

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMUTAGÊNICO DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICOS 3-ACQ E 5-ACQ ATRAVÉS DO TESTE SMART EM *Drosophila melanogaster*

Lucía Paola Facciola González¹, Idna de Carvalho Barros², Rafael Rodrigues Dihl³, 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).

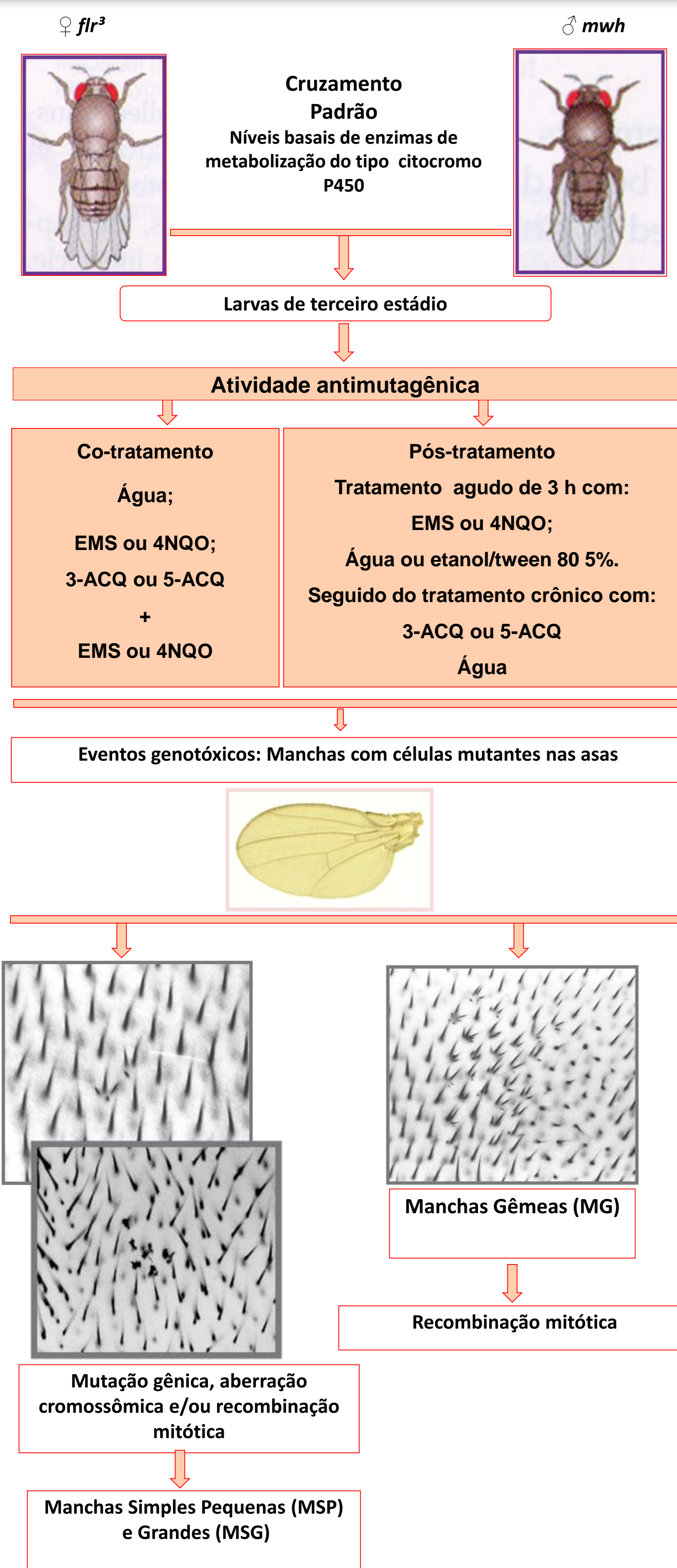
³Professores Orientadores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada À Saúde (PPGBioSaúde). ⁴ E-mail: mauriciol@ulbra.br

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 polifenol 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 pelo etil-metanosulfonato (EMS) e pela 4-nitroquinoleína-1-óxido (4NQO).

