



ESTUDO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E ANTIMUTAGÊNICO DA MIRICETINA ATRAVÉS DO TESTE SMART EM *Drosophila melanogaster*

Vanessa de Souza Bizarro¹
Luciano A.A. Barros²
Rafael Rodrigues Dihl³
Mauricio Lehmann³

RESUMO

Os flavonoides e compostos fenólicos são produtos de origem natural do grupo dos metabólitos secundários abundantes no reino vegetal. São representativos na dieta humana sendo obtidos através de alimentos como frutas, legumes, verduras e também no chá de ervas, no vinho e no mel. Têm uma ampla ação biológica envolvendo não apenas o papel nutricional, mas também ação terapêutica, como efeitos antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, cardiovascular e anticancerígeno. Apesar disso, possíveis efeitos adversos como ações pró-oxidantes e genotoxicidade também foram documentados. A miricetina (MIR) é um flavonóide comum na dieta humana sendo encontrado em frutas, chás, legumes, vinho tinto e plantas medicinais. Este composto possui as seguintes atividades biológicas: antioxidante, antialérgico, antiaterogênico, anti-inflamatória e antiangiogênica. Desta forma o presente estudo avaliou a atividade mutagênica e antimutagênica do composto fenólico MIR através do teste SMART em *Drosophila melanogaster*. Os resultados preliminares mostram que a MIR não exerceu atividade mutagênica nas concentrações de 12,5; 25; 50 e 100 mg/L, visto que não apresentou diferenças estatisticamente significativas na frequência de danos genéticos quando comparada ao controle negativo (etanol 5%). Os dados referentes a atividade antimutagênica no protocolo de pós-tratamento mostram que a MIR reduziu a frequência de danos genéticos induzidos pela genotoxina etil-metano-sulfonato (EMS) apenas na concentração de 25 mg/L, não apresentando efeito modulador nas concentrações de 50 e 100 mg/L. Devido ao reduzido número amostral analisado até o presente momento, são necessários estudos adicionais para a completa caracterização do potencial mutagênico e antimutagênico da MIR.

Palavras chave: flavonoides; mutação; recombinação, etil-metano-sulfonato.

INTRODUÇÃO

Desde meados do século 20 tem se verificado uma tendência na indústria farmacêutica: o retorno do interesse por produtos de origem natural. Entre os vários fitoquímicos presentes nestes produtos, os compostos fenólicos têm recebido uma maior atenção devido aos seus consideráveis benefícios biológicos. Evidências baseadas em estudos epidemiológicos e nutricionais demonstraram que os compostos fenólicos desempenham um papel importante na prevenção e tratamento de várias doenças (XIAO et al., 2014).

Os compostos fenólicos têm sido associados com benefícios para a saúde derivados do consumo de elevados níveis de frutas e vegetais. Os efeitos benéficos derivados do consumo de compostos fenólicos têm sido atribuídos à sua atividade antioxidante. A atividade antioxidante de compostos fenólicos depende da estrutura, em particular do número e posições dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos

¹Aluna do Curso de Graduação em Biomedicina – Bolsista PROBIC/FAPERGS – vanessa.sbizarro@gmail.com

²Aluno de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada À Saúde (PPGBioSaúde)– lucianoaab3@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

(BALASUNDRAM et al, 2006). O mecanismo antioxidante pode incluir ações preventivas e/ou de supressão contra espécies reativas de oxigênio (ERO). O estresse oxidativo provocado por ERO é uma das principais causas de lesões celulares em uma variedade de doenças humanas o que justifica a tendência atual de inserção de dietas ricas em compostos fenólicos (KANG et al, 2010).

A miricetina (MIR) é um flavonóide comum na dieta humana sendo encontrado em frutas, chás, legumes, vinho tinto e plantas medicinais. A ingestão diária de MIR na dieta ocidental é estimado na faixa entre 0 e 30 mg com um mediana de 10 mg. Ela é encontrada em abundância nas espécies *Allium cepa*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera*, *Olea europa*, *Morus alba*, *Thea sinesis* e *Crataegus cuneata*. Este composto possui as seguintes atividades biológicas: antioxidante, antialérgico, antiaterogênico, anti-inflamatória e antiangiogênico (LI;E DING, 2012; JAYAKUMAR et al., 2014).

Assim a utilização de flavonóides como novos fármacos disponíveis no mercado deveria redirecionar-se a estudos que comprovem sua utilização eficiente e segura, requerendo para isso novas informações sobre seus possíveis efeitos adversos, biodisponibilidade em diferentes formas de administração, caracterização das propriedades individuais, e, sobretudo as dosagens necessárias desses constituintes, já que esses dados são imprescindíveis para o favorecimento da formulação de novos produtos.

Neste sentido os objetivos do presente estudo foram avaliar a atividade mutagênica da MIR e estudar o potencial antimutagênico deste composto fenólico sobre os danos induzidos pelo etil-metano-sulfonato (EMS) através do teste para detecção de Mutação e Recombinação em células somáticas de *Drosophila melanogaster* (SMART).

