



ESTUDO DO POTENCIAL MODULADOR DO RESVERATROL SOBRE OS DANOS GENÉTICOS INDUZIDOS PELO ETILMETANOSULFONATO E MITOMICINA C

Mariana do Amaral Flores¹
Magnólia de Jesus Sousa Magalhães²
Rafael Rodrigues Dihl³
Mauricio Lehmann⁴

RESUMO

Estudos científicos mostram que o consumo do resveratrol (RES) e/ou de alimentos que o contém está associado com melhorias nas condições de saúde, relacionados com uma ampla variedade de atividades biológicas. Entretanto, os estudos que envolvem a sua atividade antimutagênica vêm apresentando resultados conflitantes. Desta forma, o presente estudo avaliou a antimutagenicidade deste composto sobre os danos genéticos induzidos pelos mutágenos etilmetanosulfonato (EMS) e mitomicina C (MMC), através do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. Para tanto, foram utilizados os protocolos de co-tratamento e pós-tratamento. Os resultados obtidos mostram que: (i) no co-tratamento, o RES foi capaz de reduzir os efeitos tóxico-genéticos induzidos pelo EMS em todas as concentrações avaliadas, ao mesmo tempo em que aumentou a frequência de danos genéticos induzidos pela MMC nas concentrações de 0,04 e 0,15 mM, e (ii) no pós-tratamento o RES reduziu a frequência de manchas mutantes induzidas pelo EMS apenas na concentração de 0,01 e 0,04 mM não alterou as frequências de danos genéticos induzidos pela MMC. Os resultados obtidos até o presente momento com o teste SMART, indicam que o RES é capaz de atuar como um agente desmutagênico, possivelmente através da sua capacidade antioxidante, impedindo a indução de danos genéticos, ao mesmo tempo em que atua como um agente bioantimutagênico, possivelmente por interferir nos mecanismos de reparação que atuam sobre os danos induzidos pelo EMS. Por outro lado, também age como um agente comutagênico em relação à MMC, podendo estar relacionado à ação pró-oxidante.

Palavras-chave: antimutagenicidade; *Drosophila melanogaster*; recombinação; teste SMART.

INTRODUÇÃO

O resveratrol (RES) ganhou destaque na literatura científica nos últimos anos, com resultados referentes à sua atividade biológica. Este composto fenólico é encontrado em pelo menos 72 espécies de plantas, especialmente em *Polygonum cuspidatum*. As fontes primárias do RES na dieta humana são o amendoim, manteiga de amendoim, uvas e vinho (DE NISCO et al., 2013). As pesquisas relacionadas aos efeitos benéficos do vinho na saúde confirmam que o vinho tinto utilizado como suplemento à dieta aumenta a atividade antioxidante, reduz os danos oxidativos e aumenta a agregação plaquetária. A partir destes estudos afirma-se que o consumo moderado de vinho reduz os riscos de doenças cardiovasculares (DEL RIO et al., 2013).

Uma série de estudos científicos mostra que o consumo do RES monomérico e/ou de alimentos contendo o RES está associado com melhorias nas condições de saúde. Estes benefícios estão relacionados com uma ampla variedade de atividades biológicas tais como, capacidade antioxidante, antidiabética, neuroprotetora, cardioprotetora, atividade anticarcinogênica e antimutagênica, efeitos antiinflamatórios, propriedade estrogênica e

¹Aluna do Curso de Graduação em Biologia – Bolsista PIBIT/CNPq

²Aluna de Doutorado do PPGBIOSAUDE

³Professor do Curso de Graduação de Biologia e PPGBIOSAUDE

⁴Professor do Curso de Graduação de Engenharia Ambiental e PPGBIOSAUDE – mauriciol@ulbra.br

antiestrogênica e modulação nas vias de transdução de sinais celulares (TURKEZ E AYDIN, 2013; SAK, 2014).

