



ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICOS 3-ACQ E 5-ACQ EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*

Lucas Petitemberte de Souza¹
Idna de Carvalho Barros²
Rafael Rodrigues Dihl³
Mauricio Lehmann³

RESUMO

O ácido clorogênico integra o grupo dos fenóis antioxidantes e atua em diversos sistemas biológicos, sendo associados a atividades antitumoral, analgésica, antimicrobiana, antioxidante, antiaterosclerose e antidiabetes. Este polifenol além de ser abundante no café, pode também ser encontrado na erva mate, ameixa, maçã e batata. Os isômeros do ácido clorogênico são denominados conforme a posição do grupo hidroxila na qual ocorre a esterificação do ácido quínico. Quando a isomeria encontra-se na posição 3 é denominado de ácido 3-O-cafeoilquínico (3-ACQ), e quando ocorre na posição 5 é chamado de ácido 5-O-cafeoilquínico (5-ACQ). O presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antimutagênica do 3-ACQ e 5-ACQ através do teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *D. melanogaster*, nos protocolos de co- e pós-tratamento, sobre os danos genéticos induzidos pelo etil-metanosulfonato (EMS) e pela 4-nitroquinoleína-1-óxido (4NQO). Os dois isômeros, nas concentrações de 200, 400 e 800 µM, não foram capazes de modular a atividade mutagênica do EMS nos protocolos de co- e pós-tratamento. Por outro lado, o 3-ACQ, na concentração de 400 µM, e o 5-ACQ, nas três concentrações utilizadas, foram capazes de reduzir a incidência de danos genéticos induzidos pela 4NQO no protocolo de co-tratamento. Não foram observados efeitos moduladores dos ácidos clorogênicos frente aos danos induzidos pela 4NQO no sistema de pós-tratamento. Os resultados apontam para um efeito protetor dos ácidos clorogênicos 3-ACQ e 5-ACQ sobre danos oxidativos induzidos no DNA pelo 4NQO e que esta proteção pode estar associada à atividade antioxidante, descrita na literatura científica.

Palavras chave: compostos fenólicos, EMS, 4-NQO, mutação, recombinação somática.

INTRODUÇÃO

Ácido clorogênico é a nomenclatura utilizada para identificar o grupo de ésteres mais abundantes contidos na dieta humana. Eles são formados a partir da reação de esterificação entre compostos fenólicos denominados ácidos transcinâmicos (*p*-cumárico, ferúlico e cafeico) com o ácido quínico (ácido 1,3,4,5-tetrahidroxíciclohexano carboxílico) (MILLS et al., 2013).

O ácido clorogênico integra o grupo dos fenóis antioxidantes e atua em diversos sistemas biológicos, sendo associados a atividades antitumoral, analgésica, antimicrobiana, antioxidante, antiaterosclerose e antidiabetes (Kremr et al., 2016). Este polifenol além de ser abundante no café, pode ser encontrado ainda na erva mate, bem como na ameixa, maçã e na batata (Kremr et al., 2016).

O ácido clorogênico cuja isomeria encontra-se na posição 3 é denominado de ácido 3-O-cafeoilquínico (3-ACQ); se a isomeria situar-se na posição 4, este é especificado como ácido 4-O-cafeoilquínico (4-ACQ); já a isomeria na posição 5 denomina-o como ácido 5-O-

¹Aluno do Curso de Graduação em Biologia – Bolsista PROBIC/FAPERGS – lucasouza@ulbra.edu.br

²Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada À Saúde (PPGBioSaúde)– idnabarros@gmail.com

³Professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada À Saúde (PPGBioSaúde)-rafael.rodriques@ulbra.br e mauriciol@ulbra.br

cafeoilquínico (5-ACQ), conforme nomenclatura sistematizada pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (KREMR et al., 2016).

