatment, appropriate dilutions of cells were plated onto SC plates, and exposed to UVC. Immediately after irradiation, all plates were submitted to photoreactivation with 6 kJ/m² at 360 nm using Stratalinker UV Crosslinker 1800 (Stratagene, California) as described elsewhere [28]. Plates were incubated at 30 °C for 3–5 days before counting the surviving colonies. Assays were repeated at least three times, and plating was performed in triplicate for each dose.

2.7. Assays in V79 cells

2.7.1. Cell culture and treatments

V79 cells were cultured under standard conditions in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated-FBS, 0.2mg/mL L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. Cells were kept in tissue-culture flasks at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air, and then harvested by treatment with 0.15% trypsin-0.08% EDTA in PBS. Cells were seeded (3×10^6 cells) in 5 mL complete medium in a 25-cm² flask, and grown for 2 days up to 60-70% confluence before treatment with the test substance. Extracts were thawed, dissolved in sterile distilled solution, filtered in 0.22 µM, , diluted, and added to the culture medium to achieve the different designed concentrations. Cells were incubated with the extracts for 3 h in FBS-free medium, and, in order to determine the protective effect, cells were washed and exposed to UVC.

For UVC irradiation , the medium was removed after incubation, and the monolayer rinsed with PBS pH7.4. PBS pH 7.4 was added to each dish , and PBS layer thickness was about 1.8 mm. Cells were exposed to a defined dose of ultraviolet light (254 nm) at a rate of 0.3 J/m²/s at room temperature. UVC dosimetry was performed in air with Black-Ray Ultraviolet Meter, USA. In order to reduce incident energy, irradiation was performed through a double layer of a UVC transmissible plastic film. Irradiation dose was 5 J/ m².

2.7.2. Cytotoxicity evaluation by colony-forming ability (Clonal survival)

V79 cells presenting exponential growth were treated according to the experimental protocol. Thereafter, they were trypsinized, and 500 cells/60mm dish were seeded in triplicate to determine colony-forming ability. An aliquot of the extract was added after attachment (4h). After 5 days of incubation, colonies were fixed with formaldehyde 3%, stained with Giemsa, counted, and their survival was calculated as a percentage relative to the control treatment.

2.7.3. Comet assay

Alkaline comet assay was performed as described by Singh et al. [29], with minor modifications [30,31]. After treatment, cells were washed with ice-cold PBS, trypsinized, and resuspended in complete medium. Then, 20 μ L of cell suspension (3×10^6 cells/mL) were dissolved in 0.75% low-melting point agarose, and immediately spread onto a glass microscope slide pre-coated with a layer of 1% normal melting point agarose. Agarose was allowed to set at 4°C for 5min. Slides were then incubated in ice-cold lysis solution (2.5M NaCl, 10mM Tris, 100mM EDTA, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH10.0) at 4°C for at least 1hr in order to remove cell membranes, leaving DNA as “nucleoids”. In the modified Comet assay, slides were removed from the lysing solution, washed three times in enzyme buffer (40 mM Hepes, 100 mM KCl, 0.5 Mm Na₂EDTA, 0.2 mg/mL BSA, pH 8.0), and incubated with 70 μ L T4 Endo V (30 min 37°C), FPG (30 min 37°C), or EndoIII (45 min 37°C). Slides were placed on a horizontal electrophoresis unit, and incubated with fresh buffer solution (300mM NaOH, 1mM EDTA, pH 13.0), for 20min at 4°C in order to allow DNA unwinding and expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was conducted for 20min at 25V (300mA). All the above steps were performed under yellow light or in the dark in order to prevent additional DNA damage. Slides were then neutralized (0.4M Tris, pH 7.5), washed in bi-distilled water, and stained using silver staining protocol described in [32]. After the staining step, gels were left to dry at room temperature overnight, and analyzed using an light microscope. One hundred cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed for each treatment. During the analysis, edges and cells around air bubbles were ignored, as recommended in [33]. Cells were visually scored according to tail length into five classes: (1) class 0: undamaged, with no tail; (2) class 1: with tail shorter than the diameter of the head (nucleus); (3) class 2: with tail length 1–2x the diameter of the head; (4) class 3: with tail longer than 2x the diameter of the head, and (5) class 4: comets with no heads. Two parameters, Damage index (DI) and Damage frequency (DF), were used in our analyses to evaluate DNA damage. A damage index was calculated for each

sample, and ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells x 4) [30-33]. Damage frequency (%) corresponds to the percentage of cells with tail (classes 1-4) in each sample. Vehicle was used as negative control.

2.7.4. Measurement of lipid peroxidation

The possible extent of lipid peroxidation induced by Antarctic plants and their effects on UVC-induced lipid peroxidation was determined by the reaction of TBA with malondialdehyde (MDA), a product formed by lipid peroxidation. Assays were performed according to Salgo and Pryor [34], with minor modifications. V79 cells (3×10^6 cells) were treated as described above, and lysed with Tris-HCl (15mM for 1 hr). Two mL 0.4mg/mL TCA, 0.25M HCl were added to the lysate, which was then incubated with 6.7mg/mL TBA at 100 °C for 15min. The mixture was centrifuged at 750 x g for 10min. As TBA reacts with other products of lipid peroxidation in addition to MDA, results are expressed as thiobarbituric reactive species (TBARS), which were determined by absorbance at 532nm. Hydrolyzed TMP was used as the standard. The results were normalized by protein content [35].

2.8. Assays in *Cantareus aspersus*

2.8.1. Animals and treatment

Adults of the snail *C. aspersus*, a terrestrial mollusk, were used. This animal was recently used as a bioindicator in ecotoxicological studies and in genetic toxicology [36,37]. Two weeks were required for acclimation, under temperature conditions of 21-24°C, and a 12-hour photoperiod in blank light. Organic (free from agrochemicals) lettuce and water were supplied *ad libbitum*. Animals were kept in propylene cages. Each group consisted of 7 animals. The control group was fed only lettuce, whereas the test groups were fed on the species of plants under study during the 1st week. In order to evaluate the genotoxicity of the extracts, a hemolymph sample was collected by aspiration with a 3ml syringe, which was introduced in the mollusk shell. In order to evaluate the potential photoprotective effect, hemolymph cells from animals fed with the tested plant species or with lettuce (control group) were spread on microscopic plates and exposed to radiation UVC 4.5 J/m².

2.8.2. Comet assay

Comet assay was performed as described by Silva and co-workers, and Hartmann and co-workers with some modifications [38-40]. After treatment, hemolymph cells were dissociated in DMEM, dissolved in 0.75% low-melting point agarose, and immediately spread onto a glass microscope slide, pre-coated with a layer of 1% normal melting point agarose. Subsequent steps and analysis were performed as described above for V79 cells.

2.9. Statistical analysis

All results are expressed as mean \pm SD, and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), and means were compared by Tukey's or Dunnet's test, with $P < 0.05$ being considered as statistically significant.

3. RESULTS

3.1. Phytochemical screening and flavonoid content

Flavonoids were detected among the secondary metabolite classes evaluated in the methanolic crude extract, using simple screening tests. Through the analyzed TLC, the qualitative preliminary presence of the following molecules is suggested: isoquercetin, quercetin derivatives, and rutin in the methanolic extract of *D. antarctica*, and luteolin and chlorogenic acid in *C. quitensis* (data not shown). Quantitative determination results that *D. antarctica* methanolic crude extract presented higher total flavonoid content (28.36%), mainly consisting of flavonols and flavones (24.12%), as compared to *C. quitensis* (15.78%) and *P. juniperinum* (6.15%). *D. antarctica* flavanone content, as compared to flavonols and flavones, was higher in *C. quitensis* (7.91%) as compared to *D. antarctica* (4.24%) and *P. juniperinum* (5.07%).

3.2. Antimutagenic effect of the extracts in yeast

Table 1 shows the response of wild type yeast cells treated with the methanolic crude extracts of Antarctic plants. At a dose range of 1-10 mg/mL, these extracts were not cytotoxic or mutagenic in *S. cerevisiae*. Moreover, Table 2 shows that pre-treatments with extracts improved the survival and decreased the induced reverse, frameshift and forward mutations in all UVC doses employed in a dose response manner, and the best result was obtained at 10 mg/mL. Therefore, these extracts contain molecules that have beneficial effects of protecting against UVC-induced cell damage, as well as of rescuing UVC-damaged cells.

3.3. Involvement of DNA photolyase in the protective effect of the extracts in yeast

Figure 1 shows that the extracts of all tested methanolic crude extracts were not cytotoxic to wild type or *phr1* Δ mutant strains in the employed concentration range (panel A). In addition, as expected, *phr1* Δ mutant was very sensitive to UVC-induced cytotoxicity (panels B, C, and D). Panels B, C, and D show that the pre-treatment with the extracts of Antarctic species increases wild type and *phr1* Δ mutant strains survival after UVC exposure, indicating a photoprotective effect. However, the increment in survival of the *phr1* Δ mutant was very weak.

3.3. Protection against UVC-induced DNA damage in V79 cells

Figure 2 shows the response of cells that were pre-treated with the extracts before exposure to 5 J/m² UVC. At the dose range of 5-10 mg/mL, treatment improved survival, indicating that the extracts were able to protect V79 cells against UVC cytotoxicity.

We also investigated the genotoxic effects and the anti-genotoxic properties of the plant extracts in V79 cells. The alkaline (pH >13) comet assay is the most frequently used assay for routine screening of potential genotoxic agents, and can be performed with a variety of cell types, including V79 cell lines [41]. Table 3 shows that the treatment with the methanolic crude extracts of Antarctic species – *D. antarctica*, *C. quitensis*, and *P. juniperinum* - did not generate a significant amount of DNA strand breaks in V79 cells as compared with the negative control, at the evaluated concentration range, as detected by standard comet assay. Moreover, the exposure of V79 cells to 5 J/m² UVC resulted in a significant increase in DNA damage parameters DI and DF, whereas pre-treatment significantly prevented DNA damage induced by UVC in a dose-response manner.

While the alkaline version of the comet assay detects DNA single- and double-strand breaks and alkali-labile sites, the modified comet assay is more specific than the standard method. In this version, there is an incubation step of lysed cells with lesion-specific endonucleases, which recognizes certain damaged bases and creates breaks [42]. In this study, we used FPG, which is specific for oxidized purines, including 8-oxo-7,8-dihydroguanine, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine, and 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine, as well as other ring-opened purines; EndoIII, which recognizes oxidized pyrimidines, including thymine glycol and uracyl glycol, and Endo V endonuclease, a pyrimidine dimer-specific DNA repair enzyme [43].

Table 4 shows that, in cells exposed to UVC radiation, oxidative DNA damage was significantly higher when cells were incubated with endonuclease DNA-repair enzymes, which recognized oxidized purines, oxidized pyrimidines, and pyrimidines dimers, as compared to enzyme buffer only treatment, as expected. None of the treatments with the extracts induced significant oxidative damage as recognized by these DNA-repair enzymes, as expected (data not shown). Indeed, when DI increase was evaluated after incubation with these enzymes in pre-treated cells as compared with cells only exposed to UV, the extension of oxidative DNA damage, as recognized by FPG and EndoIII enzymes, significantly decreased, as shown in Table 4 and Figure 3. In addition, DI after incubation with Endo V was also significantly reduced (Figure 3), indicating a parallel decrease in pyrimidine dimers formation and therefore, stressing the photoprotective effect.

3.4. Effects on lipid peroxidation in V79 cells

In order to determine the effect of the extracts on oxidative damage triggered by UVC, we examined the degree of lipid peroxidation in V79 cells. As shown in Figure 4, cell treatment with UVC resulted in an increase in TBARS production, whereas lipid peroxidation significantly decreased in those treated with each extract before exposure to UVC, in a dose-response manner.

3.4. Effects of the extracts in *Cantareus aspersus*

Figure 5 shows that hemolymph cells of animals fed *D. antarctica* and *P. juniperinum* did not present significant difference in DNA damage as compared to the control group. However, animals fed *C. quitensis* showed significant DNA damage, suggesting the occurrence of genotoxins in this species. Hemolymph cells exposed to UVC showed significant higher DNA damage as compared to control. In the groups fed either *Deschampsia* or *Polytricum* a reduction in DNA damage parameters was observed, suggesting that the treatment was able to protect against UVC-induced damage. In the *C. quitensis*-fed group, DNA damage after UVC exposure was less extensive than in the control group, indicating that although this plant can be genotoxic to *C. aspersus*, an indication of protective effect also is present in the biological response to UVC.

4. DISCUSSION

During the gradual process of evolution, organisms have developed natural sun-protecting strategies that enable their survival under direct and intense UV radiation. It is well known that every living organism exposed to UV radiation presents different reactions, such as avoidance of UV source (phototaxis), hiding under inert materials, and particularly producing photoprotective compounds that especially screen UV radiation, such as mycosporine-like amino acids, scytonemin secreted by cyanobacteria, flavonoids secreted by plants, and melanin expressed by animal and human cells [9,44,45]. Indeed, organisms, which are native to habitats with naturally high UV radiation exposure (e.g. alpine and tropical areas), tend to have more developed UV-tolerance mechanisms than organisms from lower-intensity UV environments [46,47].