METODOLOGIA – TESTE SMART



RESULTADOS

Tabela 1: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr3* do cruzamento padrão (CP) após exposição crônica de larvas de 3º estágio aos ácidos clorogênicos 3-ACQ e 5-ACQ e ao co-tratamento do 3-ACQ e 5-ACQ com EMS

Tratamento	N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diag. estatístico ^b				Total de Manchas <i>mwh</i> ^d (n)	
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^c m = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) ^c m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de Manchas m = 2		
CN ^a	60	0,50 (30)	0,10 (06)	0,03 (02)	0,63 (38)	38	
EMS 5 mM	60	55,82 (3349) *	19,17 (1150) *	10,93 (656) *	85,92 (5155) *	4986	
3-ACQ (µM)	EMS (mM)						
200	5	60	53,95 (3237) -	19,02 (1141) -	12,70 (762) -	85,67 (5140) -	4935
400	5	60	51,13 (3068) -	18,82 (1129) -	11,25 (675) -	81,20 (4872) -	4632
800	5	60	47,27 (2836) -	17,97 (1078) -	11,05 (663) -	76,28 (4577) -	4343
5-ACQ (µM)	EMS (mM)						
200	5	60	54,45 (3267) -	17,58 (1055) -	10,05 (603) -	82,08 (4925) -	4722
400	5	60	51,28 (3077) -	18,32 (1099) -	10,92 (655) -	80,52 (4831) -	4622
800	5	60	58,00 (3480) -	19,73 (1184) -	11,07 (664) -	88,80 (5328) -	5095

^aCN: controle negativo, água destilada e deionizada. ^bDiagnóstico estatístico: *, positivo quando comparado ao CN através do teste binomial condicional. -, negativo quando comparado ao tratamento com EMS através do teste binomial condicional e teste U de Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würigler, 1995); m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=\beta=0,05$. ^cInclui manchas simples *flr3* raras. ^dConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

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 tratamento com EMS (46 mM) seguido do pós-tratamento com três concentrações de 3-ACQ e 5-ACQ

Tratamento ^a	N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diag. estatístico ^b				Total de Manchas <i>mwh</i> ^d (n)	
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^c m = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) ^c m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de Manchas m = 2		
CN	60	0,43 (26)	0,08 (05)	0,03 (02)	0,55 (33)	33	
EMS 46 mM	60	7,12 (427) *	7,88 (473) *	6,75 (405) *	21,75 (1305) *	1151	
3-ACQ (µM)	EMS (mM)						
200	46	60	9,15 (549) -	7,18 (431) -	6,02 (361) -	22,35 (1341) -	1199
400	46	60	9,37 (562) -	6,90 (414) -	6,15 (369) -	22,42 (1345) -	1236
800	46	60	8,45 (507) -	6,77 (406) -	5,25 (315) -	20,47 (1228) -	1115
5-ACQ (µM)	EMS (mM)						
200	46	60	8,80 (528) -	7,02 (421) -	6,10 (366) -	21,92 (1315) -	1196
400	46	60	9,53 (572) -	8,25 (495) -	6,73 (404) -	24,52 (1471) -	1323
800	46	60	7,62 (457) -	6,85 (411) -	5,90 (354) -	20,37 (1222) -	1072

^aCN: controle negativo, água destilada e deionizada. ^bDiagnóstico estatístico: *, positivo quando comparado ao CN através do teste binomial condicional. -, negativo quando comparado ao tratamento com EMS através do teste binomial condicional e teste U de Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würigler, 1995); m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=\beta=0,05$. ^cInclui manchas simples *flr3* raras. ^dConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