OBJETIVO

As atividades mutagênicas e antimutagênica deste composto vêm apresentando resultados conflitantes na literatura e com o objetivo de ampliar os dados científicos sobre o efeito modulador do RES, este estudo avaliou a atividade antimutagênica deste composto sobre os danos induzidos pelo etilmetanossulfonato (EMS) e mitomicina C (MMC) utilizando o protocolo de co- e pós-tratamento com cruzamento padrão, através do teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *D. melanogaster*.

METODOLOGIA

O teste SMART foi empregado de acordo com o descrito em Andrade; Lehmann e Reguly (2004). Foi utilizado o cruzamento padrão, com fêmeas de *D. melanogaster* da linhagem *flr*³ e machos da linhagem *mwh*. Com o objetivo de avaliar a antimutagenicidade do RES foram utilizados dois protocolos de tratamento:

- Co-tratamento, onde as larvas coletadas do meio de ovoposição foram submetidas ao tratamento crônico no qual quatro grupos de tratamento foram utilizados: controle negativo (solução aquosa de etanol a 5%); controle positivo (EMS 5mM MMC 0,05mM); três diferentes concentrações de RES (0,01; 0,04 e 0,15 mM) 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 (MMC) onde quatro grupos de tratamento foram utilizados: (i) água destilada 6 h; (ii) água destilada 3h; (iii) EMS 46mM (3 h); (iv) MMC 0,12 mM (6 h). Posteriormente, estas larvas foram lavadas com água e pós-tratadas com: (i) solução aquosa etanol 5%; (ii) três diferentes concentrações de RES (0,01; 0,04 e 0,15 mM).

A partir desta metodologia é possível estudar a atividade antimutagênica de um composto químico e associá-la com eventos genotóxicos originados por mutação gênica e cromossômica, assim como recombinação somática.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados observados a partir da análise do genótipo transheterozigoto (*mwh/flr*³) mostram que o sistema de co-tratamento o RES foi capaz de reduzir, de forma fraco-positiva, os efeitos tóxico-genéticos induzidos pelo EMS em todas as concentrações avaliadas. Por outro lado, quando associado à MMC houve um aumento na frequência de danos nas concentrações de 0,04 mM e 0,15 mM.

No protocolo de pós-tratamento o RES reduziu de forma fraco-positiva a frequência total de manchas mutantes nas concentrações de 0,01mM e 0,04 mM, porém não alterou a frequência total de manchas induzidas pela MMC (Tabela 2).

O somatório dos resultados encontrados mostra que o RES quando administrado concomitantemente ao EMS e após a indução de danos gerados por este mutágeno atua como um agente antimutagênico ao mesmo tempo em que exerce atividade comutagênica na presença da MMC apenas quando administrado em conjunto com o mesmo.

Estes resultados corroboram informações prévias descritas na literatura científica relatando que o RES exerce atividade protetora sobre o DNA ao mesmo tempo em que também induz lesões nesta molécula (GATZ; WIESMÜLLER, 2008). Através de sua capacidade de sequestrar radicais livres, o RES diminuiu as lesões oxidativas no DNA *in vitro* (CADENAS; BARJA, 1999; QUINCOZES-SANTOS et al., 2010; BISHT et al., 2010; SIDDIQUI et al., 2010). O RES foi capaz de proteger a linhagem celular não tumoral MCF10 de epitélio mamário humano dos danos induzidos no DNA por hidrocarboneto aromático

policíclico. Este efeito protetor foi associado à supressão das enzimas citocromo P450 (CYP) 1A1 e CYP1B1, ambas de fase I (LEUNG et al., 2009). Turkez e Aydin (2013) observaram que o RES não induziu aberrações cromossômicas e trocas entre cromátides irmãs (TCIs) *in vitro* em linfócitos humanos ao mesmo tempo em que reduziu a incidência destes mesmos parâmetros induzidos pelo inseticida permetrina. Mitrut et al. (2009) descrevem o RES como indutor de micronúcleos em células primárias de adenocarcinoma hepático humano.