Historically, Antarctic plants grew under the lowest UV levels on Earth, but today, as a result of ozone depletion, they are exposed to some of the highest UV levels, with a short period for evolutionary adjustment and acclimation [48,49]. Ozone depletion is today very pronounced and consistent over Antarctica, with record levels of during the last decade of up to 74% as compared to pre-ozone hole levels [49,50]. As ozone depletion can stimulate the biosynthesis of UV-protecting compounds in plants, we studied the photoprotective effect of methanolic crude extracts of three Antarctic species [5]. We used UVC radiation because it is the most damaging UV radiation, generating clear genotoxic and mutagenic responses in several *in vitro* and *in vivo* models [14].

D. antarctica and *C. quitensis* are native vascular plants of Antarctica, occurring extensively from the South Orkney and South Shetland Islands in the north, to Terra Firma Islands, in the southwestern Antarctic Peninsula. These species are physiologically well-adapted to the rapidly fluctuating thermal, hydrological, and irradiance conditions of their maritime Antarctic habitats, as well as to the thermal and hydric status of their tissues [51-53]. *P. juniperinum* is one of the simplest terrestrial plants of Antarctica, and therefore fit for studies on plant acclimation, particularly on incident light and UV radiation [54]. Low temperatures and high UV irradiation enhance ROS formation, and may cause photoinhibition. Therefore, an efficient mechanism of energy dissipation and ROS scavenging could contribute for the survival of these species in this harsh environment [55].

Our results demonstrated that the extracts from these Antarctic species markedly decreased DNA damage and mutation triggered by UVC in yeast, V79 cells, and *C. aspersus*. In the wild type yeast, all extracts conferred protection against UVC toxicity, and decreased induced mutagenesis rate. Moreover, the extracts were able to reduce UVC-induced

genotoxicity in V79 cells in standard comet assay. Likewise, p-aminobenzoic acid and 4-[(2-oxo-3-bornylidene)methyl]-phenyl trimethylammonium methylsulfate, two components used in sunscreen formulations, showed the same response in these biological models [56]. Zinc oxide, a compound widely used in sunscreens, also was evaluated in this respect in cultured cells [57]. Also, 1-(4-fluorophenylthioureido)-4-methyl-piperazine protected human lymphocytes against high doses UVC irradiation [58].

In an attempt to explain the observed cytoprotective properties, we investigated the effects of these plants on lipid peroxidation levels in V79 cell line. Extracts significantly decreased UVC-induced lipid peroxidation, showing a clear antioxidant property (Figure 4). In order to explore the nature of this protective mechanism, we carried out the modified comet assay in V79 cells. Reinforcing these results, Figure 3 clearly shows that pre-treatment with these extracts protects against UV-induced oxidative damage, effectively reducing FPG- and EndoIII-sensitive sites by inhibiting the formation oxidized bases. In addition, the results of comet assay employing Endo V endonuclease, demonstrated significant reduction in cyclobutane pyrimidine dimers after pre-incubation with all tested extracts (Table 4), suggesting that the protective effect may be due to blocking UVC penetration, in addition to their antioxidant properties [14].

The yeast mutant defective in DNA repair by photoreactivation is a useful tool to access the photoprotective potential of natural products, as well as their protective effects by inducing DNA repair. *S.cerevisiae* *PHR1* gene encodes the apoenzyme photolyase, which exclusively repairs pyrimidine dimers [59]. Thus, it seems likely that *PHR1* expression is regulated by a global damage response pathway rather than by a dimer-specific or UV-specific pathway. Indeed, *PHR1* transcription is also induced by several damaging agents, including UVC radiation, 4-nitroquinoline oxide, methyl methanesulfonate, nitrosoguanidine, bleomycin, and cis-diaminedichloroplatinin [59].

The mutant *phr1* Δ treated with all tested extract was very sensitive to the highest UVC dose, which was similarly employed in non-treated mutant cells. This finding suggests that the pyrimidine dimers cytotoxicity is present, independent of extract treatment. Therefore, it is possible that the main mechanism of photoprotective effect is linked to the antioxidant properties of the mixture. However, as UV cytotoxicity was virtually inhibited in the wild type strain pretreated with these extracts, and mutant *phr1* Δ protection was not significant, except for antioxidant protection, we believe that damage reversion by photolyase pathway is an important target of the a stimulatory effect of the substances on DNA repair mechanisms.

Surprisingly, the effect of the extracts on *phr1*Δ strain was minimal, although this strain presented intact DNA repair by nucleotide excision. This is expected, since photolyase not only repairs UV damage, but it is also involved in stimulating nucleotide excision repair in yeast [60].

Plant-derived antioxidants are often in the form of extracts, and therefore contain a complex mixture of compounds, such as polyphenols, which contribute to the overall activity of the extract [61]. The antioxidant effect observed in our experiments may be partially explained by the presence of flavonoids, the largest and best-studied group of polyphenols, as evidenced by phytochemical screening. Flavonoids are recognized as antioxidants, with a potential role in chemoprevention in human cells [5,16,62-65]. Moreover, the treatment with flavonoids is able to promote an increase in the expression of several DNA repair genes in several biological systems [29,66-68]. Therefore, the flavonoids present in *Deschampsia*, *Colobanthus*, and *Polytricum* methanolic crude extracts have protective effects against UVC radiation in the studied biological models due to their antioxidant, UV-absorbing, and DNA-repair stimulation effects.

The main flavonoid constituents of *Deschampsia antarctica* are C-glycosylflavones, isoswertiajaponine (7-O-methylorientine)-2"-O-beta-arabinopyranoside, and orientine [69]. Our TLC analysis suggested the possible presence of isoquercetin and rutin. Quercetin and its derivatives are the most abundant natural flavonoids, and are powerful antioxidants, preventing the harmful effects of UV light [16,63]. Rutin is a well-studied flavonoid with clear cytoprotective effect against oxidative stress, and presents UV-absorbing properties [5,62]. The high flavonoid content found in *D. antarctica* extract may be responsible for its highest protective effect as compared to the other evaluated extracts, using the several biological models. In addition, previous work showed that *D. antarctica* exhibits high levels of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase activities, suggesting that photochemical quenching is related to high levels of antioxidant defense, which may determine the survival of this species in the harsh Antarctic environment [52]. In *C. quitensis*, we found luteoline derivatives and chlorogenic acid, which are molecules with antioxidant activity capable of directly scavenging hydroxyl radicals and eliminating ROS generated by hydrogen peroxide [64,65,70-73].

Moreover, the concentration of carotenoids, which comprise the other group of UV-screening pigments, are higher in vascular plants than in Antarctic lichens. In addition, in *D. antarctica*, more than 11 carotenoids were identified, certainly contributing to protective effect [74]. In *C. quitensis*, which presented a significantly higher concentration of UV-absorbing

pigments, fourteen carotenoids were identified. Although carotenoids, particularly those involved in photosynthesis and photochemical quenching, are not thought to offer substantial protection from UV radiation, they have an important role in this function, in addition to flavonoid-mediated UV screening [45]. Antarctic field experiments have also shown increased concentrations of UV-screening pigments, including carotenoids and flavonoids, in foliage of the *C. quitensis* and *D. Antarctica*, when these species are exposed to UV radiation [52,74].

The *D. antarctica* and *P. juniperinum* plants were not cytotoxic or genotoxic in the snail *C. aspersus*, and were able to prevent UVC-induced DNA damage. Therefore, Antarctic species present a potentially photoprotective effect *in vivo*. Interestingly, *C. quitensis* was genotoxic in *C. aspersus* (Figure 5). This fact can be due to metabolization differences among the evaluated biological systems as, although there is some evidence of the involvement of cytochrome P450 in xenobiotics metabolism in gastropods, this biotransformation pathway is often not consistent in invertebrates [36]. In addition, not all flavonoids and not all actions of individual flavonoids are necessarily beneficial. Some have genotoxic, mutagenic, and/or pro-oxidant effects, as well as interfere with essential biochemical pathways in different test organisms [63,75]. Furthermore, the plant presents compounds other than methanolic crude extract, and therefore, the genotoxic component of *C. quitensis* leaves may not be present in the extract. In addition, the ethanolic extract of *D. antarctica* was highly toxic for *A. salina* in the brine shrimp test, which uses *Artemia salina* larvae [76].

In conclusion, this is a pioneer study on the photoprotective effect of plants from the Antarctic region. The methanolic crude extracts of *D. antarctica*, *C. quitensis*, and *P. juniperinum* present photoprotective effects against UVC-induced DNA damage in yeast and in V79 cells, but the same response was not verified in *C. aspersus*. This protective potential can be attributed to molecules, such as flavonoids and carotenoids, which act as UV-absorbing molecules and antioxidants, and also stimulate DNA repair processes. Therefore, these species are very promising for the isolation of new molecules with photoprotective effects. Further studies designed to isolate, to identify, and to characterize their active constituents should provide a better understanding of these compounds and of the mechanisms underlying these effects.

5. ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento e Formação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), GENOTOX-Genotoxicity Laboratory- Royal Institute and Ministério do Meio ambiente-Brasil.

6. REFERENCES

- [1] S. De Flora and L.R. Ferguson Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents, *Mutat Res* 591 (2005) 8-15.
- [2] K.I. Block Antioxidants and cancer therapy: furthering the debate, *Integr Cancer Ther* 3 (2004) 342-348.
- [3] B.N. Ames and L.S. Gold The prevention of cancer, *Drug Metab Rev* 30 (1998) 201-223.
- [4] B.N. Ames A role for supplements in optimizing health: the metabolic tune-up, *Arch Biochem Biophys* 423 (2004) 227-234.
- [5] F. Afaq and H. Mukhtar Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging, *Exp Dermatol* 15 (2006) 678-684.
- [6] A.R. Collins Antioxidant intervention as a route to cancer prevention, *Eur J Cancer* 41 (2005) 1923-1930.
- [7] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur and J. Telser Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int J Biochem Cell Biol* 39 (2007) 44-84.
- [8] S. F'Guyer, F. Afaq and H. Mukhtar Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents, *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 19 (2003) 56-72.
- [9] J. Psotova, A. Svobodova, H. Kolarova and D. Walterova Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes, *J Photochem Photobiol B* 84 (2006) 167-174.
- [10] G.J. Fisher, Z.Q. Wang, S.C. Datta, J. Varani, S. Kang and J.J. Voorhees Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light, *N Engl J Med* 337 (1997) 1419-1428.
- [11] J.L. Alonso-Lebrero, C. Dominguez-Jimenez, R. Tejedor, A. Brieva and J.P. Pivel Photoprotective properties of a hydrophilic extract of the fern *Polypodium leucotomos* on human skin cells, *J Photochem Photobiol B* 70 (2003) 31-37.
- [12] M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C.J. Rhodes and J. Telser Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol Cell Biochem* 266 (2004) 37-56.
- [13] A.R. Collins and E. Horvathova Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay, *Biochem Soc Trans* 29 (2001) 337-341.
- [14] G.P. Pfeifer, Y.H. You and A. Besaratinia Mutations induced by ultraviolet light, *Mutat Res* 571 (2005) 19-31.
- [15] J. Taira, K. Mimura, T. Yoneya, A. Hagi, A. Murakami and K. Makino Hydroxyl radical formation by UV-irradiated epidermal cells, *J Biochem (Tokyo)* 111 (1992) 693-695.

