



ESTUDO DO POTENCIAL ANTIMUTAGÊNICO DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICOS 3-ACQ E 5-ACQ SOBRE OS DANOS GENÉTICOS INDUZIDOS POR 4NQO EM

Drosophila melanogaster

Lucía Paola Facciola Gonzalez¹
Idna de Carvalho Barros Taumaturgo²
Mauricio Lehmann³

Resumo

O ácidos clorogênicos integram o grupo dos fenóis antioxidantes e atuam em diversos sistemas biológicos. De acordo com a posição do grupo hidroxila na qual ocorre a esterificação do ácido quínico, estes compostos podem ser denominados de ácido 3-O-cafeoilquínico (3-ACQ), 5-O-cafeoilquínico (5-ACQ), entre outros. 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*, por meio do cruzamento padrão, nos protocolos de co- e pós-tratamento, sobre os danos genéticos induzidos pela 4-nitroquinoleína-1-óxido (4NQO). O 3-ACQ e o 5-ACQ foram capazes de reduzir a incidência de danos genéticos induzidos pela 4NQO no protocolo de co-tratamento e 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, sugerindo que esta proteção pode estar associada à atividade antioxidante descrita na literatura científica. Por outro lado, a proteção observada no pós-tratamento pode estar relacionada à interferência dos ácidos clorogênicos sobre os mecanismos de reparação do DNA envolvidos na correção dos danos induzidos pelo 4NQO. Adicionalmente, foi possível observar que este efeito protetor ocorreu preferencialmente sobre as lesões de origem mutacional se comparadas às induzidas por recombinação somática.

Palavras chave: ácidos clorogênicos; mutação; recombinação somática; antimutagênese.

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 3,4/5-tetrahidroxiclohexanocarboxílico), dos quais, dentre os grupos majoritários encontrados na natureza, estão o éster do ácido cafeico com o ácido quínico (ácido cafeoilquínico – ACQ) isômeros 3-, 4-, e 5- (Kremr et al., 2016).

Estes compostos integram o grupo dos fenóis antioxidantes e atuam em diversos sistemas biológicos, sendo associados a atividades antitumoral, analgésica, antimicrobiana, antioxidante, antiaterosclerose e antidiabetes (Tajik et al., 2017). Este composto fenólico 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).

1 Aluno do curso de graduação em Biologia – Bolsista PIBIC/CNPq – luciapfgonzalez28@gmail.com

2 Aluna de Doutorado do PPGBioSaúde – idnabarros@gmail.com

3 Professor do PPGBioSaúde – mauriciol@ulbra.br

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 pela 4-nitroquinoleína-1-óxido (4NQO) através do teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *D. melanogaster* e avaliar a contribuição da mutação gênica e cromossômica em comparação à recombinação somática no efeito modulador.

METODOLOGIA

Neste estudo foi empregado o teste SMART conforme 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 (4NQO 2 mM); três diferentes concentrações de 3-ACQ e 5-ACQ (200, 400 e 800 µM) combinadas com a genotoxina.

- Pós-tratamento: as larvas coletadas dos meios de ovoposição foram, inicialmente, submetidas ao tratamento agudo por um período de 6 h (4NQO) onde dois grupos de tratamento foram utilizados: (i) água destilada (6h) e (ii) 4NQO 30 mM (6h). 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 análise estatística final dos dados foi utilizado o teste U de Wilcoxon, Mann e Whitney (Frei e Würzler, 1995). A partir do cruzamento padrão são obtidas moscas de dois diferentes genótipos: trans-heterozigotos *mwh + / + flr³* e heterozigotos *mwh + / TM3, Bd^S*. A comparação dos dados obtidos nos dois genótipos permite quantificar os eventos genotóxicos - recombinação somática versus mutação gênica e cromossômica. A atividade recombinogênica e mutagênica foi calculada de acordo com Sinigaglia et al. (2006) conforme segue: Frequência de eventos de origem mutacional (FM) = frequência de manchas nas moscas *mwh/TM3* / frequência de manchas nas moscas *mwh/flr³*. Frequência de eventos de origem recombinacional (FR) = 1- FM. Frequência total de manchas (FT) = n° total de manchas nas moscas *mwh/flr³* (considerando manchas *mwh* e *flr³*) / número de moscas analisadas. Mutação = FT x FM. Recombinação = FT x FR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à investigação da atividade antimutagênica do 3-ACQ e 5-ACQ sobre os danos induzidos pelo mutágeno 4NQO estão descritos nas Tabelas 1 e 2. No protocolo de co-tratamento o 3-ACQ e o 5-ACQ reduziram a frequência total de manchas em todas as concentrações, quando comparado ao tratamento como o 4NQO isolado no genótipo *mwh/flr³*. No genótipo *mwh/TM3* o efeito antimutagênico foi observado em todas as concentrações para o 3-ACQ e apenas na concentração mais baixa (200 µM) para o 5-ACQ (Tabela 1).