Tabela 1: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr³* do cruzamento padrão após exposição crônica de larvas de 3º estágio ao co-tratamento do RES com EMS e MMC

Tratamentos (mM)	N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. 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 <i>m</i> = 2	
Controle negativo	60	0,70 (42)	0,12 (07)	0,00 (00)	0,82 (49)	49
EMS 5	60	32,08 (1925) *	14,03 (842) *	7,58 (455) *	53,70 (3222) *	2980
EMS 5+RES 0,01	60	26,92 (1615) f+	10,68 (641) f+	6,47 (388) f+	44,07 (2644) f+	2466
EMS 5+RES 0,04	60	27,13 (1628) f+	10,87 (652) f+	5,78 (347) f+	43,78 (2627) f+	2423
EMS 5+RES 0,15	60	27,40 (1644) f+	12,77 (766) f+	6,55 (393) f+	46,72 (2803) f+	2490
MMC 0,05	60	30,05 (1803) *	24,22 (1453) *	11,53 (692) *	65,86 (3948) *	3724
MMC 0,05+RES 0,01	60	28,18 (1691) f+	23,17 (1390) -	12,63 (758) f+	63,98 (3839) -	3653
MMC 0,05+RES 0,04	60	35,35 (2121) f+	28,17 (1690) f+	11,23 (674) -	74,75 (4485) f+	4074
MMC 0,05+RES 0,15	60	36,90 (2214) f+	27,42 (1645) f+	11,18 (671) -	75,50 (4530) f+	4266

^aDiagnóstico estatístico através do teste binomial condicional: *, positivo quando comparado ao controle negativo; -, negativo; f+, fraco-positivo, quando comparado ao tratamento com EMS 5mM ou MMC 0,05 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.

Através do teste de micronúcleos *in vivo*, Bartá et al. (2006) verificaram que o RES reduziu a atividade clastogênica da aflatoxina (AFB1), do 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina (IQ) e do N-nitroso-N-metiluréia (MNU). Por outro lado, neste mesmo estudo o RES não interferiu na frequência de mutações induzidas pelo MNU no teste de Ames.

Matsuoka et al. (2008) verificaram que este composto não foi capaz de reduzir o número de micronúcleos induzidos pelo bromato de potássio, e não interferiu sobre TCIs induzidas pela mitomicina C (MMC) em linfócitos do sangue periférico humano. Além disso, apresentou alta atividade citostática na concentração de 100 μ M, tanto isoladamente, quanto em combinação com a MMC (STAGOS et al., 2007). No entanto, induziu TCI em cultura de células pulmonares (CHL) de hamster Chinês (MATSUOKA et al., 2001). Neste mesmo estudo, este polifenol mostrou-se positivo no teste de micronúcleos, embora não tenha causado nenhuma anormalidade no número de cromossomos. Ao estudarem o efeito do RES sobre a mutagenicidade induzida pela bleomicina e H₂O₂ através do teste de Ames na linhagem TA102 de *Salmonella typhimurium*, Stagoset al. (2006) observaram que este composto aumentou o número de colônias revertentes induzidas por estas genotoxinas, enquanto não apresentou efeito mutagênico quando administrado isoladamente. Por outro lado, o RES reduziu os efeitos carcinogênicos de vários compostos através da inibição da enzima CYP1A1 (Chunet al., 1999).

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 EMS ou MMC, seguida do pós-tratamento com RES

Tratamentos		N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas ^m wh ^c (n)
EMS (mM)	RES (mM)		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^b m = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) ^b m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de manchas m = 2	
0	0	60	0,70(42)	0,13(08)	0,03 (02)	0,87 (52)	33
46	0	60	3,42(205) *	4,22(253) *	2,00 (120) *	9,63 (578) *	448
46	0,01	60	2,83(170) f+	3,75(225) -	1,98 (119) -	8,57 (514) f+	369
46	0,04	60	2,48(149) f+	3,77(226) -	2,07 (124) -	8,32 (499) f+	349
46	0,15	60	2,95(177) -	4,03(242) -	1,87 (112) -	8,85 (531) -	383
MMC (mM)	RES (mM)						
0	0	60	0,72(43)	0,13(08)	0,05 (03)	0,90 (54)	46
0,12	0	60	2,02(121) *	9,82(589) *	3,43 (206) *	15,27 (916) *	668
0,12	0,01	60	1,55(93) f+	9,97(598) -	3,72 (223) -	15,23 (914) -	691
0,12	0,04	60	1,88(113) -	11,20(672) f+	2,93 (176) -	16,02 (961) -	717
0,12	0,15	60	1,68(101) -	9,98(599) -	3,45 (207) -	15,12 (907) -	714