- [16] A. Svobodova, J. Psotova and D. Walterova Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 147 (2003) 137-145.
- [17] S.R. Pinnell Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection, *J Am Acad Dermatol* 48 (2003) 1-19; quiz 20-12.
- [18] J.B. Harbone *Phytochemical methods*, Academic Press, London, 1984.
- [19] H. Wagner, S. Bladt and E.M. Zgainski *Plant Drug Analysis: a Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer, Germany, 1984.
- [20] I. Kosalec, S. Pepeljnjak, M. Bakmaz and S. Vladimir-Knezevic Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products, *Acta Pharmaceutica* 55 (2005) 423-430.
- [21] D. Burke, D. Dawson and T. Stearns *Methods in yeast genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.
- [22] R. Snow Genetic Evidence for Interaction between Nonhomologous Proteins in Yeast and a Case of Suppression at the HIS1 Locus, *Genetics* 94 (1980) 327-339.
- [23] D.C. Hawthorne and R.K. Mortimer Super-suppressors in yeast, *Genetics* 48 (1963) 617-620.
- [24] D.C. Hawthorne Identification of nonsense codons in yeast, *J Mol Biol* 43 (1969) 71-75.
- [25] R.C. Von Borstel, K.T. Cain and C.M. Steinberg Inheritance of spontaneous mutability in yeast, *Genetics* 69 (1971) 17-27.
- [26] R.C. Schuller and R.C. Von Borstel Spontaneous mutability in yeast. I. Stability of lysine reversion rates to variation of adenine concentration, *Mutat Res* 24 (1974) 17-23.
- [27] M. Brendel, M. Grey, A.F. Maris, J. Hietkamp, Z. Fesus, C.T. Pich, A.L. Dafre, M. Schmidt, F. Eckardt-Schupp and J.A. Henriques Low glutathione pools in the original *pso3* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* are responsible for its pleiotropic sensitivity phenotype, *Curr Genet* 33 (1998) 4-9.
- [28] H. Zhang and W. Siede UV-induced T-->C transition at a TT photoproduct site is dependent on *Saccharomyces cerevisiae* polymerase eta in vivo, *Nucleic Acids Res* 30 (2002) 1262-1267.
- [29] S. Dhanalakshmi, C. Agarwal, R.P. Singh and R. Agarwal Silibinin up-regulates DNA-protein kinase-dependent p53 activation to enhance UVB-induced apoptosis in mouse epithelial JB6 cells, *J Biol Chem* 280 (2005) 20375-20383.
- [30] A.R. Collins The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Mol Biotechnol* 26 (2004) 249-261.
- [31] A. Hartmann and G. Speit The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay), *Toxicol Lett* 90 (1997) 183-188.
- [32] S.B. Nadin, L.M. Vargas-Roig and D.R. Ciocca A silver staining method for single-cell gel assay, *J Histochem Cytochem* 49 (2001) 1183-1186.
- [33] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu and Y.F. Sasaki Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ Mol Mutagen* 35 (2000) 206-221.
- [34] M.G. Salgo and W.A. Pryor Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes, *Arch Biochem Biophys* 333 (1996) 482-488.
- [35] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* 193 (1951) 265-275.
- [36] F. Regoli, S. Gorbi, D. Fattorini, S. Tedesco, A. Notti, N. Machella, R. Bocchetti, M. Benedetti and F. Piva Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for

- monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach, *Environ Health Perspect* 114 (2006) 63-69.
- [37] F. Gimbert, A. de Vauflery, F. Douay, R. Scheifler, M. Coeurdassier and P.M. Badot Modelling chronic exposure to contaminated soil: a toxicokinetic approach with the terrestrial snail *Helix aspersa*, *Environ Int* 32 (2006) 866-875.
- [38] J. da Silva, T.R. de Freitas, V. Heuser, J.R. Marinho and B. Erdtmann Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet assay and micronucleus test, *Environ Mol Mutagen* 35 (2000) 270-278.
- [39] A. Hartmann, E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud and R.R. Tice Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop, *Mutagenesis* 18 (2003) 45-51.
- [40] B. Burlinson, R.R. Tice, G. Speit, E. Agurell, S.Y. Brendler-Schwaab, A.R. Collins, P. Escobar, M. Honma, T.S. Kumaravel, M. Nakajima, Y.F. Sasaki, V. Thybaud, Y. Uno, M. Vasquez and A. Hartmann Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup, *Mutat Res* 627 (2007) 31-35.
- [41] A. Hartmann, A. Elhajouji, E. Kiskinis, F. Poetter, H. Martus, A. Fjallman, W. Friauff and W. Suter Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test, *Food Chem Toxicol* 39 (2001) 843-858.
- [42] G. Speit, P. Schutz, I. Bonzheim, K. Trenz and H. Hoffmann Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay, *Toxicol Lett* 146 (2004) 151-158.
- [43] M. Dizdaroglu Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases, *Mutat Res* 591 (2005) 45-59.
- [44] R. Schmitz-Hoerner and G. Weissenbock Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels, *Phytochemistry* 64 (2003) 243-255.
- [45] C.S. Cockell and J. Knowland Ultraviolet radiation screening compounds, *Biol Rev Camb Philos Soc* 74 (1999) 311-345.
- [46] M. Turunen and K. Latola UV-B radiation and acclimation in timberline plants, *Environ Pollut* 137 (2005) 390-403.
- [47] H. Frohnmeyer and D. Staiger Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection, *Plant Physiol* 133 (2003) 1420-1428.
- [48] S. Madronich, R.L. McKenzie, L.O. Bjorn and M.M. Caldwell Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface, *J Photochem Photobiol B* 46 (1998) 5-19.
- [49] J. Rozema, P. Boelen and P. Blokker Depletion of stratospheric ozone over the Antarctic and Arctic: responses of plants of polar terrestrial ecosystems to enhanced UV-B, an overview, *Environ Pollut* 137 (2005) 428-442.
- [50] S. Diaz, C. Camilion, G. Deferrari, H. Fuenzalida, R. Armstrong, C. Booth, A. Paladini, S. Cabrera, C. Casiccia, C. Lovengreen, J. Pedroni, A. Rosales, H. Zagarese and M. Vernet Ozone and UV radiation over southern South America: climatology and anomalies, *Photochem Photobiol* 82 (2006) 834-843.
- [51] C.T. Ruhland and T.A. Day Size and longevity of seed banks in Antarctica and the influence of ultraviolet-B radiation on survivorship, growth and pigment concentrations of *Colobanthus quitensis* seedlings, *Environ Exp Bot* 45 (2001) 143-154.
- [52] C.T. Ruhland, F.S. Xiong, W.D. Clark and T.A. Day The influence of ultraviolet-B radiation on growth, hydroxycinnamic acids and flavonoids of *Deschampsia antarctica*

- during Springtime ozone depletion in Antarctica, *Photochem Photobiol* 81 (2005) 1086-1093.
- [53] M. Alberdi, L.A. Bravo, A. Gutierrez, M. Gidekel and L.J. Corcuera Ecophysiology of Antarctic vascular plants, *Physiol Plant* 115 (2002) 479-486.
- [54] M. Van Der Velde and R. Bijlsma Amount and structure of intra- and interspecific genetic variation in the moss genus *Polytrichum*, *Heredity* 85 Pt 4 (2000) 328-337.
- [55] D. Abele and S. Puntarulo Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 138 (2004) 405-415.
- [56] P. Mondon and M.M. Shahin Protective effect of two sunscreens against lethal and genotoxic effects of UVB in V79 Chinese hamster cells and *Saccharomyces cerevisiae* strains XV185-14C and D5, *Mutat Res* 279 (1992) 121-128.
- [57] E.K. Dufour, T. Kumaravel, G.J. Nohynek, D. Kirkland and H. Toutain Clastogenicity, photo-clastogenicity or pseudo-photo-clastogenicity: Genotoxic effects of zinc oxide in the dark, in pre-irradiated or simultaneously irradiated Chinese hamster ovary cells, *Mutat Res* 607 (2006) 215-224.
- [58] S.P. Gateva, P.A. Ionova, G. Iovchev, M.L. Stergios and S.S. Kulekova [The protective effect of newly synthesized compounds against the action of UV-C irradiation on human lymphocytes in vitro], *Radiats Biol Radioecol* 46 (2006) 415-419.
- [59] G.B. Sancar Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting, *Mutat Res* 451 (2000) 25-37.
- [60] N.R. Morse, V. Meniel and R. Waters Photoreactivation of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers in the MFA2 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res* 30 (2002) 1799-1807.
- [61] J. van de Staaij, N.V. de Bakker, A. Oosthoek, R. Broekman, A. van Beem, M. Stroetenga, R. Aerts and J. Rozema Flavonoid concentrations in three grass species and a sedge grown in the field and under controlled environment conditions in response to enhanced UV-B radiation, *J Photochem Photobiol B* 66 (2002) 21-29.
- [62] J. Zhang, R.A. Stanley, A. Adaim, L.D. Melton and M.A. Skinner Free radical scavenging and cytoprotective activities of phenolic antioxidants, *Mol Nutr Food Res* 50 (2006) 996-1005.
- [63] L.R. Ferguson Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutat Res* 475 (2001) 89-111.
- [64] R.J. Nijveldt, E. van Nood, D.E. van Hoorn, P.G. Boelens, K. van Norren and P.A. van Leeuwen Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am J Clin Nutr* 74 (2001) 418-425.
- [65] E. Middleton, Jr., C. Kandaswami and T.C. Theoharides The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol Rev* 52 (2000) 673-751.
- [66] K. Gao, S.M. Henning, Y. Niu, A.A. Youssefian, N.P. Seeram, A. Xu and D. Heber The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells, *J Nutr Biochem* 17 (2006) 89-95.
- [67] A. Jagetia, G.C. Jagetia and S. Jha Naringin, a grapefruit flavanone, protects V79 cells against the bleomycin-induced genotoxicity and decline in survival, *J Appl Toxicol* 27 (2007) 122-132.
- [68] S. Guarrera, C. Sacerdote, L. Fiorini, R. Marsala, S. Polidoro, S. Gamberini, F. Saletta, C. Malaveille, G. Talaska, P. Vineis and G. Matullo Expression of DNA repair and metabolic genes in response to a flavonoid-rich diet, *Br J Nutr* 98 (2007) 525-533.

- [69] R.F. Webby and K.R. Markham Isoswertiajaponin 2"-O-beta-arabinopyranoside and other flavone-C-glycosides from the Antarctic grass *Deschampsia antarctica*, *Phytochemistry* 36 (1994) 1323-1326.
- [70] C. Kanadaswami, L.T. Lee, P.P. Lee, J.J. Hwang, F.C. Ke, Y.T. Huang and M.T. Lee The antitumor activities of flavonoids, *In Vivo* 19 (2005) 895-909.
- [71] R.J. Williams, J.P. Spencer and C. Rice-Evans Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?, *Free Radic Biol Med* 36 (2004) 838-849.
- [72] B.H. Havsteen The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacol Ther* 96 (2002) 67-202.
- [73] P.G. Pietta Flavonoids as antioxidants, *J Nat Prod* 63 (2000) 1035-1042.
- [74] F.S. Xiong and T.A. Day Effect of solar ultraviolet-B radiation during springtime ozone depletion on photosynthesis and biomass production of Antarctic vascular plants, *Plant Physiol* 125 (2001) 738-751.
- [75] I.M. Rietjens, M.G. Boersma, H. van der Woude, S.M. Jeurissen, M.E. Schutte and G.M. Alink Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk, *Mutat Res* 574 (2005) 124-138.
- [76] P. Cuadra, M. Furrianca, A. Oyarzun, E. Yanez, A. Gallardo and V. Fajardo Biological activity of some Patagonian plants, *Fitoterapia* 76 (2005) 718-721.

TABLES

Table 1. Mutagenesis evaluation and effects of methanolic crude extracts of plants of Antarctica in strains XV185-14c and N123 of *S. cerevisiae*.

Treatment	XV185-14c strain			N123 strain		
	Survival (%)	<i>HIS1</i> /10 ⁷ survivors ^a	Mutagenesis <i>LYS1</i> /10 ⁷ survivors ^b	<i>HOM3</i> /10 ⁷ survivors ^a	Survival (%)	Mutagenesis <i>CAN1</i> mutants/10 ⁷ survivors
Negative control	100 ± 12,57	0.88 ± 0.31	0.22 ± 0.02	0.94 ± 0.39	100±6.73	0.82±0.02
UVC 60 J/m ²	12.77 ± 2.35	111.30 ± 7.37**	33.91 ± 2.45**	63.91 ± 3.07**	8.81±1.99	42.0±3.95
<i>D. antarctica</i>						
1 mg/mL	89.5 ± 4.30	1.32 ± 0.20	0.12 ± 0.05	0,89 ± 0,05	94.0± 1.53	1.30±0.50
5 mg/mL	93.5 ± 8.21	1.05 ± 0.24	0.10 ± 0.02	1.26 ± 0,15	100.0 ± 15.08	1.20±0.28
10 mg/mL	98.5 ± 0.50	0.53 ± 0.20	0.29 ± 0.01	1.10± 0,20	98.10± 0.59	0.90±0.10
<i>C. quitensis</i>						
1 mg/mL	100.0 ± 2,00	0.78 ± 0.20	0.09 ± 0.02	0.99 ± 0.10	100±3.73	0.95±0.25
5 mg/mL	95.5.5 ± 5.01	1.04 ± 0.10	0.15 ± 0.05	1.15 ± 0.30	100.2±1.70	1.14±0.30
10 mg/mL	96.0 ± 0.30	1.20 ± 0.31	0.21 ± 0.07	1.21± 0.10	98.1± 6.99	1.24±0.35
<i>P. juniperinum</i>						
1 mg/mL	96.40 ± 1.32	1.50±0.60	0.23.±0.05	1.30±0.60	91.72±7.48	1.20±0.80
5 mg/mL	92.70 ± 8.14	0.99±0.11	0.35±0.09	1.50±0.11	92±15.46	0.57±0.21
10 mg/mL	88.5 0± 10.13	1.40±0.37	0.19±0.07	1.00±0.17	100.35±7.73	0.26±0.27

^a Locus-specific revertants; ^b Locus non-specific revertants; Mean and standard deviation per three independent experiments in triplicate for each treatment;

** Data significant in relation to negative control group (vehicle) at $P < 0.01$ / ANOVA one way (Tukey test): Treatments with extracts were compared to the negative control group; Positive control (UVC 60 J/m²) was compared against negative control.