No protocolo de pós-tratamento, também foram observadas reduções significativas na frequência total de manchas induzidas pelo 4NQO. O 3-ACQ apresentou atividade antimutagênica na concentração de 800 µM e o 5-ACQ nas concentrações de 200 e 400 µM, em ambos os genótipos (Tabela 2).

Tabela 1: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr³* e *mwh/TM3* do cruzamento padrão (CP) após exposição crônica de larvas de 3º estágio ao cotratamento do 3-ACQ e 5-ACQ com 4NQO.

Tratamento ^a e genótipo	Nº de moscas (N)	Manchas por mosca (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^b					Total de manchas <i>mwh</i> ^e (n)	Frequência de indução de clones (por 10 ⁵ células por divisão celular) (<i>n/NC</i>) ^f	Inibição (%) ^g
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^c <i>m</i> = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) ^c <i>m</i> = 5	Manchas gêmeas ^d <i>m</i> = 5	Total de manchas ^c <i>m</i> = 2	Total de manchas <i>mwh</i> ^e (n)			
3-ACQ 4NQO									
(µM) (mM)									
<i>mwh/flr³</i>									
0	0	60	0,35 (21)	0,13 (08)	0,02 (01)	0,50 (30)	30	1,02	
0	2	60	1,33 (80) *	1,42 (85) *	0,58 (35) *	3,33 (200) *	187	6,39 [5,36]	
200	2	60	0,92 (55) +	1,05 (63) -	0,57 (34) -	2,53 (152) +	143	4,88 [3,86]	28,03
400	2	60	0,87 (52) +	0,77 (46) +	0,50 (30) -	2,13 (128) +	120	4,10 [3,07]	42,68
800	2	60	0,77 (46) +	1,00 (60) +	0,55 (33) -	2,32 (139) +	128	4,37 [3,35]	37,58
<i>mwh/TM3</i>									
0	0	60	0,53 (32)	0,08 (05)		0,62 (37)	37	1,26	
0	2	60	1,40 (84) *	0,30 (18) *		1,70 (102) *	102	3,48 [2,22]	
200	2	60	0,70 (42) +	0,18 (11) -		0,88 (53) +	53	1,81 [0,55]	62,03
400	2	60	0,70 (42) +	0,18 (11) -		0,88 (53) +	53	1,81 [0,55]	62,03
800	2	60	0,70 (42) +	0,20 (12) -		0,90 (54) +	54	1,84 [0,58]	60,76
5-ACQ									
(µM)									
<i>mwh/flr³</i>									
0	0	60	0,35 (21)	0,13 (08)	0,02 (01)	0,50 (30)	30	1,02	
0	2	60	1,33 (80) *	1,42 (85) *	0,58 (35) *	3,33 (200) *	187	6,39 [5,36]	
200	2	60	1,07 (64) -	0,88 (53) +	0,68 (41) -	2,63 (158) +	150	5,12 [4,10]	23,64
400	2	60	0,55 (33) +	0,77 (46) +	0,48 (29) -	1,80 (108) +	99	3,38 [2,36]	56,05
800	2	60	1,07 (64) -	0,83 (50) +	0,32 (19) -	2,22 (133) +	123	4,20 [3,18]	40,78
<i>mwh/TM3</i>									
0	0	60	0,53 (32)	0,08 (05)		0,62 (37)	37	1,26	
0	2	60	1,40 (84) *	0,30 (18) *		1,70 (102) *	102	3,48 [2,22]	
200	2	60	0,85 (51) +	0,08 (05) +		0,93 (56) +	56	1,91 [0,65]	70,77
400	2	60	0,97 (58) -	0,10 (06) -		1,07 (64) -	64	2,19 [0,92]	-
800	2	60	0,87 (52) -	0,17 (10) -		1,03 (62) -	62	2,12 [0,85]	-

^aControle negativo, etanol 5% + Tween 80 5%. ^bDiagnóstico estatístico: *, positivo; quando comparado ao controle negativo 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 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. ^dApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*. ^eConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas. ^fCalculado de acordo com Frei et al. (1992); *C* = 48.000 (aproximadamente o número de células analisadas por mosca); valores entre colchetes representam as frequências de manchas induzidas corrigidas pela incidência espontânea estimada a partir dos controles negativos. ^gCalculado de acordo com Abraham (1994): % de inibição = [(mutágeno sozinho - genotoxina mais 3-ACQ ou 5-ACQ) / genotoxina sozinho] x 100.