Resultados descritos na literatura já apontam os efeitos quimiopreventivos de bebidas como o café e chá mate, que possuem altas concentrações destes compostos. Além disto, os efeitos protetores do café contra mutação somática e recombinação mitótica induzida pela ciclofosfamida (CPH), mitomicina C (MMC) e uretano (URE) foram avaliados através do teste SMART em *D. melanogaster*. Contudo, embora os resultados tenham evidenciado efeitos inibitórios dose-dependentes sobre a indução de mutação e recombinação gerada pelos mutágenos, os autores reforçam a necessidade de estudos mais elaborados sobre os aspectos qualitativos e quantitativos dos efeitos protetores do café e seus constituintes individuais, bem como com outras diversificadas classes de genotoxinas (ABRAHAM; GRAF, 1996).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimutagênica dos ácidos clorogênicos 3-ACQ e 5-ACQ sobre os danos genéticos induzidos pelo etil-metano-sulfonato (EMS) e pela 4-nitroquinoleína-1-óxido (4NQO) através do teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *D. melanogaster*.

METODOLOGIA

Neste estudo foi empregado o teste SMART de acordo com o descrito em Andrade; Lehmann e Reguly (2004). Foi utilizado o cruzamento padrão, com fêmeas de *D. melanogaster* da linhagem *flr³* e machos da linhagem *mwh*. Com o objetivo de avaliar a antimutagenicidade dos ácidos clorogênicos foram utilizados dois protocolos de tratamento:

- Co-tratamento, onde as larvas coletadas do meio de ovoposição foram submetidas ao tratamento crônico no qual foram utilizados os seguintes grupos de tratamento: controle negativo (água destilada e deionizada e etanol 5% + Tween 80 5%); controle positivo (EMS 5 mM e 4NQO 2 mM); três diferentes concentrações de 3-ACQ e 5-ACQ (200, 400 e 800 µM) combinadas com as genotoxinas.

- Pós-tratamento: as larvas coletadas dos meios de ovoposição foram, inicialmente, submetidas ao tratamento agudo por um período de 3 h (EMS) ou 6 h (4NQO) onde quatro grupos de tratamento foram utilizados: (i) água destilada 6 h; (ii) água destilada 3h; (iii) EMS 46 mM (3 h); (iv) 4NQO 30 mM (6 h). Posteriormente, estas larvas foram lavadas com água e pós-tratadas com: (i) água destilada; (ii) três diferentes concentrações de 3-ACQ e 5-ACQ (200, 400 e 800 µM).

Para a avaliação estatística dos dados foi utilizado o teste binomial condicional de Kastambaum e Bowman (1970), seguindo o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Würzler (1988). Adicionalmente, com o objetivo de confirmar os resultados positivos e excluir *outliers* foi efetuado o teste U de Wilcoxon, Mann e Whitney (Frei e Würzler, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dois compostos não apresentaram atividade modulatória sobre os danos induzidos pelo EMS tanto no protocolo de co-tratamento como no pós-tratamento (Tabelas 1 e 2). Não foram observadas diferenças significativas na frequência de todos os tipos de manchas nas três concentrações avaliadas.

Os resultados parciais referentes à investigação da atividade antimutagênica do 3-ACQ e 5-ACQ sobre os danos induzidos pelo mutágeno 4NQO estão descritos nas Tabelas 3 e 4.

No protocolo de co-tratamento o 3-ACQ reduziu a frequência total de manchas apenas na concentração de 400 µM (Tabela 3), quando comparado ao tratamento como o 4NQO isolado. Nesta concentração também houve redução significativa na frequência de manchas simples pequenas e grandes. Apesar da redução observada na frequência de manchas simples pequenas na concentração de 800 µM, não houve alteração no total de manchas, que é

utilizado como parâmetro para a análise final do potencial modulador. Por outro lado, o 5-ACQ reduziu a frequência total de manchas em relação ao tratamento com 4NQO em todas as concentrações utilizadas (Tabela 3). Decréscimos significativos também foram observados nas manchas simples pequenas e grandes na concentração de 400 μM .

