



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA DO ARTEPELIN C

Carmem Regine Faleiro Rodrigues

Aluna de Doutorado do PPGBIOSAÚDE ULBRA Canoas-RS. Laboratório de Toxicidade Genética – TOXIGEN.

Débora Lemes dos Santos

Bolsista IC PROBIC/FAPERGS-ULBRA, Aluna do Curso de Graduação em Biologia e Laboratório de Toxicidade Genética – TOXIGEN, ULBRA Canoas-RS.

Laís Damasceno

Bolsista PIBIT/CNPq-ULBRA, Aluna do Curso de Graduação em Biomedicina e Laboratório de Toxicidade Genética – TOXIGEN, ULBRA Canoas-RS.

Rafael Rodrigues Dihl

Professor do Curso de Graduação em Biologia e PPGBIOSAUDE. Laboratório de Toxicidade Genética – TOXIGEN.

Mauricio Lehmann

Professor do Curso de Graduação em Engenharia Ambiental e PPGBIOSAUDE. Laboratório de Toxicidade Genética – TOXIGEN, mauriciol@ulbra.br.

Resumo

Apesar de apresentar uma grande variação na sua composição química, os diferentes tipos de própolis encontrados na região sudeste e sul do Brasil apresentam o composto polifenólico artepelin C (ARC; ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), que recentemente vem sendo alvo de estudos em relação às suas atividades biológicas. Os resultados mostram que o ARC apresenta diversas atividades biológicas, como indução de apoptose, ação imunomodulatória, antioxidante, antibacteriana, antitumoral, anti-inflamatória e antiangiogênica, além de ter exercido atividade antimutagênica e antigenotóxica em alguns estudos *in vivo* e *in vitro*. Neste sentido, com o objetivo de ampliar as investigações sobre a atividade antimutagênica do ARC o presente estudo se propôs a avaliar a atividade antimutagênica deste composto em relação aos danos induzidos pela mitomicina C (MMC) e pelo etilmetanossulfonato (EMS), através do teste para detecção de mutação e

recombinação somática em *Drosophila melanogaster*. Neste sentido foram utilizados os protocolos de co- e pós-tratamento. O ARC, nas concentrações de 0,012; 0,025 e 0,05% não foi capaz de modular a atividade mutagênica do EMS nos protocolos de co- e pós-tratamento. Por outro lado, apesar de não alterar a frequência de danos induzidos pela MMC no protocolo de cotratamento, o ARC reduziu a mutagenicidade deste composto quando administrado após a indução dos danos, apenas na concentração de 0,012%. Além disso, esta modulação está associada à redução de danos genéticos originados por eventos recombinacionais. Desta forma, somados aos dados da literatura, os dados aqui descritos indicam que, dependendo da concentração de ARC, podem ser desencadeadas respostas variadas, associadas à proteção contra a indução de danos no DNA, à geração de lesões genéticas e também à ativação de mecanismos de reparação do DNA, que por sua vez ocorrem por mecanismos distintos. Estes diversos efeitos podem explicar a multiplicidade de respostas que o ARC vem apresentando na literatura científica.

Palavras-chave: Antimutagenicidade. Artepelin C. *Drosophila melanogaster*.

INTRODUÇÃO

Apesar de apresentar uma grande variação na sua composição química, os diferentes tipos de própolis encontrados na região sudeste e sul do Brasil apresentam o composto polifenólico artepelin C (ARC; ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) (RESENDE et al., 2007; MATSUDA; ALMEIDA-MURADIAN, 2008), que recentemente vem sendo alvo de estudos em relação às suas atividades biológicas.

No que se refere às atividades biológicas do ARC, estudo recente sugere que este composto promove a diferenciação de adipócitos e a entrada de glicose nestas células, em parte através da ligação direta ao receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama (PPAR γ) e, desta forma, o consumo desta substância poderia reduzir o risco de diabetes tipo 2 (CHOI et al., 2011). Adicionalmente, este composto apresentou atividade indutora de apoptose (SZLIZKA et al., 2012), imunomodulatória (NAKANISHI et al., 2003), antioxidante (KAWASHIMA et al., 2012), antibacteriana (SALOMÃO et al., 2008), antitumoral (SZLISZKA et al., 2012), anti-inflamatória (PAULINO et al., 2008) e antiangiogênica (AHN et al., 2007, AHN; KUNIMASA; KUMAZAWA, 2009), além de ter exercido atividade antimutagênica e antígenotóxica (MONTEIRO NETO et al., 2011; RESENDE et al., 2012).