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).

Considerando que o 4NQO está diretamente associado à produção de danos no DNA por lesões oxidativas, acredita-se que os resultados relacionados à proteção de ambos os ácidos clorogênicos estejam ligados à sua ação antioxidante, amplamente descrita na literatura (Aseervatham et al., 2016; Gul et al., 2016).

Além de reduzir os danos induzidos pelo 4NQO no protocolo de cotratamento, os ácidos clorogênicos também mostraram efeitos protetores quando administrados após a indução dos danos genéticos, no sistema de pós-tratamento, que permite avaliar a

interferência sobre os mecanismos de reparo envolvidos nas lesões de DNA induzidas pelo agente mutagênico.

Tabela 2: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr³* e *mwh/TM3* do cruzamento padrão (CP) após exposição aguda de larvas de 3º estágio ao tratamento com 4NQO (30 mM) seguido do pós-tratamento com três concentrações de 3-ACQ e 5-ACQ.

Tratamento ^a	Nº de moscas (N)	Manchas por mosca (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^b				Total de manchas <i>mwh</i> ^e (n)	Frequência de clones de clones (por 10 ⁵ células por divisão celular) (n/NC) ^f	Inibição (%) ^g	
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^c m = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) ^c m = 5	Manchas gêmeas ^d m = 5	Total de manchas ^c m = 2				
3-ACQ (µM) 4NQO (mM)									
<i>mwh/flr³</i>									
CN	0	60	0,43 (26)	0,07 (04)	0,02 (01)	0,52 (31)	31	1,06	
CP	30	45	0,98 (44) *	1,02 (46) *	0,76 (34) *	2,76 (124) *	111	5,05 [4,00]	
200	30	60	0,62 (37) -	1,07 (64) -	0,72 (43) -	2,40 (144) -	129	4,41 [3,35]	-
400	30	60	0,78 (47) -	0,87 (52) -	0,62 (37) -	2,27 (136) -	123	4,20 [3,14]	-
800	30	60	0,58 (35) -	0,83 (50) -	0,50 (30) -	1,92 (115) +	106	3,62 [2,56]	35,90
<i>mwh/TM3</i>									
CN	0	43	0,44 (19)	0,00 (00)		0,44 (19)	19	0,91	
CP	30	56	1,36 (76) *	0,41 (23) *		1,77 (99) *	99	3,62 [2,72]	
800	30	60	0,58 (35) +	0,25 (15) -		0,83 (50) +	50	1,71 [0,80]	70,48
5-ACQ (µM)									
<i>mwh/flr³</i>									
CN	0	60	0,43 (26)	0,07 (04)	0,02 (01)	0,52 (31)	31	1,06	
CP	30	45	0,98 (44) *	1,02 (46) *	0,76 (34) *	2,76 (124) *	111	5,05 [4,00]	
200	30	48	0,46 (22) +	0,88 (42) -	0,63 (30) -	1,96 (94) +	83	3,54 [2,48]	37,82
400	30	60	0,58 (35) -	0,95 (57) -	0,43 (26) -	1,97 (118) +	104	3,55 [2,49]	37,61
800	30	60	0,73 (44) -	0,92 (55) -	0,72 (43) -	2,37 (142) -	129	4,41 [3,35]	-
<i>mwh/TM3</i>									
CN	0	43	0,44 (19)	0,00 (00)		0,44 (19)	19	0,90	
CP	30	56	1,36 (76) *	0,41 (23) *		1,77 (99) *	99	3,62 [2,72]	
200	30	58	0,76 (44) +	0,40 (23) -		1,16 (67) +	67	2,37 [1,47]	49,11
400	30	51	0,51 (26) +	0,31 (16) -		0,82 (42) +	42	1,69 [0,79]	71,22

^aCN: controle negativo, etanol 5% + Tween 80 5%. ^bDiagnóstico estatístico: *, positivo, 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 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. ^dApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*. ^eConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas. ^fCalculado de acordo com Frei et al. (1992); C = 48.000 (aproximadamente o número de células analisadas por mosca); valores entre colchetes representam as frequências de manchas induzidas corrigidas pela incidência espontânea estimada a partir dos controles negativos. ^gCalculado de acordo com Abraham (1994): % de inibição = [(mutágeno sozinho - genotoxina mais LIC) / genotoxina sozinha] x 100.