Table 2. Effect of the pre-treatment with methanolic crude extract of Antarctic plants on UVC- induced cytotoxicity- and mutagenicity in XV185-14c and N123 strains of *S. cerevisiae*.

Treatment	XV185-14c strain			N123 strain		
	Survival (%)	Mutagenesis <i>HIS1</i> /10 ⁷ survivors ^a	Mutagenesis <i>LYS1</i> /10 ⁷ survivors ^b	Mutagenesis <i>HOM3</i> /10 ⁷ survivors ^a	Survival (%)	Mutagenesis <i>CAN1</i> mutants/10 ⁷ survivors
Negative control	100 ± 12,57	0.88 ± 0.31	0.22 ± 0.02	0.94 ± 0.39	100±6.73	0.82±0.02
UVC 40 J/m ²	51.11 ± 1.57	19.45 ± 0.46**	3.69 ± 0.61**	14.34 ± 0.92**	10.22±2.74	25.17±7.31
UVC 60 J/m ²	12.77 ± 2.35	111.30 ± 7.37**	33.91 ± 2.45**	63.91 ± 3.07**	8.81±1.99	42.0±3.95
<i>D. Antarctica</i>						
1 mg/mL plus UVC 40 J/m ²	77.77 ± 3.14	6.64 ± 0.10**	3.00 ± 0.40**	15.0 ± 0.40**	40.1±2.50	9.0±0.31*
5 mg/mL plus UVC 40 J/m ²	89.44 ± 0.78	5.21 ± 0.17**	1.67 ± 0.08**	10.06 ± 1.58**	72.9±11.25	2.6±0.50**
10 mg/mL plus UVC 40 J/m ²	96.66 ± 1.57	4.28 ± 0.08**	0.91 ± 0.16**	9.82 ± 0.56**	91.0±4.25	0.8±0.04**
1 mg/mL plus UVC 60 J/m ²	60.55 ± 5.49	9.35 ± 1.29**	5.50 ± 0.25**	19.08 ± 1.55**	43.0±2.00	20.1±100**
5 mg/mL plus UVC 60 J/m ²	73.88 ± 3.92	6.84 ± 0.10**	2.85 ± 0.42**	15.33 ± 0.85**	71.11±4.89	8.3±0.44**
10 mg/mL plus UVC 60 J/m ²	85.0 ± 3.92	5.68 ± 0.09**	1.37 ± 0.27**	13.92 ± 0.27**	89.30±7.27	1.2±0.30**
<i>C. quitensis</i>						
1 mg/mL plus UVC 40 J/m ²	87.22 ± 2.35	9.36 ± 0.45**	0.95 ± 0.09**	6.30 ± 0.27**	28.79±0.89	12.0±1.24*
5 mg/mL plus UVC 40 J/m ²	91.66 ± 2.35	8.24 ± 0.17**	0.66 ± 0.08**	4.60 ± 0.17**	52.61±6.30	3.0±1.00**
10 mg/mL plus UVC 40 J/m ²	98.88 ± 1.57	7.13 ± 0.23**	0.44 ± 0**	3.82 ± 0.15**	71.01±2.55	1.0±0.10**
1 mg/mL plus UVC 60 J/m ²	58.88 ± 3.14	4.15 ± 1.06**	10.37 ± 1.06**	10.37 ± 1.06**	31.0±3.00	26.0±5.05**
5 mg/mL plus UVC 60 J/m ²	77.22 ± 2.35	2.94 ± 0.10**	9.20 ± 0.61**	9.20 ± 0.61**	58.33±8.29	10.0±1.82**
10 mg/mL plus UVC 60 J/m ²	95.0 ± 3.92	0.52 ± 0.08**	5.90 ± 0.08**	5.90 ± 0.08**	75.60±8.22	2.0±3.77**
<i>P. juniperinum</i>						
1 mg/mL plus UVC 40 J/m ²	75.00 ± 3.92	14.59 ± 0.10	1.03 ± 0.20	6.29 ± 1.15	44.97±6.23	15.96±0.94*
5 mg/mL plus UVC 40 J/m ²	86.67 ± 3.14	11.92 ± 0.90	0.64 ± 0.18	4.87 ± 0.10	52.55±1.99	8.72±1.42**
10 mg/mL plus UVC 40 J/m ²	95.55 ± 3.14	9.59 ± 0.54	0.34 ± 0.16	3.95 ± 0.82	46.73±2.74	29.0±6.95*
1 mg/mL plus UVC 60 J/m ²	63.33 ± 7.85	18.50 ± 0.12	1.66 ± 0.12	9.21 ± 0.12	35.44±6.23	10.19±1.33*
5 mg/mL plus UVC 60 J/m ²	81.66 ± 2.35	12.58 ± 0.09	0.61 ± 0.28	8.23 ± 0.09	41.79±12.22	7.84±0.59*
10 mg/mL plus UVC 60 J/m ²	91.66 ± 0.78	9.45 ± 0.34	0.48 ± 0.17	6.60 ± 0.08	55.74±2.49	21.71±0.67**

Locus-specific revertants; ^b Locus non-specific revertants; Mean and standard deviation per three independent experiments in triplicate for each treatment; ** Data significant in relation to negative control group (vehicle) at $P < 0.01$ / ANOVA one way (Tukey test): Treatments with extracts were compared to the negative control group; Pre-treatments with extracts plus UVC exposure were compared to cells only exposed to UVC; UVC treatment was compared against negative control.

Table 3. Evaluation of the genotoxicity of Antarctic species methanolic extract and the anti-genotoxicity against UV-C radiation in V79 cells using standard comet assay.

Treatment	Damage index (DI)	Damage frequency (DF)
<i>Genotoxic evaluation of the extracts</i>		
Negative control	18.20±1.50	23.40±2.00
Positive control	185.0±10.40**	96.10±8.00**
<i>D. antarctica</i> 1 mg/mL	14.30±0.80	28.00±0.80
5 mg/mL	21.50±3.00	31.00±4.50
10 mg/mL	15.00±2.40	25.00±1.90
<i>C. quitensis</i> 1 mg/mL	25.00±6.20	20.60±1.60
5 mg/mL	29.80±5.40	28.50±4.30
10 mg/mL	16.10±0.90	34.40±9.50
<i>P. juniperinum</i> 1 mg/mL	19.30±2.60	30.10±8.80
5 mg/mL	14.30±6.00	28.40±9.30
10 mg/mL	31.50±11.70	16.50±7.00
<i>Protective effect against UV-C-induced DNA damage</i>		
UV-C 5 J/m ²	270.30 ± 10.60**	92.00± 1.00**
<i>D. antarctica</i> 1 mg/mL plus UV-C 5 J/m ²	250.4 0± 12.90*	84.00 ± 2.50*
5 mg/mL plus UV-C 5 J/m ²	192.50 ± 21.40**	62.60 ± 4.80**
10 mg/mL plus UV-C 5 J/m ²	156.10± 15.90**	39.80 ± 12.0**
<i>C. quitensis</i> 1 mg/mL plus UV-C 5 J/m ²	230.40± 26.90*	85.00 ± 3.10*
5 mg/mL plus UV-C 5 J/m ²	199.50 ± 9.00**	67.30 ± 6.20**
10 mg/mL plus UV-C 5 J/m ²	166.70 ± 5.10**	45.00 ± 2.30**
<i>P. juniperinum</i> 1 mg/mL plus UV-C 5 J/m ²	260.50 ± 7.30	89.20 ± 3.50
5 mg/mL plus UV-C 5 J/m ²	248.40 ± 8.80**	78.10 ± 0.40**
10 mg/mL plus UV-C 5 J/m ²	210.40 ± 2.30**	60.10 ± 0.93**

Mean ± SD from three experiments. DI: damage index; DF: damage frequency. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ as tested by one-way ANOVA and Tukey test. Treatments with extracts were compared to the negative control; Pre-treatments with extracts plus UVC exposure were compared to cells only exposed to UVC; UVC treatment was compared against negative control. Negative control: vehicle. Positive control: 4×10^{-5} M methylmethane sulphonate.

Table 4. DNA damage in V79 cells pre-treated with methanolic extract of three Antarctic species and exposed to UVC in modified comet assay.

Treatment	Buffered	FPG	EndoIII	EndoV
Negative control	26.8 ± 10.7	49 ± 8.40	51 ± 6.2	48.3 ± 14.8
UVC 5 J/m ²	231.8 ± 9.3	312 ± 6.80	356 ± 1.20	317.5 ± 14.4
<i>D.antarctica</i> 5 mg/mL plus UVC 5 J/m ²	174.7 ± 10.9	209 ± 7.00**	199 ± 4.00**	236.7 ± 17.9*
<i>C.quitensis</i> 5 mg/mL plus UVC 5 J/m ²	201.0 ± 20.6	231 ± 5.10**	259 ± 7.70**	249.3 ± 29.1**
<i>P.juniperinum</i> 5 mg/mL plus UVC 5 J/m ²	172.0 ± 7.6	196 ± 8.1**	221 ± 2.9**	237.0 ± 18.7*

One hundred cells were scored for each sample. Mean ± SD from three experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ as compared to the cells exposed to UVC without pre-treatment and incubated with these enzymes.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Relative sensitivity of wild type and *phr1Δ* mutant strains pre-treated with the extracts for 3h in PBS and then challenged with UVC radiation. Panel A: cytotoxicity of the all extracts at concentration 10 mg/mL to yeast strains. Panel B: Both strains pre-treated with *D.antarctica* extract; Panel C: treatment with *C.quitensis* extract; Panel D: treatment with *P.juniperinum* extract. Panel A: wild type without treatment (fill square); *phr1Δ* mutant without treatment (fill triangle); wild type treated with *D.antarctica* extract (fill inverted triangle); *phr1Δ* treated with *D.antarctica* extract (fill rhombus); wild type treated with *C.quitensis* extract (fill circle); *phr1Δ* treated with *C.quitensis* extract (open square); wild type treated with *P.juniperinum* extract (open triangle); *phr1Δ* treated with *P.juniperinum* extract (open inverted triangle). Panels B,C and D: wild type without pre-treatment (fill square); *phr1Δ* mutant without treatment (fill triangle); wild type treated with extract at 5 mg/mL (fill circle); *phr1Δ* treated with extract at 5 mg/mL (open square); wild type treated with extract at 10 mg/mL (fill inverted triangle); *phr1Δ* treated with extract at 10 mg/mL (fill rhombus).

Figure 2. Clonogenic survival of V79 cells pretreated with non-cytotoxic doses of the extracts for 3h in medium without FBS and then challenged with UVC radiation 5 J/m². The results are expressed as mean±SD, n=6. The symbol * represents $p<0.05$ as tested by one way ANOVA (Tukey test): pretreated cells were compared to cells only exposed to UVC. UVC exposed cells were compared to negative control (vehicle treatment without UVC-exposure).

Figure 3. Inhibitory effect of Antarctica methanolic crude extracts on the DNA damage index of V79 cells exposed to UVC 5 J/m² with subsequent treatment with EndoIII, FPG or EndoV. The figure shows mean results from three independent experiments and the number the cells analyzed in each treatment was 100. The levels of EndoIII, FPG or EndoV sensitive sites were calculated as the score obtained with enzymes minus the score without enzyme (buffered) after treatment with UVC. *Data significant in relation to UVC treatment at $P<0.05$; *** $P<0.001$ /Anova One-way Tukey's multiple comparison test.

Figure 4. Determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in cells pretreated with the extract at the indicated concentrations for 3h and subsequently submitted to UV-C radiation 5 J/m². Data are presented as mean ± SD, n = 6. The symbol * represents $p<0.05$ as

tested by one way ANOVA (Tukey test): pretreated cells were compared to cells only exposed to UVC. UVC exposed cells were compared to negative control (vehicle treatment without UVC-exposure).

Figure 5. Effect of the extracts in *C. aspersus*. Open bars: genotoxicity of Antarctic plants in cells of hemolymph of the *C. aspersus* clam fed with the Antarctic species or lettuce (*L. sativa*). Filled bars: DNA damage in hemolymph cells of clams fed with Antarctic species or lettuce (*L. sativa*) during seven days and irradiated with 4.5 J/m² UVC. The symbol # represents $p < 0.05$ and as tested by one way ANOVA and Tukey test: animals fed with Antarctica species were compared to animals fed with lettuce. The symbol ** represents $p < 0.01$, as tested by one way ANOVA and Tukey test: pretreated animals were compared to animals fed with lettuce and exposed to UVC.