OBJETIVO

Considerando a escassez de informações referentes ao potencial antimutagênico do ARC, o presente estudo propôs-se a investigar a atividade antimutagênica deste composto sobre os danos genéticos induzidos pela etilmetanossulfonato (EMS) e mitomicina C(MMC), através do teste SMART em *D. melanogaster*.

METODOLOGIA

O Teste SMART baseia-se na identificação de cerdas com fenótipos mutantes nas asas de *Drosophila melanogaster* a partir do emprego de linhagens específicas. As cerdas mutantes organizam-se em manchas, com fenótipos característicos, que indicam a ocorrência de eventos genéticos relacionados com mutações pontuais, aberrações cromossômicas e recombinação somática. Para maiores detalhes sobre o teste SMART ver Andrade; Reguly; Lehmann (2004).

Nesta abordagem experimental foi empregado o cruzamento padrão no qual fêmeas da linhagem designada *flr³* são cruzadas com machos da linhagem *mwh*, originando larvas portadoras de nível basal de atividade metabólica dependente de citocromo P-450. Foram utilizados dois sistemas de tratamento:

- Co-tratamento, onde as larvas coletadas do meio de ovoposição foram submetidas ao tratamento crônico em quatro grupos experimentais: controle negativo (solução aquosa de etanol a 5%); controle positivo (EMS 5 mM e MMC 0,05 mM); três diferentes concentrações de ARC (0,012; 0,025 e 0,05%) 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 46 mM (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 ARC.

Para a análise da atividade antimutagênica, os resultados das combinações do ARC com os diferentes mutágenos foram comparados à frequência de danos observada nos tratamentos nos quais foram administrados apenas os mutágenos. Para tanto, foi utilizado o teste U de Mann, Whitney e Wilcoxon.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes a investigação da atividade modulatória do ARC sobre os danos induzidos pelos mutágenos EMS e MMC estão descritos na Tabela 1 e 2. Foram utilizados dois protocolos de tratamento, co- e pós-tratamento, e três concentrações de ARC (0,012; 0,025 e 0,05%).

De uma forma geral, o ARC apresentou atividade modulatória apenas sobre os danos induzidos pela MMC no protocolo de pós-tratamento, tendo reduzido de forma estatisticamente significativa os danos induzidos por este mutágeno (Tabela 2). Nos demais tratamentos não foram observadas alterações significativas na frequência total de manchas geradas pelos agentes mutagênicos quando o ARC foi utilizado (Tabelas 1 e 2). Desta forma, pode-se afirmar que o ARC reduz significativamente as lesões induzidas pela MMC quando aplicada após a indução de danos.

Outros estudos referentes a atividade antimutagênica e antígenotóxica do ARC estão descritos em apenas três publicações científicas. Monteiro Neto et al. (2011) avaliaram a atividade antimutagênica e antígenotóxica do ARC *in vivo* em camundongos Swiss, através do teste de micronúcleos em reticulócitos do sangue periférico com o emprego da doxorubicina (DOX) como indutora de danos genéticos. O ARC administrado via gavagem no protocolo de co-tratamento reduziu a atividade clastogênica da DOX em aproximadamente 60%. Para avaliar a atividade antígenotóxica foi utilizado o teste cometa em células do fígado, utilizando o metilmetanossulfonato (MMS) como indutor de lesões no DNA, também através do protocolo de co-tratamento. Da mesma forma, os resultados mostraram que houve redução de aproximadamente 75% na frequência de danos genéticos causados pelo MMS. Nas duas metodologias

utilizadas os resultados mostraram não haver relação dose-efeito no efeito modulador do ARC.

