



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 González¹, Idna de Carvalho Barros², Mauricio Lehmann^{3,4}

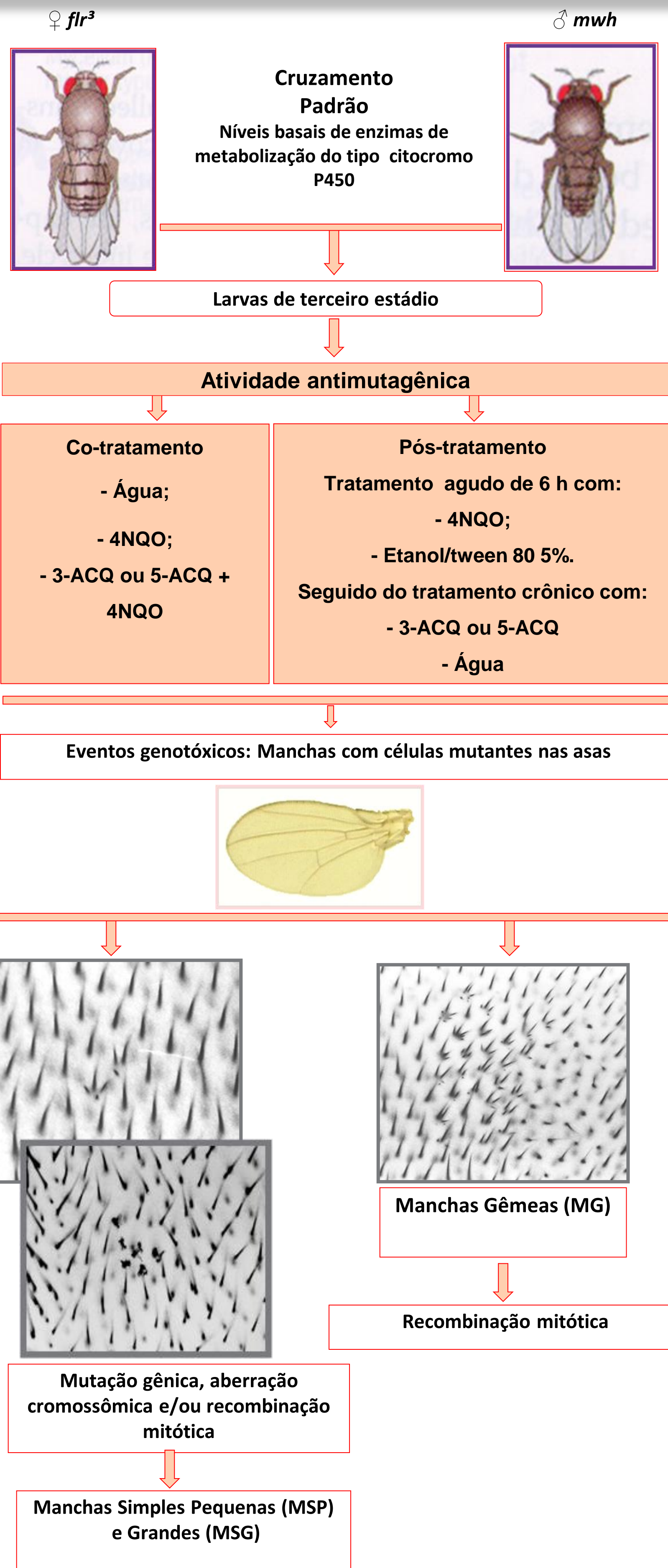
¹Aluna do Curso de Graduação em Ciências Biológicas – Bolsista PIBIC/CNPQ. ²Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada À Saúde (PPGBioSaúde). ³Professores Orientadores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada À Saúde (PPGBioSaúde). ⁴E-mail: mauriciol@ulbra.br

INTRODUÇÃO E OBJETIVO

Ácido clorogênico é a nomenclatura utilizada para identificar o grupo de éteres mais abundantes na dieta humana, que integra o grupo dos fenóis antioxidantes e atua em diversos sistemas biológicos, sendo associado a atividades antitumoral, analgésica, antimicrobiana, antioxidante, antiaterosclerose e anti-diabetes. Este composto fenólico 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).

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-nitroquinolína-1-óxido (4NQO).