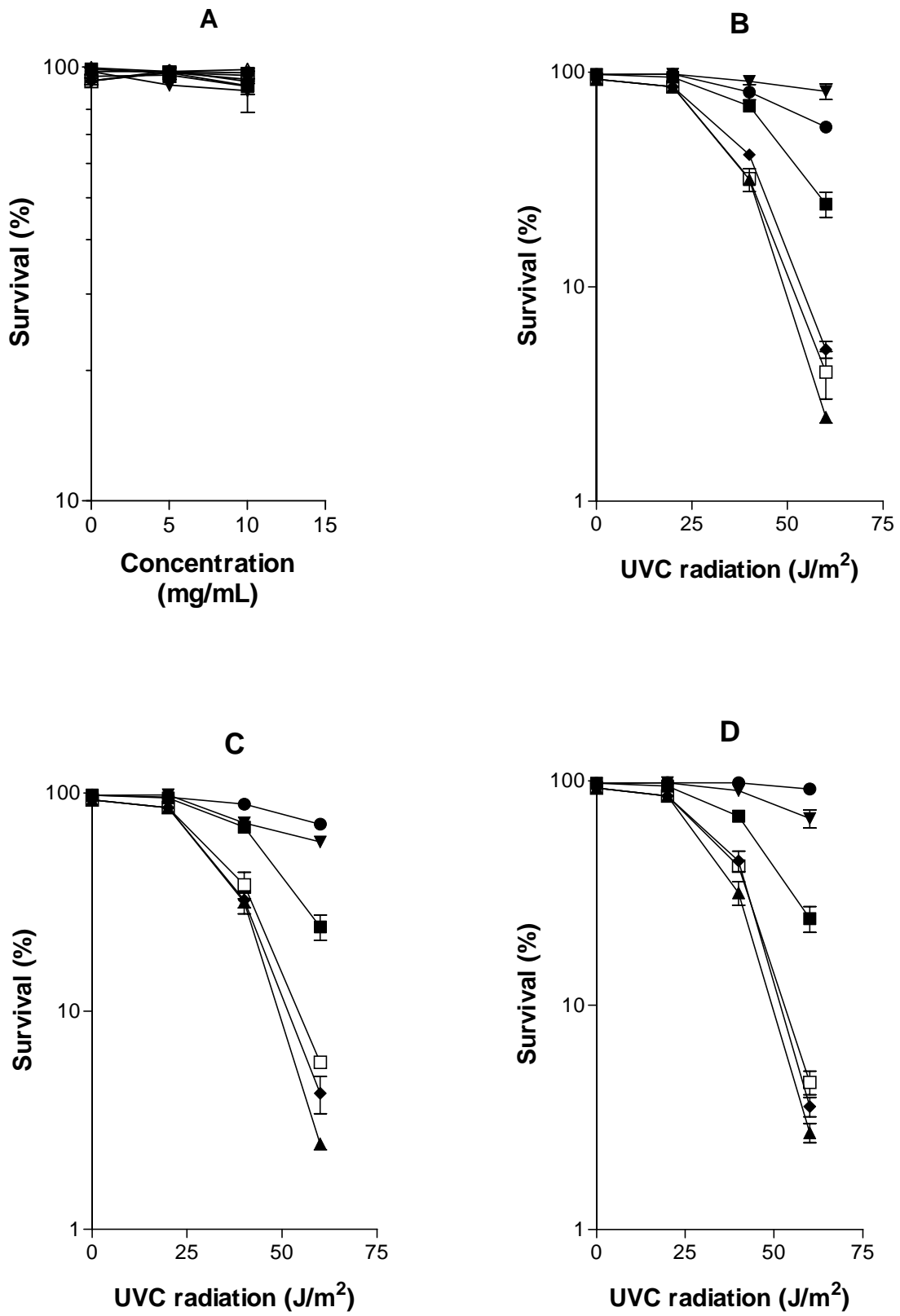


Fig. 1.

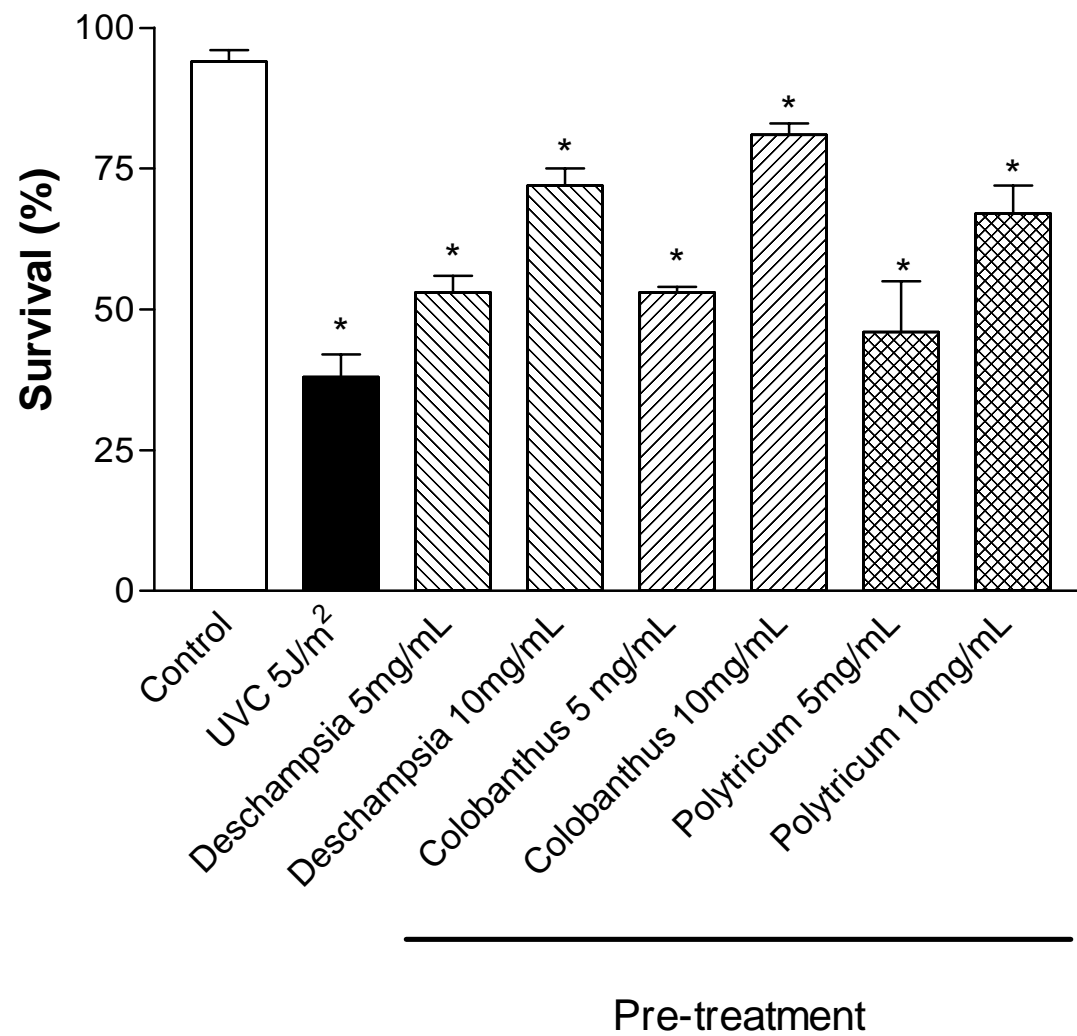


Fig.2.

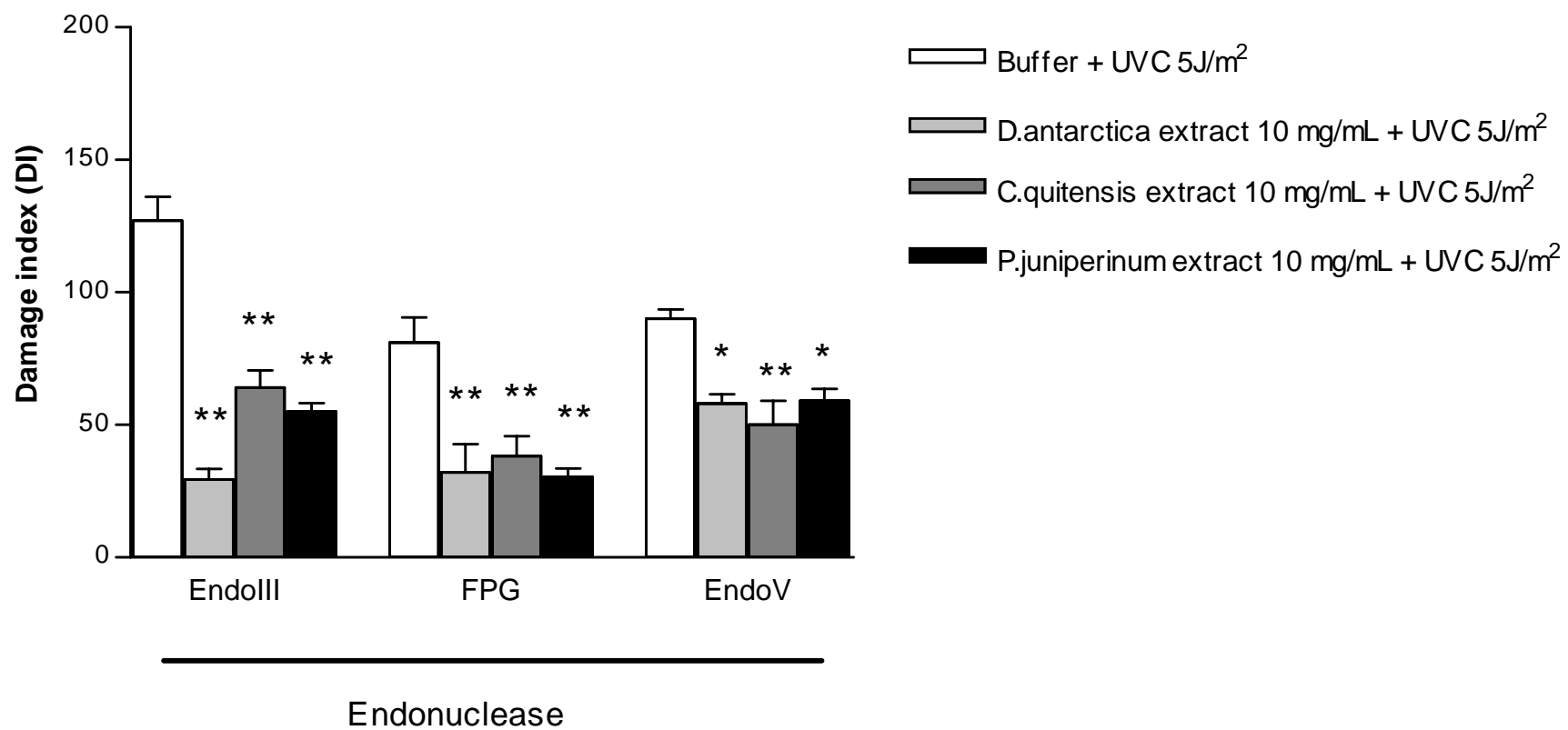


Fig.3.

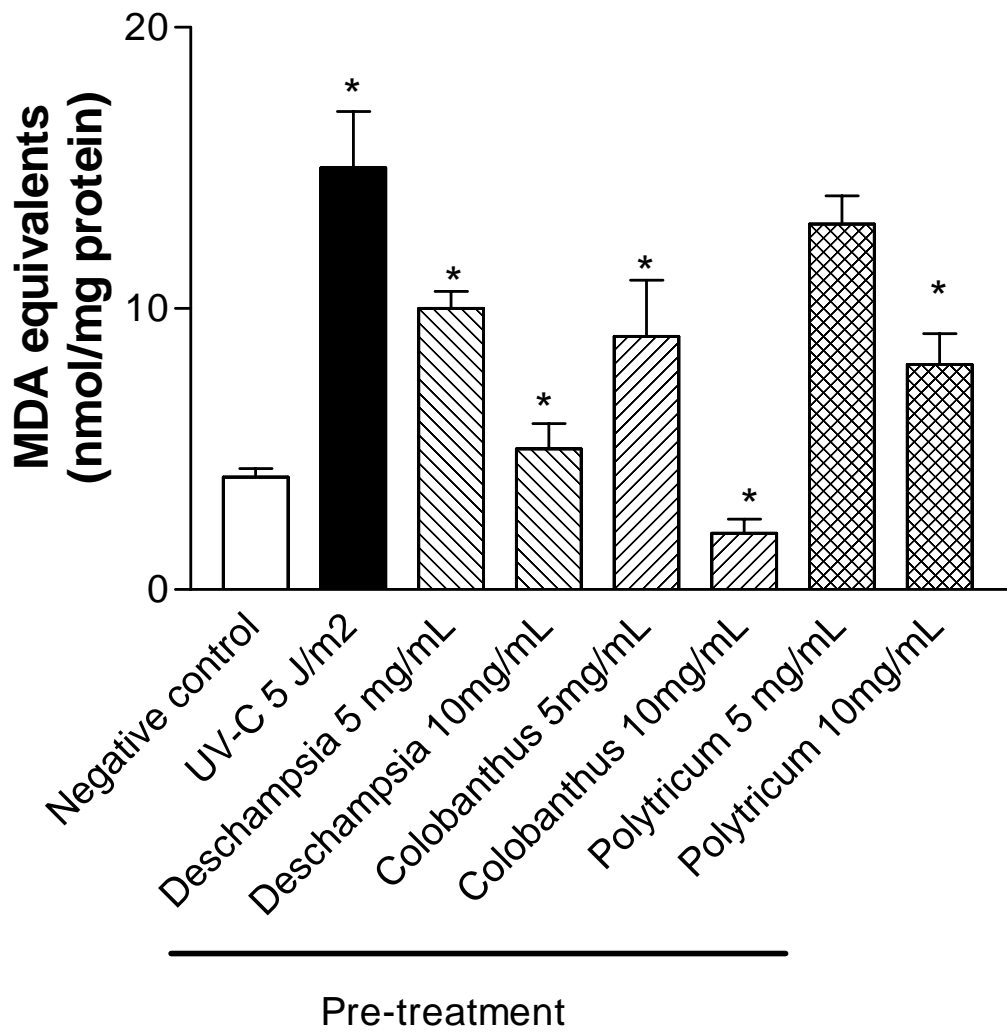


Fig.4.