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

Tratamentos	No. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a					
		Manchas simples pequenas (1-2 células) ^b m=2	Manchas simples grandes (>2 células) ^b m=5	Manchas gêmeas m=5	Total de manchas ^b m=2	Total de manchas <i>mwh</i> ^c	
CN ^d		0,90(54)	0,05 (03)	0,05 (03)	1,00(60)	60	
MMC (mM)	ARC (%)						
0,05	0	60	32,83(1970) *	32,90 (1974) *	13,28 (797) *	79,02 (4741) *	4588
0,05	0,012	60	33,20(1992) -	38,60 (2316) +	12,15 (729) -	83,95(5037) -	4885
0,05	0,025	60	33,22(1993) -	33,75 (2025) -	13,77 (826) -	80,73(4844) -	4694
0,05	0,05	60	33,73(2024) -	34,52 (2071) -	12,43 (746) -	80,68(4841) -	4702
EMS (mM)	ARC (%)						
5	0	60	50,23(3014) *	16,78 (1007) *	5,62 (337) *	72,63(4358) *	4251
5	0,012	60	56,28(3377) -	18,92 (1135) -	7,80 (468) +	83,00(4980) -	4888
5	0,025	60	51,13(3068) -	14,97 (898) -	5,73 (344) -	71,83(4310) -	4216
5	0,05	60	56,63(3398) -	17,78 (1067) -	6,82 (409) -	81,23(4874) -	4774

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): *, positivo; $P \leq 0,05$ vs. controle negativo (CN); teste *U* de Mann, Whitney e Wilcoxon: +, positivo; -, negativo; $P \leq 0,05$ vs. MMC ou EMS sozinhos.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras. ^cForam considerados apenas os clones *mwh* das manchas simples *mwh* e das manchas gêmeas. ^dControle negativo: solução aquosa de etanol 5%.

Tabela 2: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr³* do cruzamento padrão (CP) após exposição crônica de larvas de 3^o estágio submetidas ao tratamento com MMC e EMS e pós-tratadas com ARC

Tratamentos		No. de moscas (N)	Manchas por mosca (no. de manchas) diagnóstico estatístico ^a				Manchas com clones <i>mwh^c</i> (n)
Mut (mM)	ARC (%)		Manchas simples pequenas ^b (1–2 céls.) <i>m</i> = 2	Manchas simples grandes ^b (>2 céls.) <i>m</i> = 5	Manchas gêmeas <i>m</i> = 5	Total de manchas ^b <i>m</i> = 2	
MMC							
0	0	60	0,80 (48)	0,08 (05)	0,05 (03)	0,93 (56)	55
0,12	0	60	1,88 (113) *	6,42 (385) *	2,43 (146) *	10,73 (644) *	606
0,12	0,012	60	1,10 (66) +	3,87 (232) +	1,67 (100) +	6,63 (398) +	375
0,12	0,025	60	2,20 (132) -	5,73 (344) -	2,78 (167) -	10,72 (643) -	615
0,12	0,05	60	1,90 (114) -	5,87 (352) -	2,62 (157) -	10,38 (623) -	606
EMS							
0	0	60	0,80 (48)	0,08 (05)	0,02 (01)	0,88 (53)	53
46	0	60	6,27 (376) *	5,35 (321) *	3,87 (232) *	15,48 (929) *	852
46	0,012	60	4,62 (277) +	4,65 (279) -	4,43 (266) -	13,70 (822) -	745
46	0,025	60	5,33 (320) +	5,28 (317) -	3,72 (223) -	14,33 (860) -	779
46	0,05	60	6,55 (393) -	5,78 (347) -	3,87 (232) -	16,20 (972) -	861

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): *, positivo; $P \leq 0,05$ vs. controle negativo; teste *U* +, positivo; -, negativo; $P \leq 0,05$ vs. MMC e EMS sozinhos. ^bIncluindo manchas simples *flr³* raras. ^cForam considerados apenas os clones *mwh* das manchas simples *mwh* e das manchas gêmeas.