METODOLOGIA

A miricetina (3, 3', 4', 5, 5', 7- hexa-hidroxi-flavona; MIR), CAS n° 529-44-2, e o EMS, CAS n° 62-50-0, foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, Mo, EUA). As diferentes soluções foram preparadas, à hora do tratamento, por dissolução em solução aquosa com 3% de etanol.

Neste estudo foi empregado o teste SMART de acordo com o descrito em Andrade; Lehmann e Reguly (2004). Para a análise do potencial genotóxico foram utilizados os cruzamentos padrão e aprimorado, que apresentam níveis normais e aumentados de enzimas de metabolização do tipo citocromo P450, respectivamente.

A atividade mutagênica da MIR foi avaliada a partir da coleta de larvas, resultantes dos cruzamentos de fêmeas das linhagens *flr³* (padrão) ou *ORR;flr³* (aprimorado) com machos *mwh*. Estas larvas foram submetidas ao tratamento crônico em tubos plásticos contendo 1,5 g de meio instantâneo onde foram adicionados 5 mL das soluções de tratamento: controle negativo (solução salina) e quatro diferentes concentrações de MIR (12,5; 25; 50 e 100 mg/L).

Com o objetivo de avaliar a antimutagenicidade do RES foi utilizado o protocolo de co-tratamento, apenas no cruzamento padrão, onde as larvas coletadas dos meios de ovoposição foram submetidas ao tratamento crônico com EMS e MIR combinadas, formando quatro grupos de tratamento: (i) solução aquosa etanol 3%; (ii) EMS 5 mM; (iii) três diferentes concentrações de MIR (25; 50 e 100 mg/L) combinadas com EMS 5 mM.

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 Würigler (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 Würigler, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à toxicidade genética da MIR estão descritos na Tabela 1 e mostram que este composto não exerceu atividade mutagênica em todas as concentrações avaliadas em ambos os cruzamentos. Não foram encontradas diferenças significativas na frequência de todos os tipos de manchas nos tratamentos com MIR quando comparadas ao controle negativo.

Tabela 1: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie trans-heterozigota (*mwh/flr³*) no cruzamento padrão e aprimorado após exposição crônica de larvas de 3º estágio a diferentes concentrações de miricetina (MIR)

Tratamentos	Nº de moscas (N)	Manchas por mosca (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^a				Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5	Manchas gêmeas <i>m</i> = 5	Total de manchas ^b <i>m</i> = 2	
Cruzamento Padrão						
CN ^e	40	1,08 (43)	0,18 (07)	0,05 (02)	1,30 (52)	52
CP ^f	25	7,92 (198) +	0,80 (20) +	0,20 (05) -	8,92 (223) +	221
MIR 12,5 mg/L	40	1,25 (50) -	0,20 (08) -	0,05 (02) -	1,50 (60) -	58
MIR 25 mg/L	40	1,15 (46) -	0,08 (03) -	0,03 (01) -	1,25 (50) -	50
MIR 50 mg/L	40	0,78 (31) -	0,15 (06) -	0,10 (04) -	1,03 (41) -	41
MIR 100 mg/L	40	1,20 (48) -	0,13 (05) -	0,08 (03) -	1,40 (56) -	55
Cruzamento Aprimorado						
CN ^e	40	1,48 (59)	0,18 (07)	0,08 (03)	1,73 (69)	67
CP ^f	20	53,60 (1072) +	6,75 (135) +	2,50 (50) +	62,85 (1257) +	1244
MIR 12,5 mg/L	40	1,10 (44) -	0,05 (02) -	0,08 (03) -	1,23 (49) -	49
MIR 25 mg/L	40	1,68 (67) -	0,13 (05) -	0,03 (01) -	1,83 (73) -	73
MIR 50 mg/L	40	2,15 (86) -	0,30 (12) -	0,08 (03) -	2,53 (101) -	100
MIR 100 mg/L	40	1,38 (55) -	0,23 (09) -	0,10 (04) -	1,70 (68) -	67

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): -, negativo, $p \leq 0.05$. ^bIncluindo manchas simples *flr³* raras. ^cForam considerados apenas os clones *mwh* das manchas simples *mwh* e das manchas gêmeas. ^eCN (controle negativo): solução aquosa com 3% de etanol. ^fCP (controle positivo): uretano 20 mM.

Os dados referentes a atividade antimutagênica no protocolo de co-tratamento mostram que a MIR reduziu a frequência de danos genéticos induzidos pela genotoxina etilmetano-sulfonato (EMS) em todas as concentrações utilizadas (Tabela 2).