Tabela 1: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr³* do cruzamento padrão (CP) após exposição crônica de larvas de 3º estágio aos ácidos clorogênicos 3-ACQ e 5-ACQ e ao co-tratamento do 3-ACQ e 5-ACQ com EMS

Tratamento	N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diag. estatístico ^b				Total de Manchas <i>mwh</i> ^d (n)	
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^c <i>m</i> = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) ^c <i>m</i> = 5	Manchas gêmeas <i>m</i> = 5	Total de Manchas <i>m</i> = 2		
CN ^a	60	0,50 (30)	0,10 (06)	0,03 (02)	0,63 (38)	38	
EMS 5 mM	60	55,82 (3349) *	19,17 (1150) *	10,93 (656) *	85,92 (5155) *	4986	
3-ACQ EMS							
	(μM)	(mM)					
200	5	60	53,95 (3237) -	19,02 (1141) -	12,70 (762) -	85,67 (5140) -	4935
400	5	60	51,13 (3068) -	18,82 (1129) -	11,25 (675) -	81,20 (4872) -	4632
800	5	60	47,27 (2836) -	17,97 (1078) -	11,05 (663) -	76,28 (4577) -	4343
5-ACQ EMS							
	(μM)	(mM)					
200	5	60	54,45 (3267) -	17,58 (1055) -	10,05 (603) -	82,08 (4925) -	4722
400	5	60	51,28 (3077) -	18,32 (1099) -	10,92 (655) -	80,52 (4831) -	4622
800	5	60	58,00 (3480) -	19,73 (1184) -	11,07 (664) -	88,80 (5328) -	5095

^aCN: controle negativo, água destilada e deionizada. ^bDiagnóstico estatístico: *, positivo quando comparado ao CN através do teste binomial condicional. -, negativo quando comparado ao tratamento com EMS através do teste binomial condicional e teste U de Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würzler, 1995); *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=\beta=0,05$. ^cInclui manchas simples *flr³* raras. ^dConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Tabela 2: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr³* do cruzamento padrão (CP) após exposição aguda de larvas de 3º estágio ao tratamento com EMS (46 mM) seguido do pós-tratamento com três concentrações de 3-ACQ e 5-ACQ

Tratamento ^a	N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diag. estatístico ^b				Total de Manchas <i>mwh</i> ^d (n)	
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^c <i>m</i> = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) ^c <i>m</i> = 5	Manchas gêmeas <i>m</i> = 5	Total de Manchas <i>m</i> = 2		
CN	60	0,43 (26)	0,08 (05)	0,03 (02)	0,55 (33)	33	
EMS 46 mM	60	7,12 (427) *	7,88 (473) *	6,75 (405) *	21,75 (1305) *	1151	
3-ACQ EMS							
	(μM)	(mM)					
200	46	60	9,15 (549) -	7,18 (431) -	6,02 (361) -	22,35 (1341) -	1199
400	46	60	9,37 (562) -	6,90 (414) -	6,15 (369) -	22,42 (1345) -	1236
800	46	60	8,45 (507) -	6,77 (406) -	5,25 (315) -	20,47 (1228) -	1115
5-ACQ EMS							
	(μM)	(mM)					
200	46	60	8,80 (528) -	7,02 (421) -	6,10 (366) -	21,92 (1315) -	1196
400	46	60	9,53 (572) -	8,25 (495) -	6,73 (404) -	24,52 (1471) -	1323
800	46	60	7,62 (457) -	6,85 (411) -	5,90 (354) -	20,37 (1222) -	1072

^aCN: controle negativo, água destilada e deionizada. ^bDiagnóstico estatístico: *, positivo quando comparado ao CN através do teste binomial condicional. +, positivo; -, negativo quando comparado ao tratamento com EMS através do teste binomial condicional e teste U de Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würzler, 1995); *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=\beta=0,05$. ^cInclui manchas simples *flr³* raras. ^dConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Tabela 3: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr³* do cruzamento padrão (CP) após exposição crônica de larvas de 3^o estágio ao co-tratamento do 3-ACQ e 5-ACQ com 4NQO

