



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA DA
MIRICETINA E MIRICITRINA EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila*
*melanogaster***

Renata Schütts Lemos¹
Luciano André Assunção Barros²
Maurício Lehmann³

Resumo

Miricetina (MIR) e myricitrin (MTR) são flavonóides comuns na dieta humana, sendo encontrados em plantas e consumidos em vegetais, frutas e bebidas, como chá e vinho. Apresentam efeitos biológicos benéficos á saúde, exibindo propriedades anti-carcinogênicas, anti-inflamatórias, antiateroscleróticas, antitrombóticas, antidiabéticas e antivirais. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade mutagênica da MIR e da MTR e estudar o potencial antimutagênico destes compostos fenólicos sobre os danos genéticos induzidos pelo etil-metanossulfonato (EMS). Para tanto foi utilizado o teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. As concentrações testadas para ambos os compostos foram: 12,5; 25; 50 e 100 mg/ml. Na análise do potencial antimutagênico, os protocolos de co e pós-tratamento e as concentrações de 25; 50 e 100 mg/ml de MIR e MTR foram utilizadas. Resultados preliminares mostram que estes compostos não exerceram atividade mutagênica em todas as concentrações avaliadas nos dois cruzamentos. Dados sobre a atividade antimutagênica no protocolo de co-tratamento mostram que a MIR reduziu a frequência de danos genéticos induzidos pelo EMS apenas na concentração de 100 mg/mL, enquanto a MTR apresentou esse efeito modulador nas concentrações de 50 e 100 mg/mL. Por outro lado, no protocolo pós-tratamento, MIR e MTR não foram capazes de alterar significativamente a frequência de danos induzidos pelo EMS. Os dados do presente estudo mostram que MIR e MTR possuem efeito protetor mais amplo que a atividade antioxidante já descrita na literatura, uma vez que o EMS não é capaz de induzir dano oxidativo no DNA.

Palavras chave: fenólicos; miricitrina; miricetina; mutagênese; antimutagênese.

INTRODUÇÃO

Flavonóides e compostos fenólicos são produtos de origem natural do grupo dos metabólitos secundários abundantes no reino vegetal. Os flavonóides podem ser considerados pigmentos naturais, desempenhando um papel fundamental na proteção do vegetal, atuando na proteção contra agentes oxidantes (raios ultravioletas, substâncias químicas presentes nos alimentos, poluição). 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 (CHEYNIER et al., 2015).

1 Aluno do curso de graduação em Biomedicina – Bolsista PROBIC/FAPERGS – renataschutts@hotmail.com

2 Aluno de Doutorado do PPGBioSaúde – lucianoaab3@gmail.com

3 Professor do PPGBioSaúde – mauriciol@ulbra.br

A miricetina (MIR) é um flavonóide de ocorrência natural encontrado em uvas, bagas, frutas, vegetais, ervas, assim como em outras plantas. A miricitrina (MTR), um flavonóide extraído da fruta, folhas e casca de bayberry chinês (*Myrica rubra* SIEBOLD), é usado atualmente como um flavorizante em lanches, produtos lácteos e bebidas no Japão (NAN et al., 2014). Alguns estudos demonstram que estes compostos fenólicos possuem atividade antioxidante, antifúngica, antiviral e anticâncer (HOBBS et al., 2015), entretanto, há poucos relatos acerca do potencial mutagênico e antimutagênico destas substâncias.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade mutagênica da MIR e da MTR e estudar o potencial antimutagênico destes compostos fenólicos sobre os danos genéticos induzidos pelo etil-metanossulfonato (EMS). Para tanto foi utilizado o teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*.

METODOLOGIA

Neste estudo foi empregado o teste SMART conforme descrito em Andrade; Lehmann e Reguly (2004). Para a avaliação da atividade mutagênica foram utilizados o cruzamento padrão, que apresenta a expressão normal das enzimas de metabolização do tipo citocromo P450 (CYP450) e o cruzamento aprimorado, com moscas portadoras de níveis aumentados de CYP450. Com o objetivo de avaliar a antimutagenicidade dos ácidos clorogênicos foram utilizados dois protocolos de tratamento apenas no cruzamento padrão:

- 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 (etanol 3%); controle positivo (EMS 5 mM); três diferentes concentrações de MIR e MTR (25, 50 e 100 mg/L) combinadas com a genotoxina.

- Pós-tratamento: as larvas coletadas dos meios de ovoposição foram, inicialmente, submetidas ao tratamento agudo por um período de 3 h onde dois grupos de tratamento foram utilizados: (i) água destilada (3h) e (ii) EMS 46 mM (6h). Posteriormente, estas larvas foram lavadas com água e pós-tratadas com: (i) etanol 3%; (ii) três diferentes concentrações de MIR e MTR (25, 50 e 100 mg/L).

Para a análise estatística final dos dados foi utilizado o teste U de Wilcoxon, Mann e Whitney (FREI; WÜRGLER, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes a atividade mutagênica demonstram que a MIR e MTR não apresentam atividade mutagênica nas concentrações de 12,5 a 100 mg/L tanto no cruzamento padrão quanto no aprimorado (Tabela 1).

A avaliação da genotoxicidade da MTR, e da MIR, foi realizado por Hobbs et al. (2015) utilizando teste de Ames, ensaio de micronúcleo e teste cometa em camundongos B6C3F1. No ensaio bacteriano de mutação reversa (teste de Ames), a MIR induziu mutações por deslocamento do quadro de leitura e substituição de pares de bases em condições de ativação metabólica enquanto MTR apresentou resultados negativos para potencial mutagênico. Ambos induziram a formação de micronúcleos em células linfoblásticas humanas TK6 em condições de inativação metabólica. No entanto, a resposta negativa observada na presença de ativação metabólica sugere que a fração S9 de rato pode desintoxicar metabólitos reativos desses produtos químicos em células de mamífero. Com o uso combinado do teste cometa e de micronúcleo, não se observou indução de micronúcleos no sangue periférico nem foram verificadas provas conclusivas de danos no fígado, estômago glandular ou duodeno após a exposição a MTR ou MIR. Tais resultados não revelaram evidências de potencial genotóxico da MTR *in vivo*, apoiando a sua utilização segura em alimentos e bebidas.

Tabela 1: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr³* do cruzamento padrão (CP) após exposição crônica de larvas de 3º estágio a diferentes concentrações de MIR e MTR

Tratamentos ^a	Nº de moscas (N)	Manchas por mosca (número de manchas) diagnóstico 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 ^c <i>m</i> = 2	
Cruzamento padrão						
CN	40	1,08 (43)	0,18 (07)	0,05 (02)	1,30 (52)	52
CP	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
CN	30	0,77 (23)	0,10 (03)	0,07 (02)	0,93 (28)	28
CP	20	3,30 (66) +	0,50 (10) +	0,10 (02) -	3,90 (78) +	78
MTR 12,5 mg/L	30	0,73 (22) -	0,10 (03) -	0,07 (02) -	0,90 (27) -	27
MTR 25mg/L	30	0,67 (20) -	0,03 (01) -	0,00 (00) -	0,70 (21) -	21
MTR 50 mg/L	30	0,70 (21) -	0,13 (04) -	0,00 (00) -	0,83 (25) -	25
MTR 100 mg/L	30	0,87 (26) -	0,13 (04) -	0,03 (01) -	1,03 (31) -	30
Cruzamento aprimorado						
CN	40	1,48 (59)	0,18 (07)	0,08 (03)	1,73 (69)	67
CP	20	53,60 (1072) +	6,75 (135) +	2,50 (50) +	62,85 (125) +	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
CN	30	1,00 (30)	0,13 (04)	0,07 (02)	1,20 (36)	36
CP	20	25,10 (50) +	7,25 (145) +	2,65 (53) +	35,00 (700) +	691
MTR 12,5 mg/L	30	0,87 (26) -	0,03 (01) -	0,07 (02) -	0,97 (29) -	29
MTR 25mg/L	30	1,10 (33) -	0,17 (05) -	0,03 (01) -	1,30 (39) -	39
MTR 50 mg/L	30	0,67 (20) -	0,27 (08) -	0,00 (00) -	0,93 (28) -	26
MTR 100 mg/L	30	0,70 (21) -	0,07 (02) -	0,03 (01) -	0,80 (24) -	24

^aCN: controle negativo, etanol 3%; CP: uretano 20 mM. ^bDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; quando comparado ao CN. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^cIncluindo manchas simples *flr³* raras. ^dConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Os dados referentes à atividade antimutagênica no protocolo de cotratamento mostram que a MIR reduziu a frequência de danos genéticos induzidos pelo EMS apenas na concentração de 100 mg/mL enquanto a MTR apresentou efeito antimutagênico nas concentrações de 50 e 100 mg/L. Por outro lado, no protocolo de pós-tratamento ambos compostos fenólicos não foram capazes de alterar significativamente a frequência de danos induzidos pelo EMS (Tabela 2).

O EMS é uma agente alquilante monofuncional capaz de doar grupo alquila como o CH₃ ou CH₃CH₂ para os grupos amino ou cetona do nucleotídeo (centros nucleofílicos reativos no DNA) formando adutos nos átomos de N e O, especificamente O-6-etilguaninas e N-etilações (KONDO et al., 2010). Desta forma, os efeitos moduladores exercidos pela MIR

e MTR sobre os danos induzidos pelo EMS, apenas no protocolo de cotratamento, evidenciam uma possível ação sobre os mecanismos que conduzem à alquilação do DNA e a formação de O6-etilguanina e ausência de interferência sobre os mecanismos de reparação do DNA associados à correção dos danos genéticos induzidos por este mutágeno.

Tabela 2: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr³* do cruzamento padrão (CP) após exposição crônica de larvas de 3º estágio ao cotratamento da MIR e MTR com EMS e após exposição aguda de larvas de 3º estágio ao tratamento com EMS seguido do pós-tratamento com MIR e MTR

Tratamentos	Nº de moscas (N)	Manchas por mosca (número de manchas) diagnóstico estatístico ^a				Total de manchas <i>mwh</i> ^c (n)
		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	
Cotratamento						
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) *
25	5	40	74,68 (2987) -	19,55 (782) +	8,85 (354) -	103,08 (4123) -
50	5	40	68,35 (2734) -	21,28 (851) -	9,75 (390) -	99,38 (3975) -
100	5	40	54,53 (2181) +	14,20 (568) +	6,75 (270) +	75,48 (3019) +
MTR (mg/L)	EMS (mM)					
0	0	30	0,77 (23)	0,10 (03)	0,07 (02)	0,93 (28)
0	5	20	30,50 (610) *	12,30 (246)	5,45 (109) *	48,25 (965) *
25	5	20	28,75 (575) -	11,15 (223)	5,00 (100) -	44,90 (898) -
50	5	20	26,00 (520) +	11,50 (230)	4,20 (84) +	41,70 (834) +
100	5	20	28,00 (560) -	10,70 (214)	4,20 (84) +	42,90 (858) +
Pós-tratamento						
EMS (mM)	MIR (mg/L)					
0	0	20	0,55 (11)	0,05 (01)	0,00 (00)	0,60 (12)
46	0	20	9,90 (198) *	12,30 (246) *	7,45 (149) *	29,65 (593) *
46	25	20	7,60 (152) -	9,90 (198) -	7,90 (158) -	25,40 (580) -
46	50	20	10,60 (212) -	11,10 (222) -	7,45 (149) -	29,15 (583) -
46	100	30	9,70 (291) -	11,73 (352) -	7,03 (211) -	28,47 (854) -
EMS (mM)	MTR (mg/L)					
0	0	30	0,43 (13)	0,13 (04)	0,10 (03)	0,67 (20)
46	0	30	4,67 (140) *	6,43 (193) *	4,37 (131) *	15,47 (464) *
46	25	30	4,17 (125) -	5,83 (175) -	4,20 (126) -	14,20 (426) -
46	50	30	4,37 (131) -	5,90 (177) -	4,87 (146) -	15,13 (454) -
46	100	30	4,63 (139) -	7,17 (215) -	4,13 (124) -	15,93 (478) -

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): *, positivo, quando comparado ao controle negativo. +, positivo; -, negativo; quando comparado ao EMS 5mM ou 46 mM. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^bIncluindo manchas simples *flr³* raras. ^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados do presente estudo mostram que a MIR e a MTR não foram mutagênicas e recombinogênicas no teste SMART de asa, nas condições experimentais utilizadas, assim como reduziram os danos genéticos induzidos pelo EMS, no protocolo de cotratamento, indicando que este composto apresenta uma ação protetora mais ampla, do que apenas a atividade antioxidante, já descrita na literatura (JAYAKUMAR et al., 2014), visto que o EMS não é capaz de induzir danos oxidativos no DNA.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, H.H.R.; REGULY, M.L.; LEHMANN, M. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). In: Henderson DS (ed). **Drosophila Cytogenetics Protocols**. Totowa: Human Press Inc., 2004. p. 389-412.
- CHEYNIER, V.; TOMAS-BARBERAN, F.A.; YOSHIDA, K. Polyphenols: From plants to a variety of food and nonfood uses. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 63, p. 7589-94, 2015.
- 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. 247-58, 1995.
- HOBBS, C.A.; SWARTZ, C.; MARONPOT, R.; et al. Genotoxicity evaluation of the flavonoid, myricitrin, and its aglycone, myricetin. *Food and Chemical Toxicology*, v. 83, p. 283-92, 2015.
- JAYAKUMAR, J.K.; NIRMALA, P.; KUMAR, B.A.P. Evaluation of protective effect of myricetin, a bioflavonoid in dimethyl benzantracene- induced breast cancer in female Wistar rats. **South Asian Journal of Cancer**. v. 3, p. 107-11, 2014.
- KONDO, N.; TAKAHASHI, A.; ONO, K.; OHNISHI, T. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. **Journal of Nucleic Acids**. ID 543531, 2010.
- NAN, H.J.; MA, H.J.; ZHANG, R.T.; et al. Physiochemical properties of the complex of myricetin and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. v. 13, p. 1791-6, 2014.