Os flavonóides são compostos fenólicos extensamente estudados por suas propriedades antioxidantes e citoprotetoras em vários modelos biológicos. Eles podem proteger contra estresse oxidativo através do sequestro de espécies reativas, quelação do ferro (ABALEA et al., 1999) e inibição de enzimas responsáveis pela geração de radicais livres (EDENHARDER et al., 2003). Entre os diversos compostos flavonoides com ação antioxidante destaca-se a MIR. Há fortes indícios de que MIR pode efetivamente remover uma variedade de ERO e executar sua atividade antioxidante, devido a um grande número de grupos hidroxila alternados. Também foi relatado que MIR pode reduzir significativamente o aumento da produção de radicais livres durante lesão isquêmica e melhorar o declínio do potencial de membrana mitocondrial por privação de oxigênio e glicose. Além disso, vários estudos determinaram o efeito protetor da MIR contra morte celular induzida por ERO. Por exemplo, a pré-incubação com flavonóides tais como MIR, quercetina e rutina revelaram uma

proteção significativa sobre células Caco-2 e HepG2 contra danos ao DNA induzidos por peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (Li e Ding, 2012).

Tabela 2: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr³* do cruzamento padrão após exposição crônica de larvas de 3º estágio ao co-tratamento com EMS e MIR

Tratamentos		Nº de moscas (N)	Manchas por mosca (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^a				Total de manchas m=2	Total de manchas mwh ^c (n)
			Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^b m=2	Manchas simples grandes (>2 céls) ^b m=5	Manchas gêmeas m=5			
MIR (mg/L)	EMS (mM)							
0	0	40	1,08 (43)	0,18 (07)	0,05 (02)	1,30 (52)		
0	5	40	81,60 (3264) *	22,78 (911) *	8,75 (350) *	113,13 (4525) *	4379	
25	5	40	74,68 (2987) +	19,55 (782) +	8,85 (354) -	103,08 (4123) +	4003	
50	5	40	68,35 (2734) +	21,28 (851) -	9,75 (390) -	99,38 (3975) +	3848	
100	5	40	54,53 (2181) +	14,20 (568) +	6,75 (270) +	75,48 (3019) +	2888	

^aDiagnóstico estatístico através do teste binomial condicional e teste U de Wilcoxon, Mann e Whitney: *, positivo quando comparado ao controle negativo; -, negativo; +, positivo, quando comparado ao tratamento com EMS 5 mM; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=\beta=0,05$. ^bInclui manchas simples *flr³* raras. ^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Apesar dos dados da literatura comprovarem o efeito antioxidante da MIR, os resultados obtidos neste estudo mostram que este flavonoide também é capaz de inibir a indução de danos genéticos por outras vias de modulação. O EMS não induz dano oxidativo no DNA, pois 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. Estas lesões são corrigidas preferencialmente pelos mecanismos de reparo por excisão de bases e de nucleotídeos (Branda et al., 1999), além do mecanismo de reparação translesão (Bilbao et al., 2002).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados do presente estudo mostram que a MIR não foi mutagênica e recombinogênica no teste SMART de asa, nas condições experimentais utilizadas, assim como reduziu os danos genéticos induzidos pelo EMS, no protocolo de co-tratamento, indicando que este composto apresenta uma ação protetora mais ampla, do que apenas a via de captação de EROs, como descrito na literatura.

REFERÊNCIAS

- ABALEA, V. et al. Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p.1457-66, 1999.
- ANDRADE, H. H. R., et al. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). In: HENDERSON, D. S. (Ed.). **Drosophila Cytogenetics Protocols**. Totowa: Human Press Inc., 2004. p. 389-412.
- BALASUNDRAM, N., et al. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, p.191-203, 2006.

- 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.
- BRANDA, R. F. et al. The effect of folate deficiency on the hprt mutational spectrum in Chinese hamster ovary cells treated with monofunctional alkylating agents. **Mutation Research**, v. 427, p. 79-87, 1999.
- EDENHARDER, R. et al. Inhibition of clastogenicity of benzo[a]pyrene and of its trans-7,8-dihydrodiol in mice in vivo by fruits, vegetables, and flavonoids. **Mutation Research**, v. 537, p. 169-81, 2003.
- 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.
- JAYAKUMAR, J. K.; NIRMALA, P.; KUMAR, B. A. P. Evaluation of protective effect of myricetin, a bioflavonoid in dimethyl benzanthracene-induced breast cancer in female Wistar rats. **South Asian Journal of Cancer**, v. 3, p.107-11, 2014.
- KANG, K.A. et al. Myricetin protects cells against oxidative stress-induced apoptosis via regulation of PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. **International Journal of Molecular Science**, v.11, p.4348-60, 2010.
- KASTEMBAUM, M. A., BOWMAN, K. O. Tables to determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**, v.9, p. 9, p. 527-49, 1970.
- LI, Y.; DING, Y. Minireview: Therapeutic potential of myricetin in *diabetes mellitus*. **Food Science and Human Wellness**, v.1, p.19-25, 2012.
- XIAO, J.; MUZASHVILI, T. S.; GEORGIEV, M. I. Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids. **Biotechnology Advances**, v. 32, p.1145-56, 2014.