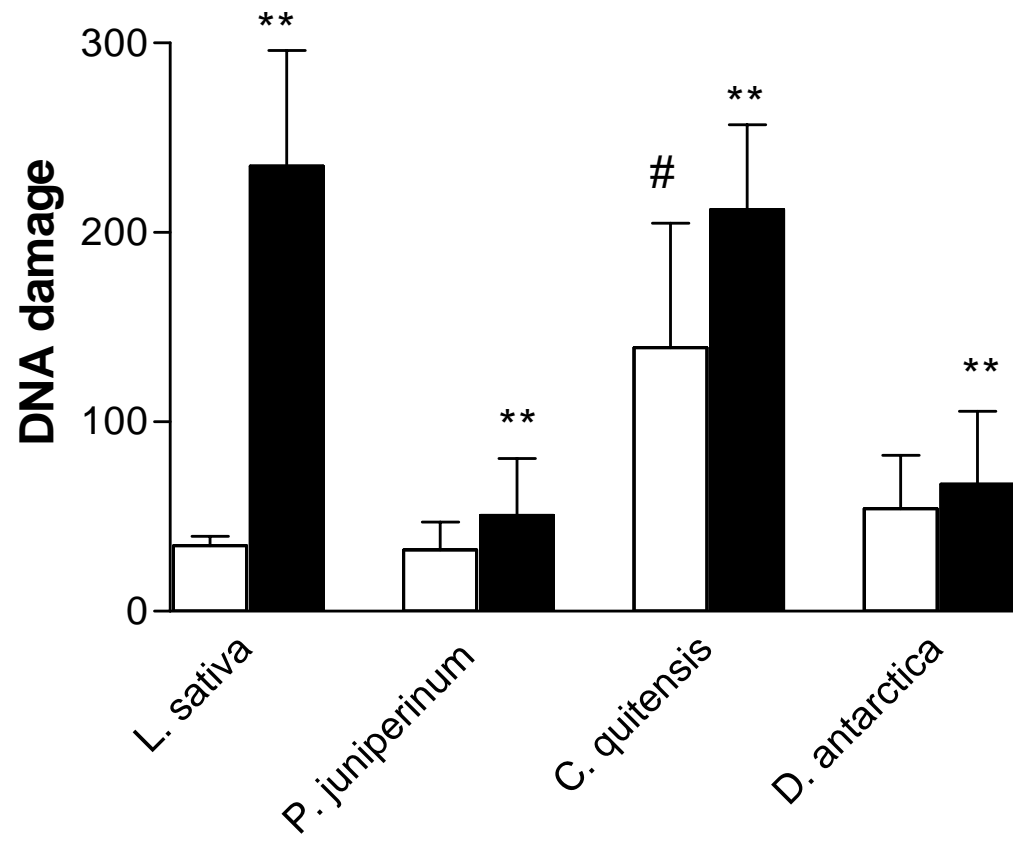


Fig.5.

Discussão



4. Discussão

Inúmeros estudos demonstram que os efeitos prejudiciais da radiação UV, incluem carcinogênese, eritema solar e envelhecimento prematuro da pele (FISCHER *et al.*, 1997). Os principais danos oxidativos relatados para o DNA são modificações na seqüência das bases do DNA e quebras simples, os quais podem ser verificados através do teste cometa (VALKO *et al.*, 2007; VALKO *et al.*, 2004; COLLINS & HORVATHOVA, 2001). Em um nível molecular, a radiação UV danifica também o DNA diretamente, provocando a produção de dímeros de pirimidina capazes de interferir na replicação do DNA, o que poderá desencadear o processo de carcinogênese foto-induzido (PFEIFER E & BESARATINIA, 2005; TAIRA *et al.*; 1992).

Ao longo da evolução, os organismos desenvolveram estratégias para se proteger da radiação ultravioleta, tornando possível a sobrevivência contínua sob a luz solar direta e intensa. Sabe-se que os organismos reagem de formas diferentes quando expostos à radiação UV, respondendo fisiologicamente por meio de vários mecanismos, como os flavonóides secretado por plantas e melanina expressa por células nos animais (COCKELL & KNOWLAND, 1999; PSOTOVA *et al.*, 2006; SCHMITZ-HORNER & WEISSENBOCK, 2003). Certamente organismos nativos de habitat com alta incidência de radiação UV, como por exemplo áreas alpinas e tropicais, tendem a desenvolver mecanismos mais diversos e eficazes para a tolerância UV do que organismos de ambientes com menor incidência de radiação UV (FROHMEYER & STAIGER, 2003; TURUNEN & LATOLA, 2005).

Historicamente, as plantas da Antártica cresciam sob os níveis de UV mais baixos na terra; entretanto, em consequência da redução da concentração do ozônio estratosférico sobre este continente, atualmente essas espécies estão expostas a um dos níveis de radiação UV mais elevados do planeta. Os organismos dessa região tiveram pouco tempo para desenvolver mecanismos de fotoproteção, porém estudos atuais demonstram que estes seres vivos

encontraram formas diversas para proteger-se ou corrigir as lesões produzidas pela elevada incidência solar (MADRONICH *et al.*, 1998; ROZEMA *et al.*, 2005). Os estudos recentes a respeito das concentrações de ozônio sobre a Antártica demonstram um acentuado declive nas últimas décadas (DIAZ *et al.*, 2006; ROZEMA *et al.*, 2005). Esta drástica redução do ozônio pode estimular a biosíntese de compostos fotoprotetores em vegetais. Nesse trabalho, investigou-se o efeito fotoprotetivo de extratos metanólicos brutos de três espécies de plantas da Antártica.

A *D. antarctica* e o *C. quitensis*. são plantas vasculares nativas do continente Antártico, ocorrendo extensivamente na regiões de Orkney ao sul, no arquipélago de Shetland do Sul, e na península Antártica. Essas espécies são fisiologicamente bem adaptadas às condições extremas de radiação de seus habitat na Antártica marítima (RUHLAND & DAY, 2001; ALBERDI *et al.*, 2002). O *P. juniperinum* é a planta mais simples encontrada no continente (VAN DER VELDE & BIJLSMA, 2000). As temperaturas baixas, combinadas com a alta incidência de UV favorecem a formação de ERO e a fotoinibição, mas a existência de mecanismos de seqüestro deste radicais livres e bloqueio da radiação promovem e tornam possível a sobrevivência neste ecossistema hostil (ABELE & PUNTARULO, 2004).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os extratos dessas espécies de plantas reduziram os danos genotóxicos e as mutações provocados por UVC em levedura, V79 e no molusco *C. aspersus*. Em linhagem selvagem de *S.cerevisiae*, todos os extratos conferiram proteção contra a citotoxicidade da radiação UVC e diminuíram a taxa de mutação induzida. Além disso, os extratos também reduziram a genotoxicidade induzida por esse agente físico nas células V79, verificado no ensaio cometa padrão. Dessa forma, os extratos dessas espécies apresentam compostos com potencial aplicação na formulação de protetores solares.

Na tentativa de explicar as propriedades citoprotetoras observadas, foram investigados os efeitos dos extratos em nível de peroxidação lipídica em células V79. O pré-tratamento com

esses extratos preveniu a peroxidação lipídica induzida por UVC, mostrando desta forma propriedades antioxidantes. Além disso, os resultados do ensaio cometa com a utilização de endonucleases lesão específica em células V79 mostram redução significativa da formação de dímeros ciclobutano piridinas, sugerindo-se desta forma que além do efeito antioxidante, o efeito protetor pode estar relacionado ao bloqueio da penetração da UVC.

O mutante de leveduras deficiente no reparo do DNA por fotoreativação é uma ferramenta útil para analisar a natureza do efeito fotoprotetivo desses compostos. O gene *PHR1* de *S.cerevisiae* expressa a enzima fotoliase, que promove a reparação exclusiva de dímeros de pirimidina. A expressão do gene *PHR1* é regulada em resposta a danos causados pela radiação UV (SANCAR, 2000). A utilização do mutante *PHR1*, combinado ao tratamento com os extratos se mostrou bastante eficiente.

Os extratos de plantas são uma mistura complexa de componentes, como polifenóis, que contribuem para a atividade global do extrato (VAN DE STAAIJ *et al.*, 2002). O efeito antioxidante observado nos experimentos pode ser explicado, ao menos em parte, pela presença de flavonóides, o maior e mais bem estudado grupo de polifenóis, evidenciado na análise preliminar fitoquímica, reconhecido como antioxidantes com um potencial quimiopreventivo em células humanas (AFAQ & MUKHATAR, 2006; MIDDLETON Jr. *et al.*, 2000; SVOBODOVA *et al.*, 2003 & ZHANG *et al.*, 2005). Além disso, o tratamento com flavonóides é capaz de promover o aumento da expressão de vários genes capazes de reparar o DNA em diferentes sistemas biológicos (HAWTHORNE, 1969; VAN DE STAAIJ *et al.*, 2002; FERGUSON, 2001). Desta forma, os flavonóides presentes no extrato metanólico bruto de *Deschampsia*, *Colobanthus* e *Polytricum* podem possuir efeitos protetores contra radiação UVC nos modelos biológicos empregados por sua ação antioxidante, absorção da UV e estímulo da reparação do DNA.

Os principais flavonóides constituintes de *Deschampsia antarctica* são glicosilflavonas, o isoswertiajaponina, 7-O-metilorientina, 2"-O-β- arabinopiranosídeo e orientina (WEBBY & MARKHAM,1994). Além disso, as análises de TLC sugerem a eventual presença de isoquercetina e rutina. A quercetina e seus derivados são as mais abundantes flavonóides naturais, potentes antioxidantes que podem prevenir contra os efeitos nocivos da radiação UV (FERGUNSON, 2001 & SVOBODOVA *et al.*,2003). Da mesma forma, a rutina é um flavonóide bem estudado com claro efeito citoprotetivo contra o estresse oxidativo e com propriedades de absorção UV (AFAQ & MUKHTAR, 2006 & ZHANG *et al.*,2006). O alto teor de flavonóides encontrados no extrato de *D.antarctica* pode ser responsável pelo seu maior efeito protetor entre os extratos avaliados, no vários modelos biológicos. Em *C. quitensis*, foi encontrado derivados de luteolina e ácido clorogênico, moléculas com atividade antioxidante capazes de seqüestrar diretamente radicais hidroxila e eliminar ERO gerados pelo peróxido de hidrogênio (KANADASWAMI *et al.*,2005; MIDDLETON Jr., *et al.*, 2000 NIJVELDT *et al.*,2001 & PIETTA,2000). As concentrações de carotenóides, que compreende o outro grupo de pigmentos dotados de função fotoprotetora, estão presentes de forma consistente nessas espécies. Em *D.antarctica* mais de 11 carotenóides foram identificados, certamente contribuindo para o efeito protetor (XIONG & DAY,2001). Em *C. quitensis*, que possui uma concentração significativamente mais elevada de pigmentos UV-absorventes, quatorze carotenóides foram identificados (COCKELL & KNOWLAND,1999). Os estudos de análise de carotenóides e flavonóides têm demonstrado aumento nas concentrações quando estas espécies vegetais são expostas a maiores índices de UV (RUHLAND *et al.*, 2005; XIONG & DAY,2001).