Tratamento ^a	N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (n ^o de manchas) diag. estatístico ^b				Total de Manchas <i>mwh</i> ^d (n)	
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^c <i>m</i> = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) ^c <i>m</i> = 5	Manchas gêmeas <i>m</i> = 5	Total de Manchas <i>m</i> = 2		
CN	30	0,40 (12)	0,13 (04)	0,00 (00)	0,53 (16)	16	
4NQO 2 mM	30	1,10 (33) +	0,97 (29) +	0,43 (13) +	2,50 (75) +	70	
3-ACQ 4NQO							
(μ M)	(mM)						
200	2	30	0,77 (23) i	0,90 (27) -	0,60 (18) -	2,27 (68) -	66
400	2	30	0,67 (20) +	0,47 (14) +	0,40 (12) -	1,53 (46) +	44
800	2	30	0,60 (18) +	0,90 (27) -	0,40 (12) -	1,90 (57) -	53
5-ACQ 4NQO							
(μ M)	(mM)						
200	2	30	0,93 (28) -	0,47 (14) +	0,30 (09) -	1,70 (51) +	59
400	2	30	0,47 (14) +	0,60 (18) +	0,63 (19) -	1,70 (51) +	49
800	2	30	0,87 (26) -	0,73 (22) -	0,17 (05) -	1,77 (53) +	48

^aCN: controle negativo, etanol 5% + Tween 80 5%. ^bDiagnóstico estatístico: *, positivo; #, negativo quando comparado ao CN através do teste binomial condicional. +, positivo; -, negativo quando comparado ao tratamento com 4NQO através do teste binomial condicional e teste U de Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würigler, 1995); *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=\beta=0,05$. ^cInclui manchas simples *flr³* raras. ^dConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

No protocolo de pós-tratamento, não foram observadas alterações significativas nas frequências de todos os tipos de manchas quando se comparou o pós-tratamento de 3-ACQ ou 5-ACQ com o 4NQO isolado, com exceção das manchas gêmeas na concentração de 400 μ M (Tabela 4).

Esta diferença observada pode estar associada ao tipo de dano genético ou ao mecanismo envolvido na formação dos mesmos. Neste aspecto o 4NQO é um agente mutagênico de ação direta, capaz de formar adutos no DNA nas posições C⁸ ou N² da guanina e N⁶ da adenina. É capaz ainda de produzir danos oxidativos e quebras simples no DNA. Sua ação é semelhante à ação da radiação ultravioleta (UV), o que permite sugerir a existência de etapas comuns nas vias de reparação do DNA a estes dois agentes genotóxicos (MIAO et al., 2006). O principal sistema de reparo de danos no DNA causados pelo 4NQO é o sistema de excisão de nucleotídeos (NER), embora já tenha sido demonstrado o envolvimento de reparo recombinacional (WILLIAMS et al., 2010).

O EMS não induz dano oxidativo uma vez que ele é um alquilante monofuncional capaz de doar um grupo alquila como o CH₃ ou CH₃CH₂ para os grupos amino ou cetona do nucleotídeo (centros nucleofílicos reativos no DNA) formando especificamente O⁶-etilguaninas e N-etilações responsáveis por mutações, por erro de pareamento, do tipo transições A-T, entre outras (WILLIAM et al., 2009). Estas lesões são corrigidas preferencialmente pelos mecanismos de reparo por excisão de bases e de nucleotídeos, além do mecanismo de reparação translesão (BILBAO et al., 2002).

Tendo em vista estas diferenças, principalmente envolvendo o fato de que apenas o 4NQO produz danos no DNA causados por lesões oxidativas, acredita-se que os resultados relacionados à proteção de ambos os ácidos clorogênicos estejam associados à sua ação antioxidante, amplamente descrita na literatura (ASEERVATHAM et al., 2016; GUL et al., 2016).