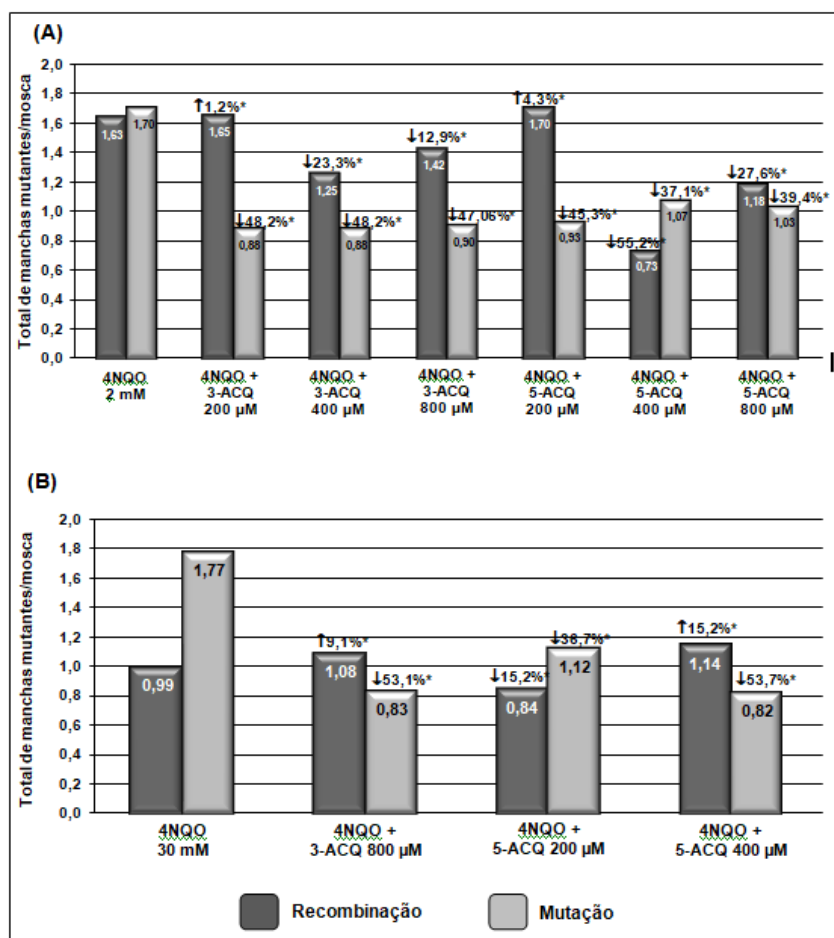
Adicionalmente, com o objetivo de avaliar a contribuição dos eventos genotóxicos associados à recombinação somática, mutação gênica e cromossômica, sobre a ação antimutagênica dos compostos estudados, foi realizada a comparação dos resultados obtidos nos dois genótipos, *mwh/flr³* e *mwh/TM3*. Os resultados obtidos nesta análise estão expressos na Figura 1. De forma geral, houve uma redução mais acentuada dos eventos de origem mutacional, se comparados aos danos causados por recombinação (Figura 1A e 1B) em ambos os protocolos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo apontam para um efeito protetor dos ácidos clorogênicos 3-ACQ e 5-ACQ sobre danos oxidativos induzidos no DNA pela 4NQO, sugerindo que esta proteção pode estar associada à atividade antioxidante descrita na literatura científica. Por outro lado, a proteção observada no pós-tratamento pode estar relacionada à

interferência dos ácidos clorogênicos sobre os mecanismos de reparação do DNA envolvidos na correção dos danos induzidos pela 4NQO.

Figura 1: No interior das colunas estão indicados os números de clones mutantes gerados por recombinação ou mutação, após exposição crônica de larvas de *D. melanogaster* em terceiro estágio ao cotratamento (A) e pós-tratamento (B) de 4NQO, com diferentes concentrações de 3-ACQ e 5-ACQ. *Porcentagem (%) de redução observada quando comparado ao tratamento com 4NQO 2 ou 30 mM.



REFERÊNCIAS

- 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. n. 389-412.
- ASEERVATHAM, G. S. B., et al. Expression pattern of NMDA receptors reveals antiepileptic potential of anigenin 8-C-glucoside and chlorogenic acid in pilocarpine induced epileptic mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p. 54-64, 2016.
- 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, n. 247-48, 1995.
- 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.
- KREMER, 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.
- TAJIK, N., TAJIK, M., MACK, I., ENCK, P. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. **European Journal of Nutrition**, v. 56, p. 2215-44, 2017.
- 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.