METODOLOGIA – TESTE SMART



RESULTADOS

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) (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>	0	60	0,35 (21)	0,13 (08)	0,02 (01)	0,50 (30)	1,02	
	2	60	1,33 (80) *	1,42 (85) *	0,58 (35) *	3,33 (200) *	6,39 [5,36]	
	200	60	0,92 (55) +	1,05 (63) -	0,57 (34) -	2,53 (152) +	4,88 [3,86]	28,03
	400	60	0,87 (52) +	0,77 (46) +	0,50 (30) -	2,13 (128) +	4,10 [3,07]	42,68
	800	60	0,77 (46) +	1,00 (60) +	0,55 (33) -	2,32 (139) +	4,37 [3,35]	37,58
<i>mwh/TM3</i>	0	60	0,53 (32)	0,08 (05)		0,62 (37)	1,26	
	2	60	1,40 (84) *	0,30 (18) *		1,70 (102) *	3,48 [2,22]	
	200	60	0,70 (42) +	0,18 (11) -		0,88 (53) +	1,81 [0,55]	62,03
	400	60	0,70 (42) +	0,18 (11) -		0,88 (53) +	1,81 [0,55]	62,03
	800	60	0,70 (42) +	0,20 (12) -		0,90 (54) +	1,84 [0,58]	60,76
5-ACQ (µM)								
<i>mwh/flr³</i>	0	60	0,35 (21)	0,13 (08)	0,02 (01)	0,50 (30)	1,02	
	2	60	1,33 (80) *	1,42 (85) *	0,58 (35) *	3,33 (200) *	6,39 [5,36]	
	200	60	1,07 (64) -	0,88 (53) +	0,68 (41) -	2,63 (158) +	5,12 [4,10]	23,64
	400	60	0,55 (33) +	0,77 (46) +	0,48 (29) -	1,80 (108) +	3,38 [2,36]	56,05
	800	60	1,07 (64) -	0,83 (50) +	0,32 (19) -	2,22 (133) +	4,20 [3,18]	40,78
<i>mwh/TM3</i>	0	60	0,53 (32)	0,08 (05)		0,62 (37)	1,26	
	2	60	1,40 (84) *	0,30 (18) *		1,70 (102) *	3,48 [2,22]	
	200	60	0,85 (51) +	0,08 (05) +		0,93 (56) +	1,91 [0,65]	70,77
	400	60	0,97 (58) -	0,10 (06) -		1,07 (64) -	2,19 [0,92]	-
	800	60	0,87 (52) -	0,17 (10) -		1,03 (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 Würigler, 1995). ^cm, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância α=0,05. ^dInclui manchas simples *flr³* raras. ^eApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balancerador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*. ^fConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas. ^gCalculado 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. ^hCalculado de acordo com Abraham (1994); % de inibição = [(mutágeno sozinho - genotoxina mais 3-ACQ ou 5-ACQ) / genotoxina sozinho] x 100.

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 indução 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	43	0,43 (26)	0,07 (04)	0,02 (01)	0,52 (31)	1,06	
	CP	45	0,98 (44) *	1,02 (46) *	0,76 (34) *	2,76 (124) *	5,05 [4,00]	
	200	60	0,62 (37) -	1,07 (64) -	0,72 (43) -	2,40 (144) -	4,41 [3,35]	-
	400	60	0,78 (47) -	0,87 (52) -	0,62 (37) -	2,27 (136) -	4,20 [3,14]	-
	800	60	0,58 (35) -	0,83 (50) -	0,50 (30) -	1,92 (115) +	3,62 [2,56]	35,90
<i>mwh/TM3</i>	CN	43	0,44 (19)	0,00 (00)		0,44 (19)	0,91	
	CP	56	1,36 (76) *	0,41 (23) *		1,77 (99) *	3,62 [2,72]	
	800	60	0,58 (35) +	0,25 (15) -		0,83 (50) +	1,71 [0,80]	70,48
5-ACQ (µM)								
<i>mwh/flr³</i>	CN	40	0,43 (26)	0,07 (04)	0,02 (01)	0,52 (31)	1,06	
	CP	60	0,98 (44) *	1,02 (46) *	0,76 (34) *	2,76 (124) *	5,05 [4,00]	
	200	48	0,46 (22) +	0,88 (42) -	0,63 (30) -	1,96 (94) +	3,54 [2,48]	37,82
	400	60	0,58 (35) -	0,95 (57) -	0,43 (26) -	1,97 (118) +	3,55 [2,49]	37,61
	800	60	0,73 (44) -	0,92 (55) -	0,72 (43) -	2,37 (142) -	4,41 [3,35]	-
<i>mwh/TM3</i>	CN	43	0,44 (19)	0,00 (00)		0,44 (19)	0,90	
	CP	56	1,36 (76) *	0,41 (23) *		1,77 (99) *	3,62 [2,72]	
	200	30	0,76 (44) +	0,40 (23) -		1,16 (67) +	2,37 [1,47]	49,11
	400	30	0,51 (26) +	0,31 (16) -		0,82 (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 Würigler, 1995). ^cm, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância α=0,05. ^dInclui manchas simples *flr³* raras. ^eApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balancerador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*. ^fConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas. ^gCalculado 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. ^hCalculado de acordo com Abraham (1994); % de inibição = [(mutágeno sozinho - genotoxina mais LIC) / genotoxina sozinho].