Tabela 4: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr^r* do cruzamento padrão (CP) após exposição aguda de larvas de 3^o estágio ao tratamento com 4NQO (30 mM) seguido do pós-tratamento com três concentrações de 3-ACQ e 5-ACQ

Tratamento ^a	N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (n° de manchas) diag. estatístico ^b				Total de Manchas <i>mwh</i> ^d (n)	
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^c m = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) ^c m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de Manchas m = 2		
CN	30	0,40 (12)	0,00 (00)	0,03 (01)	0,43 (13)	13	
4NQO 30 mM	14	0,36 (05) #	0,79 (11) *	1,29 (18) *	2,43 (34) *	31	
3-ACQ 4NQO							
(μ M)	(mM)						
200	30	26	0,69 (18) -	1,12 (29) -	0,81 (21) -	2,62 (68) -	60
400	30	21	0,67 (14) -	0,71 (15) -	0,76 (16) -	2,14 (45) -	40
800	30	24	0,54 (13) -	0,75 (18) -	0,58 (14) -	1,88 (45) -	37
5-ACQ 4NQO							
(μ M)	(mM)						
200	30	15	0,07 (01) -	0,67 (10) -	0,60 (09) -	1,33 (20) -	16
400	30	24	0,58 (14) -	0,67 (16) -	0,50 (12) +	1,75 (42) -	39
800	30	28	0,71 (20) -	1,18 (33) -	0,93 (26) -	2,82 (79) -	70

^aCN: controle negativo, etanol 5% + Tween 80 5%. ^bDiagnóstico estatístico: *, positivo; #, negativo quando comparado ao CN através do teste binomial condicional. +, positivo; -, negativo quando comparado ao tratamento com 4NQO através do teste binomial condicional e teste U de Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würgler, 1995); m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=\beta=0,05$. ^cInclui manchas simples *flr³* raras. ^dConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o 5-ACQ e 3-ACQ não tenham sido capazes de modular os efeitos mutagênicos induzidos pelo EMS, mostraram efeito protetor sobre 4NQO no sistema de co-tratamento, possivelmente devido à sua atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. K., GRAF, U. Protection by coffee against somatic genotoxicity in *Drosophila*: role of bioactivation capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, p. 1-14, 1996.
- ANDRADE, H. H. R.; REGULY, M. L.; LEHMANN, M. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). In: HENDERSON, D. S. (Ed.). **Drosophila Cytogenetics Protocols**. Totowa: Human Press Inc., 2004. p. 389-412.
- ASEERVATHAM, G. S. B., et al. Expression pattern of NMDA receptors reveals antiepileptic potential of apigenin 8-C-glucoside and chlorogenic acid in pilocarpine induced epileptic mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p. 54-64, 2016.
- BILBAO, C., et al. Influence of *mus201* and *mus308* mutations of *Drosophila melanogaster* on the genotoxicity of model chemicals in somatic cells *in vivo* measured with the comet assay. **Mutation Research**, v. 503, p. 11-9, 2002.
- FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive result. **Mutation Research**, v. 203, p. 297-308, 1988.
- FREI, H., WÜRGLER, F. E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. **Mutation Research**, v. 334, p. 247-48, 1995.

GEORGE, V. C., et al. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 45, p. 1-14, 2016.

GUL, Z., et al. Protective Effects of Chlorogenic Acid and its Metabolites on Hydrogen Peroxide-Induced Alterations in Rat Brain Slices: A Comparative Study with Resveratrol. **Neurochemistry Research**, v. 41, p. 2075-85, 2016.

KREMR, D., et al. Unremitting problems with chlorogenic acid Nomenclature: A review. **Química Nova**. v.39, p. 530-3, 2016.

MIAO, Z-H, et al. 4-nitroquinoline-1-oxide induces the formation of cellular topoisomerase I-DNA cleavage complexes. **Cancer Research**. v. 66, p. 6540-45, 2006.

MILLS, C. E., et al. The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3335-40, 2013.

WILLIAMS, A. B., et al. Interplay of DNA repair, homologous recombination, and DNA polymerases in resistance to the DNA damaging agent 4-nitroquinoline-1-oxide in *Escherichia coli*. **DNA Repair (Amst)**, v. 9, p. 1090-7, 2010.