^aDiagnóstico estatístico através do teste binomial condicional: *, positivo quando comparado ao controle negativo; -, negativo ou f+, fraco-positivo, quando comparado ao tratamento com EMS 46 mM ou MMC 0,12 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.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com o teste SMART indicam que o RES é capaz de atuar como um agente desmutagênico, possivelmente através da sua capacidade antioxidante, impedindo a indução de danos genéticos, ao mesmo tempo em que atua como um agente bioantimutagênico, potencializando os mecanismos de reparação que atuam sobre os danos induzidos pelo EMS. Por outro lado, é capaz de potencializar os efeitos genotóxicos da MMC quando co-administrada a esta genotoxina. Este efeito pode ser explicado por uma possível interferência sobre as enzimas de ativação metabólica envolvidas na bioativação ou detoxificação da MMC ou ainda, através de um possível efeito pró-oxidante, já descrito na literatura.

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., p. 389-412, 2004.

BARTÁ, I. et al. Current trends and perspectives in nutrition and cancer prevention. **Neoplasma**, v. 53, p. 19-25, 2006.

BISHT, K.; WAGNER, K. H.; BULMER, A. C. Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds. **Toxicology**, v. 278, p. 88-100, 2010.

CADENAS S, BARJA G. Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO₃. **Free Radical Biology and Medicine.**, v. 26, p. 1531-1537, 1999.

CHUN, Y. J.; KIM, M. Y.; GUENGERICH, F. P. Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 262, p. 20-24, 1999.

DEL RIO, D., et al. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, p. 1818-92, 2013.

DE NISCO, M., et al. Nutraceutical properties and polyphenolic profile of berry skin and wine of *Vitisvinifera* L. (cv. Aglianico). **Food Chemistry**, v. 140, p. 623-9, 2013.

GATZ, S. A.; WIESMÜLLER, L. Take a break—resveratrol in action on DNA. **Carcinogenesis**, v. 29, p. 321-332, 2008.

LEUNG, H. Y. et al. The red wine polyphenol resveratrol reduces polycyclic aromatic hydrocarbon-induced DNA damage in MCF-10A cells. **The British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 1462-1468, 2009.

MATSUOKA, A. et al. A pilot study of evaluation of the antioxidative activity of resveratrol and its analogue in a 6-month feeding test in young adult mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1125-1130, 2008.

MATSUOKA, A. et al. Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line. **Mutation Research**, v. 494, p. 107-113, 2001.

MITRUT, P. et al. The genotoxicity study of resveratrol in primary gastric adenocarcinoma cell cultures. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 50, 429-433, 2009.

QUINCOZES-SANTOS, A. et al. Actions of redox-active compound resveratrol under hydrogen peroxide insult in C6 astroglial cells. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 916-920, 2010.

SAK, K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. **Pharmacognosy Reviews**, v. 8, p. 122, 2014.

SIDDIQUI, M. A., et al. Protective potential of trans-resveratrol against 4-hydroxynonenal induced damage in PC12 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 1592-1598, 2010.

STAGOS, D. et al. Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitisvinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5246-5252, 2007.

STAGOS, D. et al. Activity of grape extracts from Greek varieties of *Vitisvinifera* against mutagenicity induced by bleomycin and hydrogen peroxide in *Salmonella typhimurium* strain TA102. **Mutation Research**, v. 609, p. 165-175, 2006.

TURKEZ, H.; AYDIN, E. The genoprotective activity of resveratrol on permethrin- induced genotoxic damage in cultured human lymphocytes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 405-11, 2013.