DISCUSSÃO

O 3-ACQ e o 5-ACQ foram capazes de reduzir a incidência de danos genéticos induzidos pela 4NQO nos protocolos de co-tratamento e pós-tratamento (Tabelas 1 e 2). 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 pela 4NQO. 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.

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.

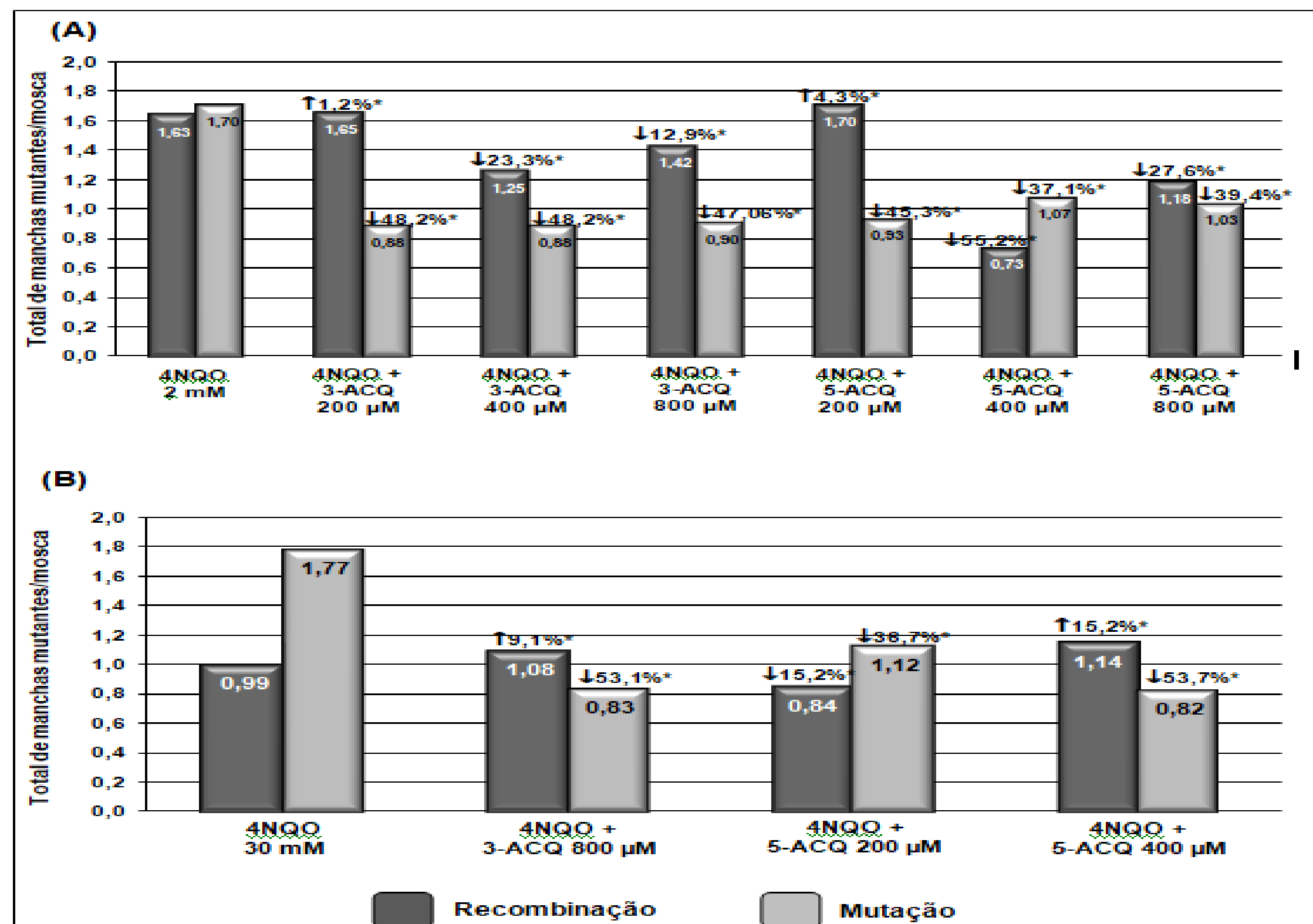


Figura 1: No interior das colunas estão indicados os números de clones mutantes gerados por recombinação ou mutação, após exposição crônica de larvas de *D. melanogaster* em terceiro estágio ao cotratamento (A) e pós-tratamento (B) de 4NQO, com diferentes concentrações de 3-ACQ e 5-ACQ. *Porcentagem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