As folhas de *D.antarctica* e *P.juniperinum* não foram citotóxicas ou genotóxicas no molusco *C. aspersus* e também foram capazes de impedir os danos induzidos por UVC. Curiosamente, as folhas de *C. quitensis* foram genotóxicas em *C.aspersus*, possivelmente devido a diferenças de metabolização entre os sistemas biológicos avaliados, pois mesmo que existam

alguns indícios do envolvimento do citocromo P450 no metabolismo de xenobióticos em gastrópodes, estas biotransformações são muitas vezes inconsistentes e controversas em invertebrados (REGOLI *et al.*,2006). Considere-se também que nem todos os flavonóides possuem ação benéfica. Alguns têm efeitos genotóxico, mutagênicos e/ou pró-oxidante, e podem interferir nas rotas bioquímicas dos organismos teste (FERGUNSON,2001 & RIETJENS,2005).

Conclusões



5. Conclusões

5.1. Conclusão geral

Os extratos de *D. antarctica*, *C. quitensis* e *P. juniperinum* parecem possuir propriedades fotoprotetivas, o que pode ser atribuído a moléculas como flavonóides e carotenóides agindo como moléculas absorventes de UV, antioxidantes e estimulando processos de reparação do DNA.

5.2. Conclusões específicas

5.2.1. As concentrações empregadas desses extratos não foram citotóxicas nem mutagênicas em *S.cerevisiae*. Além disso, o tratamento com todos os extratos melhorou a sobrevivência e diminuiu a taxa de mutagênese induzida por UVC nesse modelo biológico.

5.2.2. Os tratamentos empregados diminuíram significativamente os danos ao DNA induzidos pela UVC em células V79, como verificado pelo ensaio cometa. Esses extratos também reduziram a peroxidação lipídica induzida por UVC, mostrando uma clara propriedade antioxidante.

5.2.3. Os resultados do ensaio cometa modificado, em células V79, empregando a Endonuclease V, demonstraram uma diminuição na formação de dímeros de ciclobutano piridina após a pré - incubação com estes extratos. O emprego das endonucleases FPG e ENDO III indica um efeito protetor destes extratos contra as lesões oxidativas geradas pelo UVC.

5.2.4. Em linhagens de levedura deficientes em fotoliase, o tratamento com os extratos não se mostrou tão efetivo na proteção contra os danos citotóxicos da radiação UVC, sugerindo que esta via de reparação do DNA é estimulada por substâncias dos extratos.

5.2.5. Em *C.aspersus*, o tratamento com os vegetais na alimentação dos moluscos, foi capaz de proteger contra os danos induzidos por UVC nas células da hemolinfa.

5.2.6. Verificou-se a presença de flavonóides nos extratos utilizados.

Perspectivas



6. Perspectivas

Para o seguimento desse trabalho planeja-se

6.1. Análise fitoquímica para separação, por metodologias preparativas, e identificação dos componentes majoritários presentes nos extratos, empregando técnicas como espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear.

6.2. Verificação do efeito fotoprotetor dos extratos de plantas da antártica em camundongos submetidos a radiação ultravioleta empregando ensaios biológicos utilizados em preparações de fotoprotetores tópicos.

6.3. Estudo fotoprotetor dos extratos em células de fibroblastos humanos contendo mutações em genes da via de reparo por excisão de nucleotídeos em relação aos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos da radiação UVC nessa linhagem celular, empregando o ensaio de sobrevivência clonogênica, teste cometa e ensaio de micronúcleos.



Referências bibliográficas

ABELE, D.& PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 138:405-415,2004.

AFAQ F. & MUKHATAR H. Botanical Agents in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Exp. Dermatol* 15: 678-684, 2006.

AGAR, N. & YOUNG, A.R. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage. *Mutat Res.* 571(1-2):121-32, 2005. Review.

ALBERDI M.; BRAVO L.A.; GUTIERREZ A.; GIDEKEL M. & CORCUERA L.J. Ecophysiology of Antarctic vascular plants. *Physiol Plant.* 115:479-486, 2002.

BARTLEY, G.E. & SCOLNIK, P.A. Plant Carotenoids: Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health. The *Plant Cell*, 7, 1027-1038, *American Society of Plant Physiologists*, 1995.

BARTLEY, G.E. & SCOLNIK, P.A. Plant Carotenoids: Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health. *Journal of bacteriology* 189: 3793–3803, 2007.

BAUM, M.; FAUTH, E, *et al.* Acrylamide and glycidamide: approach towards risk assessment based on biomarker guided dosimetry of genotoxic/mutagenic effects in human blood. *Adv Exp Med Biol* 561, 77-88, 2005.

BOEIRA J.; VIANA A.; PICADA J.N. & HENRIQUES J.A.P. Genotoxic and recombinogenic activities of the two β -carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mut. Res.* 500:39-48, 2002.

BOITEUX, S.; GELLON, L. & GUIBOURT, N. Repair of 8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*: interplay of DNA repair and replication mechanisms. *Free Radical Biol Med.* 15; 32:1244-1253,2002.

BOITEUX, S. & GUILLET, M. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*. 5:1-12, 2004.

BOLOGNESI, C.; BUSCHINI, A.; BRANCHI, E.; CARBONI, P.; FURLINI, M.; MARTINO, A.; MONTEVERDE, M.; POLI, P. & ROSSI, C. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Sci Total Environ.*, 333:127-36, 2004.

BOONE, C; BUSSEY, H.; ANDREWS, B.J. Exploring genetic interactions and networks with yeast. *Nat Rev Genet.* Jun; 8:437-449,2007.

BRAVO, L.A. & GRIFFITH, M. Characterization of antifreeze activity in Antarctic plants. *J Exp Bot.* 56 :1189-96, 2005.

BRENDEL, M. & HENRIQUES, J.A.P. The *ps0* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. *Mutation Reserch*, 489: 79-96, 2001.

BRENDEL, M.; BONATTO, D.; STRAUSS, M.; REVERS, L.F.; PUNGARTNIK, C.; SAFFI, J.& HENRIQUES, J.A. Role of *PSO* genes in repair of DNA damage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res.* 544:179-93, 2003.

CAMPA, A.; ESPOSITO, G.; BELLI, M.; SIMONE, G.; TABOCCHINI, M.A.; DNA fragmentation in V79 cells irradiated with light ions as measured by pulsed-field gel electrophoresis. II. Simulation with a generalized broken stick model. *Int J Radiat Biol* 80:229-238, 2004.

COCKELL, C.S. & KNOWLAND, J.. Ultraviolet radiation screening compounds, *Biol Rev Camb Philos Soc.* 74:311-345,1999.

COLLINS, AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.*, 26:249-61, 2004.

COLLINS, A.; DUSINSKÁ, M.; FRANKLIN, M.; SOMOROSVSKÁ, M.; PETROVSKÁ, H.; DUTHIE, S.; FILLION, L.; PANAYIOTIDIS, M.; RASLOVÁ, K. & VAUGHAN, N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 30: 139-146, 1997.

COLLINS, A.R. & HORVATHOVA, E. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochem Soc Trans* 29:337-341, 2001.

DAY, T.A.; RUHLAND, C.T. & XIONG F.S. Influence of solar ultraviolet-B radiation on Antarctic terrestrial plants: results from a 4-year field study. *J Photochem Photobiol B.* 62:78-87, 2001.

DENG, C.Z.; FONS, M.P.; ROSENBLATT, J.; EL-ZEIN, R.A., ABDEL-RAHMAN S.Z.; ALBRECHT, T. Nickel potentiates the genotoxic effect of benzo[a]pyrene in Chinese hamster lung V79 cells. *Environ Mol Mutagen* 47, 150-161, 2006.

S. DIAZ, S.; CAMILION, C.; EFERRARI, G.; FUENZALIDA, H.; ARMSTRONG, R. ; BOOTH, C.; PALADINI, A.; CABRERA, S.; CASICCIA, C.; LOVENGREEN, C.; PEDRONI, J.; ROSALES, A.; ZAGARESE, H. & VERNET, M. Ozone and UV radiation over southern South America: climatology and anomalies, *Photochem Photobiol* 82:834-843, 2006.

DIZDAROGLU, M. Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutat Res.*, 591:45-59, 2005.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95, 2002.

FERGUSON, L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutat Res*, 475:89-111, 2001.

FISHER, G.J.; WANG, Z.Q.; DATTA, S.C.; VARANI, J.; KANG, S. & VOORHEES, J.J. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 337: 1419-1428,1997.

FORSBURG S. L.,2001. The art and design of genetic screens: yeast .*Nature Reviews Genetics* 2: 659 – 668, 2001.

FRIEDBERG, E.C. & HENNINGK, A. The conundrum of xeroderma pigmentosum-a rare disease with frequent complexities. *Mutat. Res.* 289: 47-53, 1993.

FROHNMEYER, H. & STAIGER,D. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiol* 133: 1420-1428, 2003.

GATÉ, L.; PAUL, J.; BAGNTEW, K.D. & TAPIERO H. Oxidative stress induced in pathologies the role of oxidants. *Biomed Pharmacother* 53:169-80, 1999.

GEDIK, C.M. & COLLINS, A. Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *FASEB J.* 19:82-84, 2004.

GIDEKEL, M.; DESTEFANO-BELTRÁN, L., GARCIA P, MUJICA, L.; LEAL P.; CUBA, M.; FUENTES, L.; BRAVO, L.A.; CORCUERA, L.J.; ALBERDI, M.; CONCHA, I. & GUTIERREZ A. Identification and characterization of three novel cold acclimation-responsive genes from the extremophile hair grass *Deschampsia antarctica* Desv. *Extremophiles* Dec;7:459-69, 2003.

GIELWANOWSKA, I.; SZCZUKA, E.; BEDNARA, J. & GARECKI, R. Anatomical features and ultrastructure of *Deschampsia Antarctica* (Poaceae) leaves from different growing habitats. *Ann Bot (Lond)* 96:1109-19, 2005.

GILCHREST, B.A.; ELLER, M.S.; GELLER, A.C.; YAAR,M. The pathogenesis of melanoma induced ultraviolet radiation. *N. Engl. J. Med.* 340:1341-1348,1999.

GIOVANNELLI, L.; PITOZZI, V.; RIOLO, S. & POLARA, P. Measurement of DNA breaks and oxidative damage in polymorphonuclear and mononuclear white blood cells: a novel approach using the comet assay. *Mutat Res.* 538:71-80,2003.

HARTMANN, A.; KISKINIS, E.; FJÄLLMAN, A. & SUTER, W. Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline comet assay. *Mutat Res.*, 497:199-212, 2001.

HENRIQUES, J.A.P.; VALSA J. & GOMES, R.A. Utilização de testes com microrganismos para detecção de atividades mutagênicas e/ou potencialmente oncogênicas. In: Pinto, S.O.C. (Ed), *Genética Molecular de Microrganismos*,1987.

HOUGHTON, A. N. & POLSKY D., Focus on melanoma. *Cancer Cell* 275-278, 2002.

ISMERT, M.; OSTER, T. & BAGREL, D. Effects of atmospheric exposure to naphthalene on xenobiotic-metabolising enzymes in the snail *Helix aspersa*. *Chemosphere*, 46:273-80, 2002.

JAGETIA, A.; JAGETIA, G.C.; JHA, S.; Naringin, a grapefruit flavanone, protects V79 cells against the bleomycin-induced genotoxicity and decline in survival. *J Appl Toxicol* 27,122-132, 2007.

JOO, L.M.; MACFARLANE-SMITH, L.R. & OKEKE I.N. Error-Prone DNA Repair System in Enterotoxigenic *Escherichia coli* Identified by Subtractive Hybridization. *Journal of bacteriology*, 189: 3793–3803, 2007.

KANADASWAMI,C.; LEE,L.T.; LEE,P.P.; HWANG,J.J.; KE,F.C.; HUANG,Y.T. & LEE, M.T. The antitumor activities of flavonoids, *In Vivo* 19:895-909,2005.

KANG, K.A.; BU, H.D.; PARK, D.S.; GO, G.M.; JEE, Y., SHIN, T. & HYUN J.W. Antioxidant activity of ethanol extract of *Callophyllis japonica*. *Phytother Res* 19,506-510, 2005.

KARAKAYA, A.; JARUGA, P.; BOHR, V.A.; GROLLMAN, A.P. & DIZDAROGLU, M. Kinetics of excision of purine lesions from DNA by Escherichia coli Fpg protein. *Nucleic Acids Res.*25:474-9,1997.

KIM, K.T.; YOO, K.M.; LEE, J.W.; EOM, S.H.; HWANG, I.K. & LEE, C.Y. Protective effect of steamed American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) on V79-4 cells induced by oxidative stress. *J Ethnopharmacol* 111, 443-450, 2007.

KUPIEC M. Damage-induced recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut. Res.*, 451:91-105,2000.

LAFON, A.; CHANG, C.S.; SCOTT, E.M.; JACOBSON, S.J. & PILLUS, L. MYST opportunities for growth control: yeast genes illuminate humancancer gene functions *Nature/Oncogene* 26, 5373–5384,2007.

LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, H.C. & PITTELKOW, M.R. Photoprotection. Review. *Lancet*, 11;370(9586):528-37,2007.

LEE, R.F. & STEINERT, S. Use of the single Cell Gell Electroforesis/Comet Assay for detecting DNA damage in Aquatic(marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.*, 544: 43-64,2003.

LEWIS, R. I. The enigma of *Colobanthus quitensis* e *Deschampsia antártica* in Antarctica. In: Huiskes, A.H.L.; Gieskes, W.W.C.; Rozema, J.; Schorno; R.M. Van der Vies, S.M. & Wolff, W.J. *Antarctic Biology in a Global Context*, 234-239, 2003.

LUSHCHAK, V.I. Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. *ACTABP* 53(4): 679–684,2006.

MARIS, A. F.; ASSUMPÇÃO, A.L.K.; BONATO, D., BRENDDEL, M. & HENRIQUES, J. A. P. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. *Current Genetics*, 39: 137-149,2001

MADRONICH, S.; MCKENZIE, S.L.; BJORN,L.O. & CALDWELL,M.M. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface, *J Photochem Photobiol B* 46:5-19,1998.

MENACHO-MÁRQUEZ. M & MURGUÍA, J.R. Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clin Transl Oncol* 9:000-009, 2007.

MCBRIDE, J.M.; KRAEMER, W.J. Free radicals, exercise and antioxidants. *J Strength Cond Res*, 13:175-83,1999.

MCKENZIE, R.L.; AUCAMP, P.J., BAIS, A.F.; BJÖRN, L.O. & ILYAS, M. Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochem Photobiol Sci*,6(3):218-31,2007 .

MELO, A.A.; QUEROL, C.B.; HENRIQUES, A.T. & HENRIQUES, J.A.P. Cytostatic, cytotoxic and mutagenic effects of vincristine an indole alkaloid in wild-type and repair-deficient yeasts. *Mut. Res.*, 171:17-24, 1986.

MIDDLETON, E. JR.; KANDASWAMI, C & THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol Rev* 52 673-751,2000.

MOORE, D.M. **Flora of Tierra del Fuego**. Missouri Botanical Garden USA. 396p,1983.

MORENO, P.R.H.; VARGAS, V.M.F.; ANDRADE H.H.R.; HENRIQUES A.T. & HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of the boldine aporphine alkaloid in prokaryotic and eukaryotic organisms, *Mut. Res.* 260:145-152,1991.

MOURA, D.J.; RICHTER, M.F.; BOEIRA, J.M.; HENRIQUES, J.A.P. & SAFFI J. Antioxidant properties of beta-carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis*, 22(4):293-302, 2007.

MULLER, D.L. & WEINSTOCK, M.A. Nonmelanoma skin cancer in the United State: incidence, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 30: 275-278,1994.

NIJVELDT,R.J.; VAN NOOD,E.; VAN HOORN,D.E.; BOELEN, P.G.; VAN NORREN,K. & VAN LEEUWEN,P.A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am J Clin Nutr* 74 : 418-425,2001.

OSADA, Y.; KUMAGAI, T.; MASUDA, K.; SUZUKI, T.; KANAZAWA, T. Mutagenicity evaluation of *Schistosoma* spp. extracts by the umu-test and V79/HGPRT gene mutation assay. *Parasitol Int* 54, 29-34, 2005.

PASQUAL, M.; LAUER, C.; MOYNA, P. & HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of the isoquinoline alkaloid berberine in prokaryotic and eukaryotic organisms, *Mut. Res.*, 286 : 243-252,1993.

PAULA-RAMOS, A.L.L.; QUEROL, C.; MARQUES, E.K.; HENRIQUES, J.A.P. Cytotoxic activation of the pyrrolizidine alkaloid integerrimine in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is caused by repairable DNA damage. *Rev. Bras. Genet.*, 14:897-912,1991.

PARRY E. & PARRY J.The assay of genotoxicity of chemicals using the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, In: Mutagenecity testing: A practival approach. Vanitt S., Parry S. (Eds), ORL Press, Oxford, Washington DC.1984.

PEÑA-CASTILLO L, HUGHES TR. Why are there still over 1000 uncharacterized yeast genes? *Genetics*, 176(1):7-14, 2007.

PFEIFER, G.P.; YOU, Y.H & BESARATINIA, A. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Re.s* 571 19-31,2005.

PSOTOVA, J.; SVOBODOVA, A.; KOLAROVA, H. & WALTEROVA,D. Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. *J Photochem Photobiol B* 84: 167-174,2006.

PUNGARTNIK, C.; PICADA, J.; BRENDEL, M. & HENRIQUES, J.A. Further phenotypic characterization of pso mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with respect to DNA repair and response to oxidative stress. *Genet Mol Res.*1(1):79-89, 2002.

REGOLI, F.; GORBIS.; FATTORINI,D.; TEDESCO,S. NOTTI,A.; MACHELLA,N.; BOCCHETTI,R.; BENEDETTI,M. & PIVA,F. Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach, *Environ Health Perspect* 114: 63-69,2006.

I.M. RIETJENS,I.M.;BOERSMA,M.G.; VAN DER WOUDE,H.; JEURISSEN,S.M.; SCHUTTE,M.E. & ALINK,G.M. Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. *Mutat Res* 574:124-138,2005.

ROSA, R.M.; SULZBACHER, K.; PICADA, J.N.; ROESLER, R.; SAFFI, J.; BRENDEL, M. & HENRIQUES, J.A. Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast. *Mutant Res.*,10:107-15,2005.

ROZEMA, J.; BOELEN,P.; & BLOKKER,P. Depletion of stratospheric ozone over the Antarctic and Arctic: responses of plants of polar terrestrial ecosystems to enhanced UV-B, an overview. *Environ Pollut* 137:428-442,2005.

RUHLAND, C.T. & DAY, T.A. Size and longevity of seed banks in Antarctica and the influence of ultraviolet-B radiation on survivorship, growth and pigment concentrations of *Colobanthus quitensis* seedlings. *Environ Exp Bot.*, 45(2):143-154,2001.

RUHLAND, C.T.; XIONG, F.S.; CLARK, W.D. & DAY, T.A. The influence of ultraviolet-B radiation on growth, hydroxycinnamic acids and flavonoids of *Deschampsia antarctica* during Springtime ozone depletion in Antarctica. *Photochem Photobiol.*, 81(5):1086-93,2005.

SAFFI, J.; HENRIQUES, João Antonio Pêgas . Reparação de DNA em Células Eucarióticas. In: João Antonio Pêgas Henriques; Bernardo Erdtmann; Juliana da Silva. (Org.). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, p. 271-305,2003.

SANCAR, G.B. Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting. *Mutat Res.* 451(1-2):25-37,2000.

SAUVAIGO, S.; PETEC-CALIN, C.; CAILLAT, S.; ODIN, F. & CADET, J. Comet assay coupled to repair enzymes for the detection of oxidative damage to DNA induced by low doses of gamma-radiation: use of YOYO-1, low-background slides, and optimized electrophoresis conditions. *Anal Biochem.* ,1;303(1):107-9,2002.

SIMON, JA & BEDALOV; A. Yeast as a model system for anticancer drug discovery. *Nat Rev Cancer.* Jun;4(6):481-92, 2004.

SINGH, N.P. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat. Res.*455:111-127, 2000.

SCHMITZ-HOERNER, R. & WEISSENBOCK, G. Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels. *Phytochemistry* 64:243-255,2003.

SLAMENOVA, D.; HORVATHOVA, E.; SRAMKOVA, M.; MARSALKOVA, L. DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured in vitro. *Neoplasma* 54, 108-112, 2007.

SPEIT, G.; SCHUTZ, P.; HOFFMANN, H.; Genotoxic effects of exposure to radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) in cultured mammalian cells are not independently reproducible. *Mutat Res* **626**, 42-47, 2007.

STAHL, W. & SIES, H. Carotenoids and Flavonoids Contribute to Nutritional Protection against Skin Damage from Sunlight. *Mol Biotechnol.*, 37(1):26-30,2007.

STEENVOORDEN, D.P. & VAN HENEGOUWEN, G.M.(1997).The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J Photochem Photobiol B.*, 41(1-2):1-10, 1997.

STEINMETZ LARS, M.; SCHARFE, C.; ADAM, M.; DEUTSCHBAUER, B.; MOKRANJAC, D.; HERMAN, Z.S.; JONES, T.; CHU, A.M.; GIAEVER, G.; PROKISCH, H.; OEFNER, P.J. & DAVIS, R.W.. Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nature Genetics*, 31: 400 – 404, 2002.

STURGEON, C. M.; KEMMER, D.; ANDERSON, H. J. & ROBERGE, M. Review Yeast as a tool to uncover the cellular targets of drugs. *Biotechnol. J.*, 1, 289–298, 2006.

SVOBODOVA, A.; WALTEROVA, D. & VOSTALOVA, J.; Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*, 150(1):25-38, 2006

TAIRA, J.; MIMURA, K.; YONEYA, T.; HAGI, A.; MURAKAMI, A. & K. MAKINO Hydroxyl radical formation by UV-irradiated epidermal cells. *J Biochem (Tokyo)* 111 693-695, 1992.

TICE, R.R. Applications of the Single Cell Gell Assay to Enviromental Biomonitoring for Genotoxic Polluants. *Biomonitor and Biomarkers as Indicator for Enviromental Change* 69-76-1995.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C. & SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.*, 35(3):206-21, 2000.

TOUSSAINT, M. & CONCONI A. High-throughput and sensitive assay to measure yeast cell growth: a bench protocol for testing genotoxic agents. *Nature Protocols* 1, 1922-1928, 2006.

TRUEBA, G.P & SANCHES, G.M. Los Flavonóides como antioxidantes naturales. *Acta Farm. Bonaerense*, 20: 297-306, 2001.

TURUNEN, M. & LATOLA, K. UV-B radiation and acclimation in timberline plants. *Environ Pollut* 137:390-403, 2005.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C.J. & TELSNER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 266(1-2):37-56,2004.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M. & MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.*, 10;160(1):1-40, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M. & TELSNER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, 39(1):44-84.2007.

VAN DE STAAIJ, J.; DE BAKKER, N.V.; OOSTHOEK, A.; BROEKMAN, R.; VAN BEEM, A.; STROETENGA, M.; AERTS, R. & ROZEMA, J. Flavonoid concentrations in three grass species and a sedge grown in the field and under controlled environment conditions in response to enhanced UV-B radiation.. *J Photochem Photobiol B.*, 66(1):21-9, 2002.

VAN DER VELDE, M. & BIJLSMA,R. Amount and structure of intra- and interspecific genetic variation in the moss genus *Polytrichum*. *Heredity* 85 Pt 4 328-337,2000.

VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I.M.; SILVA, J. & HENRIQUES, J.A.P. DNA Damage and Repair in Haemolymph Cells of Golden Mussel (*Limnoperna fortunei*) Exposed to Environmental Contaminants. *Mutation Research*, 697: 78-86,2006.

VILLELA, I. V. ; OLIVEIRA, I. ; SILVEIRA, J. C. ; DIAS, J. ; HENRIQUES, J. A. P. & SILVA, J. . Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 628: 76-86, 2007.

VON BORSTEL, R.C.; CAIN, K.T. & STEINBERG, C.M. Inheritance of spontaneous mutability in yeast. *Genetics*, 69:17-27,1971.

WEBBY, R.F. & MARKHAM, K.R., 1994, Isoswertiajaponin 2"-O-beta-arabinopyranoside and other flavone-C-glycosides from the Antarctic grass *Deschampsia antarctica*. *Phytochemistry*, 36 (5):1323-6,1994.

WEI, H.; YUHUN LU, R.S.; WANG, Y.; PALEP, S. R.; MOORE, J.; SHYONG, R.P.E. & LEBWOHL, L.G. Isoflavone Genistein: Photoprotection and Clinical Implications in Dermatology. International Research Conference on Food, Nutrition, and Cancer. *Dermatology. J. Nutr.*, 133: 3811S–3819S, 2003.

WILLIAMSON, D. The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nat Rev Genet.* Jun;3(6):475-81,2002.

XIONG, F.S. & DAY, T.A. Effect of solar ultraviolet-B radiation during springtime ozone depletion on photosynthesis and biomass production of Antarctic vascular plants. *Plant Physiol* 125 : 738-751,2001.

YASOSHIMA, M. & TAKANO, B. *Bradybaena similaris* Shell as a Biomonitor of Copper, Cadmium, and Zinc. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 66:239–248, 2001.

ZHANG, H. & SIEDE, W. UV-induced T-->C transition at a TT photoproduct site is dependent on *Saccharomyces cerevisiae* polymerase eta in vivo. *Nucleic Acids Res* 30 1262-1267,2002.

ZIMMERMANN, F. Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut. Res.* 31:71-86,1975.