Os outros dois estudos realizados mostram resultados da atividade antimutagênica do ARC em bioensaios *in vitro*. Neste sentido, Resende et al. (2012) avaliaram o potencial antimutagênico no teste de Ames nas linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *Salmonella typhimurium* na presença e ausência de ativação metabólica. O ARC apresentou atividade antimutagênica moderada e alta na linhagem TA98, contra os danos induzidos pela 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (NOPD), sem ativação metabólica, e pelo benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) na presença da fração S9. Na linhagem TA100, o ARC não reduziu a atividade mutagênica da azida de sódio (SA) na ausência de ativação metabólica ao mesmo tempo em que reduziu de forma moderada as mutações induzidas pela aflatoxina B1 (AFB₁). Com a linhagem TA 102, não foram

observadas reduções na atividade mutagênica da MMC, na ausência de ativação metabólica, porém o ARC exerceu alta atividade antimutagênica sobre os danos induzidos pelo 2-aminofluoreno (AF) na presença de S9. Por fim, na linhagem TA97a, o ARC não foi capaz de modular a atividade mutagênica da NOPD e da 2-antramina (AA) na ausência e presença de ativação metabólica, respectivamente. Em algumas das linhagens estudadas houve relação dose-efeito.

No terceiro estudo descrito na literatura foram investigadas as atividades antimutagênica e antigenotóxica do ARC *in vitro* sobre os danos genéticos induzidos pelo MMS, através dos testes de micronúcleos e cometa, em fibroblastos de pulmão de hamster Chinês (células V79). Os resultados obtidos demonstram que nas duas metodologias empregadas, o ARC reduziu significativamente os danos genéticos induzidos pelo MMS. Em ambos os testes a redução média do potencial mutagênico foi de aproximadamente 60%, novamente não foi verificada correlação dose-resposta associada ao potencial antimutagênico e antigenotóxico (DE OLIVEIRA et al., 2013).

CONCLUSÕES

Quando avaliado através do teste SMART, o ARC não exerce atividade antimutagênica sobre os danos induzidos pelo EMS, quando administrado nos protocolos de co- e pós-tratamento, e pela MMC no co-tratamento. O efeito protetor ocorre apenas na concentração de 0,012% sobre as lesões induzidas pela MMC no pós-tratamento. Desta forma, a concentração de ARC pode desencadear respostas variadas, associadas à proteção contra a indução de danos no DNA, à geração de lesões genéticas e também à ativação de mecanismos de reparação do DNA, que por sua vez ocorrem por mecanismos distintos. Estes diversos efeitos poderiam explicar a multiplicidade de respostas que o ARC vem apresentando na literatura científica.

AGRADECIMENTOS

Agências financiadoras: CNPq e FAPERGS.

REFERÊNCIAS

- AHN, M. R.; KUNIMASA, K.; KUMAZAWA, S. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, p. 643-51, 2009.
- AHN, M.-R. et al. Suppression of tumor-induced angiogenesis by brazilian propolis: major component artemillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. **Cancer Letters**, v. 252, p. 235-43, 2007.
- 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**, p. 389-412, 2004.
- CHOI, S. S. et al. Artemillin C, as a PPAR γ ligand, enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, p. 925-933, 2011.
- DE OLIVEIRA, P. F. et al. Evaluation of genotoxicity and antigenotoxicity of artemillin C in V79 cells by the comet and micronucleus assays. **Nutrition and Cancer**, v. 65, p. 1098-1103, 2013.
- 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.
- KAWASHIMA, T. et al. Kinetics and mechanism for the scavenging reaction of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical by synthetic artemillin C analogues. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 85, p. 877-83, 2012.
- MATSUDA A.H., ALMEIDA-MURADIAN L.B. Validated method for the quantification of artemillin-C in brazilian propolis. **Phytochemical Analysis**, v. 9, p. 179-83, 2008.
- MONTEIRO NETO, M. A. B. et al. Antigenotoxicity of artemillin C in vivo evaluated by the micronucleus and comet assays. **Journal of Applied Toxicology**, v. 31, p. 714-9, 2011.
- NAKANISHI, I. et al. Efficient radical scavenging ability of artemillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.1, p. 1452-1454, 2003.
- PAULINO N., ABREU S.R., UTO Y. et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, artemillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, p. 296-301, 2008.
- RESENDE, F. A. et al. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. **Mutation Research**, v. 634, p. 112-118, 2007.
- RESENDE, F. A. et al. Comparative studies of the (anti) mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and artemillin C by the bacterial reverse mutation test. **Molecules**, v. 17, p. 2335-2350, 2012.
- SALOMÃO K. et al. Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, p. 317-24, 2008.

SZLISZKA, E. et al. Artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology**, v. 41, p. 818-828, 2012.