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

Tratamento ^a	N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diag. estatístico ^b			Total de Manchas <i>mwh</i> ^d (n)		
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^c m = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) ^c m = 5	Manchas gêmeas m = 5			
CN	60	0,35 (21)	0,08 (05)	0,00 (00)	0,43 (26)	26	
4NQO 2 mM	60	1,33 (80) +	1,42 (85) +	0,58 (35) +	3,33 (200) +	187	
3-ACQ (µM)	4NQO (mM)						
200	2	60	0,92 (55) +	1,05 (63) -	0,57 (34) -	2,53 (152) +	143
400	2	60	0,87 (52) +	0,77 (46) +	0,50 (30) -	2,13 (128) +	120
800	2	60	0,77 (46) +	1,00 (60) +	0,55 (33) -	2,32 (139) +	128
5-ACQ (µM)	4NQO (mM)						
200	2	59	1,02 (60) -	0,88 (52) +	0,69 (41) -	2,59 (153) +	145
400	2	59	0,49 (29) +	0,75 (44) +	0,49 (29) -	1,73 (102) +	93
800	2	60	1,07 (64) -	0,83 (50) -	0,32 (19) -	2,22 (133) +	123

^aCN: controle negativo, etanol 5% + Tween 80 5%. ^bDiagnóstico estatístico: *, positivo; -, negativo 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); m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=\beta=0,05$. ^cInclui manchas simples *flr3* raras. ^dConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Tabela 4: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr3* 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	N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diag. estatístico ^b			Total de Manchas <i>mwh</i> ^d (n)		
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^c m = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) ^c m = 5	Manchas gêmeas m = 5			
CN	60	0,33 (20)	0,12 (07)	0,03 (02)	0,48 (13)	29	
4NQO 30 mM	42	0,93 (39) *	1,00 (42) *	0,71 (30) *	2,64 (34) *	99	
3-ACQ (µM)	4NQO (mM)						
200	30	56	0,66 (37) -	1,13 (63) -	0,77 (43) -	2,55 (143) -	128
400	30	51	0,73 (37) -	0,92 (47) -	0,67 (34) -	2,31 (118) -	107
800	30	54	0,65 (35) -	0,78 (42) -	0,54 (29) -	1,96 (106) +	97
5-ACQ (µM)	4NQO (mM)						
200	30	45	0,47 (21) +	0,89 (40) -	0,62 (28) -	1,98 (89) +	16
400	30	54	0,61 (33) -	0,93 (50) -	0,43 (23) -	1,96 (106) +	39
800	30	58	0,74 (43) -	0,91 (53) -	0,74 (43) -	2,40 (139) -	70

^aCN: controle negativo, etanol 5% + Tween 80 5%. ^bDiagnóstico estatístico: *, positivo; -, negativo 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); m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=\beta=0,05$. ^cInclui manchas simples *flr3* raras. ^dConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

DISCUSSÃO

Os dois isômeros, nas concentrações de 200, 400 e 800 µM, não foram capazes de modular a atividade mutagênica do EMS nos protocolos de co- e pós-tratamento. Por outro lado, o 3-ACQ e o 5-ACQ, nas três concentrações utilizadas, foram capazes de reduzir a incidência de danos genéticos induzidos pela 4NQO no protocolo de co-tratamento. No sistema de pós-tratamento, o 3-ACQ, na concentração de 800 µM, e o 5-ACQ, nas concentrações de 200 e 400 µM, reduziram os danos induzidos pelo 4NQO. 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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASEERVATHAM, G. S. B., et al. Expression pattern of NMDA receptors reveals antiepileptic potential of apigenin 8-C-glucoside and chlorogenic acid in pilocarpine induced epileptic mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 82, p. 54-64, 2016.
- 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.
- 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. Unrelenting problems with chlorogenic acid Nomenclature: A review. *Química Nova*, v. 39, p. 530-3, 2016.

Endereço eletrônico do autor principal: luciapgonzalez28@gmail.com

Apoio Financeiro: