

10

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DESMUTAGÊNICA DO AT SOBRE O EFEITO  
GENOTÓXICO DA MITOMICINA C E DO METILMETANOSSULFONATO EM  
CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster***

**MAURICIO LEHMANN**

Dissertação apresentada ao curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul para a obtenção do Grau de Bacharel em  
Genética.

**Orientadora: Profa. Dra. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade**

Porto Alegre  
1994

UFRGS  
BIBLIOTECA SETORIAL DO  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

BIO  
BIO/50  
neg. 11096  
obra 5714

ES-1610C

11096  
BIO  
BIO/50  
BIO  
1994/126965-4  
1994/09/27  
5714



Dedico este trabalho aos meus pais  
Edegar e Nerlei, à Heloísa e a Biba.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, não somente pelo direito à vida, mas principalmente pelo exemplo de honestidade, trabalho e amor que dedicaram à sua família.

À Dra. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade pelo apoio, confiança, dedicação, não somente um agradecimento, mas sim uma simples e verdadeira homenagem pela pessoa humana e pela profissional competente que sempre demonstrou ser.

À Dra. Maria Luíza Reguly pela amizade, apoio e colaboração indispensável para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos meus irmãos Edegar Jr. e Patrícia pelo carinho, companhia e apoio nas horas difíceis.

À Leticia por tudo e, principalmente, pelo amor e força nestes momentos árduos da vida.

Às minhas queridas companheiras e amigas de laboratório -Janine, Kênya, Viviane e Fábria - pela ajuda, conselhos e feliz convivência durante todos estes anos.

À Profa. Maria Clara Gimmler-Luz pelos auxílios prestados.

Ao Elmo J. A. Cardoso pela paciência e por ter permitido a impressão deste trabalho.

À todos aqueles, que de uma forma ou outra, estiveram presentes e ajudaram na realização desta dissertação.



1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	02
3. REVISÃO DE LITERATURA	03
3.1. Mutagenese	03
3.2. Mutagenese Induzida	04
3.3. Teste de Ames	05
3.4. Teste de Ames com o sistema de recombinação (SMART)	07
3.5. Mutagenese	07
3.6. Citogenese	07
3.7. Transmutação	08
3.8. Mutagenese Induzida	08
3.9. Análise estatística	09
3.10. Resultados	10
4. RESULTADOS	11
5. DISCUSSÃO	20
6. RESULTADO E CONCLUSÃO	27
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Mutagênese do Departamento de Genética da UFRGS, subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UFRGS (PROPESP-UFRGS).

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Atividade desmutagênica do AT .....	7
1.2. Atividade bioantimutagênica do AT .....	10
1.3. A <i>Drosophila melanogaster</i> como um organismo experimental.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Agentes químicos .....	16
3.2. Meios de cultura.....	16
3.3. Teste para a detecção de mutação e recombinação somática (SMART).....	17
3.3.1. Linhagens.....	17
3.3.2. Cruzamento.....	17
3.3.3. Tratamentos .....	18
3.3.4. Montagem das asas.....	18
3.3.5. Análise microscópica .....	19
3.3.6. Bases genéticas.....	19
4. RESULTADOS.....	24
5. DISCUSSÃO .....	30
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38



## 1. INTRODUÇÃO

A avaliação dos danos genéticos resultantes da exposição dos organismos vivos à agentes genotóxicos tem demonstrado uma estreita relação entre a indução de lesões à nível de DNA e o desenvolvimento de câncer.

Na verdade, uma série de inferências, obtidas a partir de resultados experimentais em roedores, fornecem apoio consistente para a visão de que muitas doenças somáticas humanas, como arteriosclerose, envelhecimento e câncer, tem as suas raízes nas mutações. Embasamentos adicionais para esta afirmativa foram fornecidos: (i) por investigações epidemiológicas promovidas pela Comissão Internacional de Proteção Contra Mutagênicos e Carcinógenos Ambientais (ECPEMC), as quais demonstraram que 75 a 90% dos tumores malignos presentes na população dos Estados Unidos são devidos à exposição dos indivíduos a agentes genotóxicos (Brown, 1980; Doll e Peto, 1981); (ii) pela identificação de genes específicos envolvidos na indução de câncer - os proto-oncogenes - e a sua ativação por alterações genéticas a nível de DNA (van der Eb et al., 1984; Spandidos e Wilkie, 1984; Cooper, 1984).

Desta forma, a atividade mutagênica, além de constituir um risco genético para as gerações futuras, possui a desvantagem adicional de induzir, diretamente nos organismos expostos às substâncias genotóxicas, a formação de tumores malignos (Würgler et al., 1984).

De fato, existem diversos compostos, presentes em nosso meio ambiente, que são mutagênicos, clastogênicos, recombinogênicos e/ou carcinogênicos e que podem interagir entre si e, assim, agirem sobre o DNA das células vivas. Entretanto, tem sido demonstrado que algumas substâncias, normalmente comuns à dieta alimentar humana, apresentam atividade antimutagênica (Waters et al., 1990). Pode-se, portanto, inferir que os organismos vivos estão expostos a uma mistura de compostos mutagênicos e antimutagênicos. Desta forma, o estudo da interação entre estes dois tipos de substâncias torna-se de grande



interesse, já que os antimutagênicos atuam diminuindo a mutagênese, o que leva, em última análise, a uma proteção contra a genotoxicidade e/ou carcinogênese.

São duas as implicações da detecção e do estudo dos antimutagênicos. Em um primeiro momento, a pesquisa dos mecanismos da antimutagênese, por si só, permite elucidar os processos celulares da mutagênese. Em um segundo momento, o controle da mutabilidade celular, por antimutagênicos conhecidos, pode fornecer métodos para prevenir as mutações que resultam em desenvolvimento de câncer, envelhecimento e doenças devidas aos efeitos genotóxicos das substâncias mutagênicas (Kada e Shimoi, 1988).

Dentro deste contexto, surge então, um novo campo de pesquisa - a Antimutagênese e a Anticarcinogênese - que envolve, justamente, a identificação e a caracterização de substâncias naturais ou sintéticas, que são capazes de interferir sobre as diferentes etapas que antecedem a fixação das mutações e/ou aberrações cromossômicas.

Na verdade, quando diagnosticamos uma substância como mutagênica, estamos nos referindo à expressão final de uma cadeia de eventos que envolve: (i) a via de entrada e a quantidade do composto que é absorvida; (ii) a sua captação pelo sistema metabólico, quando nos referimos a pró-mutagênicos ou pelas células alvo, no caso de agentes genotóxicos de ação direta; (iii) o seu acesso ao núcleo e a sua interação com o DNA, e finalmente (iv) a fixação das lesões genéticas. Entretanto, vários fatores, inerentes às células, podem interferir sobre este processo. Assim, destacam-se: (i) os sistemas de ativação e desintoxicação metabólica; (ii) a formação de espécies ativas de oxigênio ou de derivados nucleofílicos e sua captação por bloqueadores de moléculas reativas; (iii) as lesões pré-mutacionais presentes no DNA e a possibilidade de sua reparação por múltiplos sistemas de correção (De Flora e Ramel, 1988).

Baseado nestas considerações, Kada classificou os antimutagênicos em duas categorias, conforme o seu modo de ação: (i) desmutagênicos - que desempenham sua atividade protetora inativando as substâncias mutagênicas antes que elas atuem sobre o DNA, e (ii) bioantimutagênicos - que suprimem as mutações, por interferirem sobre os processos metabólicos de reparação, inerentes à célula. Neste caso, o mutagênico causa danos ao DNA, que são mais eficientemente corrigidos quando em presença do bioantimutagênico (Kada et al., 1982).



Uma classificação mais completa, preconizando dois principais estágios para a ação dos antimutagênicos, foi proposta por Ramel et al. (1986):

- a) Estágio 1 - compreendendo substâncias de ação extracelular;
- b) Estágio 2 - incluindo produtos de ação intracelular.

Dentro destes estágios são propostas outras subdivisões, como apresentado no Esquema 1.

Esquema 1. Classificação dos antimutagênicos quanto ao seu modo de ação (Ramel et al., 1986).

---

#### 1. Extracelular

- a. Inibidores da formação ou captação dos mutagênicos
- b. Inativadores de mutagênicos ou pró-mutagênicos

#### 2. Intracelulares

- a. Agentes bloqueadores - previnem a mutação por competirem ou reagirem com sítios alvos
    - (i) inibem a conversão no carcinógeno final
    - (ii) aumentam a atividade das enzimas desintoxicantes
    - (iii) reagem diretamente com grupos eletrofilicos
  - b. Agentes captadores de radicais
  - c. Agentes supressores - previnem a expressão neoplásica de células iniciadoras
  - d. Agentes que afetam os mecanismos de reparação do DNA
- 

Dentro da carcinogênese, os antimutagênicos são classificados conforme o estágio do processo carcinogênico em que atuam. Assim, os inibidores da carcinogênese foram divididos em três categorias principais por Wattenberg (1983):

- compostos, que a partir de precursores químicos, previnem a formação de metabólitos mutagênicos e/ou carcinogênicos;
- agentes bloqueadores que por reagirem com sítios celulares críticos, previnem a

carcinogênese;

- agentes supressores, que em células previamente expostas a doses carcinogênicas de um determinado agente, são capazes de suprimir a expressão neoplásica.

Posteriormente, associando os conhecimentos mais recentes a respeito dos mecanismos de ação dos inibidores da mutagênese e da carcinogênese, De Flora e Ramel (1988) propuseram uma classificação mais detalhada, que pode ser vista no Esquema 2.

Esquema 2. Mecanismos de inibição da mutagênese ou carcinogênese (De Flora e Ramel, 1988).

---

## 1. Inibidores da mutagênese com atuação extracelular

### 1.1. Inibidores da captação dos mutagênicos ou de seus precursores

#### 1.1.1. Impedem a sua penetração

##### 1.1.1.1. Dentro do organismo

##### 1.1.1.2. Dentro da célula

#### 1.1.2. Favorecem a sua remoção

### 1.2. Inibidores da formação endógena do mutagênico

#### 1.2.1. Inibem a reação de nitrosação

#### 1.2.2. Modificam a flora microbiana intestinal

### 1.3. Desativadores do mutagênico

#### 1.3.1. Por reação física

#### 1.3.2. Por reação química

#### 1.3.3. Por reação enzimática

## 2. Inibidores da mutagênese com atuação intracelular

### 2.1. Moduladores do metabolismo

#### 2.1.1. Inibem a duplicação celular

#### 2.1.2. Favorecem a captação do mutagênico por células não-alvo

#### 2.1.3. Inibem a ativação de pró-mutagênicos

#### 2.1.4. Induzem os mecanismos de desintoxicação

### 2.2. Bloqueadores de moléculas reativas

#### 2.2.1. Reagem com sítios eletrofilicos

##### 2.2.1.1. Por reação química



- 2.2.1.2. Por reação enzimática
  - 2.2.2. Captam espécies ativas de oxigênio
  - 2.2.3. Protegem sítios nucleofílicos do DNA
  - 2.3. Moduladores da duplicação e reparação do DNA
    - 2.3.1. Aumentam a fidelidade da duplicação do DNA
    - 2.3.2. Favorecem a reparação das lesões do DNA
    - 2.3.3. Inibem a reparação indutora de erros
  - 3. Inibidores atuando na iniciação ou em células neoplásicas
    - 3.1. Moduladores da promoção tumoral
      - 3.1.1. Inibem os efeitos genotóxicos
      - 3.1.2. Captam radicais livres
      - 3.1.3. Inibem a proliferação celular
      - 3.1.4. Induzem a diferenciação celular
      - 3.1.5. Modulam o sinal de tradução
    - 3.2. Moduladores da progressão tumoral
      - 3.2.1. Inibem os efeitos genotóxicos
      - 3.2.2. Atuam nos hormônios ou nos fatores de crescimento
      - 3.2.3. Atuam no sistema imune
      - 3.2.4. Agentes anti-neoplásicos físicos, químicos ou biológicos
      - 3.2.5. Modulam o sinal de tradução
- 

Algumas substâncias inibidoras da mutagênese e/ou da carcinogênese, agem interferindo em apenas uma das várias etapas de atuação propostas pela classificação de De Flora e Ramel (1988). Por outro lado, outros inibidores atuam através de mecanismos múltiplos e, conforme a etapa em que eles estão interferindo, podem fornecer resultados contraditórios. Desta forma, um agente que apresenta efeitos protetores em determinadas condições experimentais pode ser inefetivo ou nocivo (tóxico, mutagênico e/ou carcinogênico), quando variam : (i) a dose, rota e sequência de administração do modulador; (ii) o organismo teste empregado; ou (iii) o tipo de lesão que está sendo analisada (De Flora e Ramel, 1988; De Flora, 1989; De Flora et al., 1989, 1992).



As pesquisas na área da antimutagenese e anticarcinogênese desenvolveram-se, procurando principalmente a detecção de fatores anti-risco presentes na dieta alimentar humana, empregando ensaios de curta duração *in vitro* e *in vivo*. Para tanto, tem sido utilizados testes e organismos experimentais que são também usados na diagnose da atividade mutagênica, carcinogênica e/ou recombinacional de agentes genotóxicos (Wattenberg, 1985). Os sistemas bacterianos foram os primeiros a serem utilizados nos estudos sobre a atividade antimutagênica de diferentes substâncias. No entanto, eles tem como principais limitações intrínsecas a necessidade de um sistema metabólico exógeno, bem como a ausência de compartimentalização celular. Posteriormente, os estudos envolveram sistemas *in vitro* (culturas de células de ovário de hamster) e *in vivo* (ratos e camundongos), experimentos de carcinogenicidade animal e modelos matemáticos, visando correlacionar a estrutura química das substâncias que estavam sendo analisadas, com a sua atividade moduladora (De Flora, 1989). Todos estes estudos forneceram dados adicionais que foram somados às observações previamente obtidas em bactérias, e desta forma, aproximadamente 500 compostos, capazes de exercer efeitos protetores sobre diferentes agentes genotóxicos, foram identificados e agrupados em pelo menos 25 classes químicas diferentes (Boone et al., 1990).

Dentre as substâncias químicas classificadas como antimutagênicas destacam-se os taninos, que pertencem a um grande número de compostos fenólicos, onde estão incluídos desde simples fenóis até macromoléculas com pesos moleculares variando entre 50 a 3.000. Estes taninos são, naturalmente, encontrados na madeira, casca, folhas, raízes e frutos de diferentes espécies vegetais -principalmente em mono e dicotiledôneas (Enomoto, 1987; IARC, 1976).

Os taninos vegetais foram divididos em: (i) taninos condensados ou não-hidrolisados - que apresentam estruturas complexas em forma de dímeros, trímeros, oligômeros ou polímeros e (ii) taninos hidrolisados por ácidos, álcalis e enzimas - que são, ainda, subdivididos em galotaninos e elagitaninos, com base nos ácidos fenólicos que contém (Harworth, 1961). Ainda dentro dos taninos, destaca-se o AT - um galotanino (éster de açúcar, derivado do ácido carboxil triidrobenceno) - que, em função de suas características químicas, é utilizado como precipitador de proteínas, íons de metal pesado e amido. O AT é, também, empregado como aditivo para a fabricação de tintas em geral e no processamento de couros e peles. Estima-se que o seu emprego, na indústria têxtil dos Estados Unidos, seja



de, aproximadamente, 100.000 Kg anuais. Ele é também utilizado na medicina popular para amenizar os sintomas da diarreia, bem como a sintomatologia das queimaduras. Para este fim, cerca de 10.000 Kg de AT são, anualmente, consumidos nos Estados Unidos. É através do consumo de chás verde e preto, cacau, café e bebidas manufaturadas - como vinhos tinto e rosa, e a cerveja, que contém de 0,1 a 1,15% de AT - que este composto se faz presente na dieta alimentar humana (Bichel e Bach, 1968; Hartman e Schankel, 1990). Uma vez que o AT é utilizado, ainda, como aromatizante em bebidas não-alcoólicas, sorvetes e doces em geral, 900.000 Kg anuais deste composto são empregados pelas indústrias alimentícias dos Estados Unidos (IARC, 1976). Assim, considera-se que o consumo diário de taninos na espécie humana seja de 1g por pessoa (Ramel et al., 1986).

Uma série de trabalhos experimentais, desenvolvidos a partir de 1980, demonstraram que o AT é capaz de modular os efeitos mutagênicos, clastogênicos e/ou carcinogênicos de diversos agentes genotóxicos. Esta atividade moduladora pode ser exercida por diferentes mecanismos de ação que incluem: atividade desmutagênica e/ou bioantimutagênica. Dentro da atividade desmutagênica o AT pode atuar por: (i) inativação de mutagênicos exógenos; (ii) prevenção da formação de metabólitos genotóxicos; (iii) inibição da reação entre o mutagênico e o DNA. Por outro lado, através da sua ação bioantimutagênica, ele pode interagir com as enzimas envolvidas na primeira etapa do processo por excisão-ressíntese, aumentando a eficiência deste mecanismo de reparação inerente às células.

### 1.1. ATIVIDADE DESMUTAGÊNICA DO AT

Diversos trabalhos desenvolvidos, tanto em pró como em eucariotos, caracterizam o AT como um agente desmutagênico, atuando sobre a atividade mutagênica, clastogênica e/ou carcinogênica de vários compostos químicos.

Stich et al. (1982), investigando as propriedades inibitórias do AT sobre a ação mutagênica dos metabólitos, resultantes da nitroação da metiluréia (MU), em *Salmonella typhimurium* TA1535, observaram que, a presença do AT (1mg/ml), durante a reação de nitroação, levou a uma diminuição significativa na frequência de revertentes his<sup>+</sup>. Este efeito inibitório do AT sobre as lesões induzidas pela MU pode ser explicado pela: (i)



captação dos compostos envolvidos na nitrosação; (ii) interação com os produtos resultantes da nitrosação, ou (iii) inibição da formação de compostos N-nitrosos. Acredita-se que esta ação protetora, deve-se ao bloqueio dos processos que estão envolvidos na nitrosação da MU, já que o tratamento com AT não causa redução na indução de revertentes, após a completa nitrosação deste composto.

Ainda em *S. typhimurium*, demonstrou-se que o AT reduz a frequência de revertentes induzidos pelo principal mutagênico e carcinógeno produzido pela metabolização do benzo[a]pireno (B[a]P), o B[a]P7,8-diol-9,10-epóxido-2. Em células de hamster Chinês V79, o AT também demonstrou ser um potente inibidor dos efeitos citotóxicos deste metabólito. Neste caso, sugere-se que ele esteja exercendo uma atividade desmutagênica extracelular, interagindo diretamente com o agente clastogênico, já que o AT acelera o desaparecimento do B[a]P em meios aquosos (Huang, et al., 1985).

Acompanhando os efeitos do AT, sobre a formação de monoadições entre hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) e o DNA, em células epidérmicas e pulmonares de camundongos SENCAR, Das et al. (1987a) observaram que: (i) *in vitro* - 25  $\mu$ M de AT inibiu em, 63 a 64%, a formação de monoadições HAP-DNA; (ii) *in vivo* - o AT causou inibição das ligações HAPs, tanto ao DNA, quanto às proteínas epidérmicas, com apenas uma única aplicação tópica (400  $\mu$ mol/Kg de peso corporal). Além disso, o AT mostrou-se um potente inibidor das enzimas envolvidas na metabolização dos HAPs, em células epidérmicas de camundongos SENCAR, tanto *in vivo* como *in vitro* (Das et al., 1987b). Neste mesmo tipo de células, o AT inibe, significativamente, a reação de ligação de HAPs, como o B[a]P e o 3-2-dimetil-4-aminobifenil, ao DNA, o que explica os decréscimos observados nas frequências de monoadições induzidos por estes agentes (Das et al., 1987a).

Estudando a ação anticarcinogênica de compostos fenólicos, principalmente referindo-se à iniciação e promoção de tumores de pele em camundongos SENCAR, Mukhtar et al. (1988) e Bik et al. (1988) demonstraram que o risco tumorigênico - induzido por DMBA, B[a]P, N-metil-N-nitrosuréia (MNU), 7,12-dimetilbenzeno[a]antraceno, B[a]P-7,8-diol-9,10-epóxido-2 e 3-metilcolantreno (MCA) - foi suprimido pelo pré-tratamento com AT. Foi verificado, ainda, que o AT é capaz de inibir a iniciação e o posterior desenvolvimento de tumores de pele, induzidos por MCA, em camundongos Balb/c (Bik, et al., 1988).



Também em camundongos SENCAR, Khan et al. (1988) verificaram que o pré-tratamento tópico com AT (3.000 nmol) é capaz de inibir tumores de pele, induzidos por ( $\pm$ )-7,8-diidróxi-9-10-epoxi-7,8,9,10-tetraidrobenzo[a]pireno (BPDE-2). Quando comparou-se a resposta do controle positivo com os grupos submetidos ao tratamento combinado, AT (50 mg/animal/dia) mais agente mutagênico, foi detectada uma redução estatisticamente significativa na incidência de tumores. Além disto, observou-se, também, um retardo na promoção neoplásica, já que o período de latência - entre a iniciação e a promoção do câncer de pele - é aumentado de 6 semanas, nos controles positivos, para 9 nos animais pré-tratados com AT (Athar et al., 1989).

Assim, a ação antimutagênica do AT sobre os HAPs parece refletir suas potencialidades como um agente desmutagênico intracelular que pode atuar: via bloqueio do metabolismo dos HAPs, através da inibição das reações enzimáticas, mediadas pela enzima citocromo P-450 (Conney, 1982); ou via interação com os metabólitos carcinogênicos dos HAPs, impedindo a sua interação com o DNA dos tecidos alvo (Huang et al., 1985; Das et al., 1987a, 1987b; Bik et al., 1988; Khan et al., 1988; Mukhtar et al., 1988; Athar et al., 1989).

Hirose et al. (1991), avaliaram o potencial antioxidante do AT, e a sua conseqüente atividade anticarcinogênica, em ratos F344 que foram submetidos ao tratamento seqüencial com 2,2-diidróxi-di-n-propilnitrosamina (DHPN), N-etil-N-hidroxietilnitrosamina (EHEN) e DMBA, durante 21 dias. Estes animais, divididos em 2 subgrupos, receberam dieta normal ou alimentação complementada com 1% de AT, durante 32 semanas. Comparando-se os resultados histológicos obtidos nestes dois subgrupos, os autores demonstraram que o AT foi marginalmente efetivo no que se refere à inibição da carcinogênese hepática e de cólon, embora não tenha havido nenhuma interferência sobre a indução de câncer pancreático, urinário e de pulmão, demonstrando que o efeito antipromotor do AT sobre a carcinogênese é órgão dependente.

Adicionalmente, Gali et al. (1991) verificaram que o pré-tratamento tópico de camundongos CF-1 com AT (0,05 - 50  $\mu$ mol) inibiu cerca de 85% da atividade da enzima epidérmica ornitina descarboxilase (ODC) induzida por 12-O-tetracanoilforbol-13-acetato (TPA). A indução da atividade desta enzima por TPA representa um excelente marcador biológico do estágio 2 (propagação) da promoção de câncer de pele. O TPA não interage



diretamente com o ODC, mas interfere na ação promotora de tumor e/ou nas vias moleculares que regulam a sua atividade enzimática, já que o efeito inibidor do AT apresenta uma relação dose efeito e se mostrou mais efetivo contra a indução de ODC quando aplicado antes do tratamento com TPA.

O efeito desmutagênico de compostos polifenólicos, como o AT, existentes em extratos de chás verde e preto, sobre a atividade mutagênica do N-methyl-N-nitrosoguanidina (MNNG) foi estudado *in vitro* em *Escherichia coli* WP2 e *Salmonella typhimurium* TA100. Utilizando estes mesmos organismos experimentais, foi também analisada a resposta antimutagênica do lavado gástrico de ratos, submetidos, previamente, ao tratamento combinado MNNG e extratos de chás. Em ambos os tipos de abordagem experimental foi encontrada uma inibição da mutagenicidade, da ordem de 20 a 58%, quando foram comparados os tratamentos combinados e os controles positivos (Jain et al., 1989).

## 1.2. ATIVIDADE BIOANTIMUTAGÊNICA DO AT

Além de sua atividade desmutagênica, também atribui-se ao AT uma ação bioantimutagênica, que foi primeiramente verificado por Shimoi et al. (1985). Os autores demonstraram que o AT (0,2 -2,0 mg/placa) suprime a mutagênese induzida pela 4NQO e pela radiação UV, em *E. coli* B/r WP2trp<sup>-</sup>. Porém, em cepas mutantes *uvrA*<sup>-</sup> e *uvrB*<sup>-</sup> este efeito modulador não foi encontrado - o que indicou que este composto fenólico é capaz de estimular a etapa de incisão do processo de reparação por excisão-ressíntese, mediado pelos genes *uvrA* e *uvrB*.

Sasaki et al. (1988), demonstraram que o pós-tratamento com 3,3 µg/ml de AT é capaz de suprimir as aberrações cromossômicas estruturais em hamster Chinês, induzidos pela radiação UV, mitomicina C (MMC) ou metilmetanossulfonato (MMS). Porém, este efeito protetor foi verificado somente nas células que estão em fase G1 do ciclo celular. O pós-tratamento com AT não alterou as lesões produzidas pela exposição aos raios X ou pela bleomicina. As lesões causadas nas células expostas à radiação UV, MMC e MMS são, respectivamente, dímeros de pirimidina, biadições e monoadições no DNA, que são preferencialmente corrigidos pelo processo de excisão de bases, que utiliza DNA glicosilases



ou, pelo sistema de reparação por excisão de nucleotídeos. Enquanto as lesões causadas pela radiação-X ou bleomicina (BLM), que são quebras de cadeia, são reparadas por outros sistemas de reparo que não envolvem estes dois processos de correção do DNA. Portanto, acredita-se que o AT estimule algum processo pré-replicativo de reparação do DNA - provavelmente excisão de nucleotídeos.

Adicionalmente, notou-se uma clara diminuição nas frequências de trocas entre cromátides irmãs (SCEs), em células de hamster Chinês em cultura, tratadas com MMC ou radiação UV e pós-tratadas com AT (0,3 - 3,0 µg/ml). Este efeito protetor também foi observado em cultura de células humanas de pacientes com Xeroderma pigmentosum (XP), anemia de Fanconi (AF) e de indivíduos normais. Em todas as culturas de células humanas analisadas, o AT reduziu significativamente as SCEs induzidas pela MMC. Enquanto que para as induzidas pela radiação UV, a ação bioantimutagênica do AT ocorreu apenas em células de indivíduos normais ou portadores de AF. Como as células XP são bloqueadas na etapa de incisão do processo de reparação por excisão-ressíntese, e os dímeros de pirimidina induzidos pela radiação UV são corrigidos por este mecanismo, concluiu-se que o AT estimula a atividade de incisão (Sasaki, et al., 1989).

A ação anticlastogênica do AT foi verificada, utilizando-se sistemas *in vivo*. Em camundongos pré-tratados com 50 a 500 mg/Kg de AT e, posteriormente expostos a mutagênicos como MMC, 4NQO e etilnitrosuréia (ENU) - observou-se uma diminuição na frequência de aberrações cromossômicas. Também foi encontrado efeito protetor do AT, quando se utilizou o pré-tratamento, pois ele reduziu a incidência de não-disjunção, perda cromossômica e recombinação mitótica, induzida pela ENU - eventos detectados pelo aparecimento de clones com marcadores recessivos para cor de pêlo em camundongos. Assim, acredita-se que este efeito protetor seja devido à promoção da atividade de incisão, que é, justamente, estimulada pelo pré-tratamento com AT (Sasaki et al., 1990).

Em cultura de células de hamster Chinês, Imanishi et al. (1991) estudaram o efeito dos taninos extraídos de chás verde e preto, sobre as SCEs e também sobre as aberrações cromossômicas induzidas pela radiação UV. Os resultados fornecidos pelo pós-tratamento com estes extratos, associados à presença da fração microssomal S9, foram contraditórios. Quando utilizados em baixas concentrações (6,7 µg/ml), os taninos testados suprimem ambos os eventos mutagênicos analisados, exercendo, assim, uma atividade



bioantimutagênica. Porém, um acréscimo significativo nas frequências das SCEs e aberrações cromossômicas induzidas pela MMC ou pela radiação UV, foi encontrado quando os taninos foram administrados em altas concentrações (20µg/ml), mostrando, assim, uma ação co-mutagênica. Adicionalmente, em células XP e de embriões humanos normais (F7.000), na presença da fração S9, o pós-tratamento com os extratos de taninos reduziu a frequência de SCEs. Com estes resultados, os autores sugeriram que em altas concentrações, os taninos bloqueiam o metabolismo celular, e desta forma, refletem a ação destes compostos. Assim, o aumento das SCEs e aberrações cromossômicas induzidas, é devido ao efeito dos taninos não metabolizados, que inativam as enzimas envolvidas na primeira etapa do processo de reparo do tipo excisão-ressíntese. Estes compostos fenólicos, em pequenas concentrações, não interferem sobre as enzimas de metabolização e, desta forma, são transformados em metabólitos, que atuam diretamente sobre o sistema de excisão-ressíntese, aumentando a sua atividade. Com este efeito indireto, os taninos reduzem, de forma significativa, a frequência dos eventos mutacionais analisados (Imanishi et al., 1991). Também em medula óssea de ratos, resultados semelhantes foram obtidos para as aberrações cromossômicas induzidas pela aflatoxina B1 (AFB1), caracterizando, assim, a atividade bioantimutagênica dos taninos extraídos do chá verde (0,3 mg/animal) como sendo devida à sua ação indireta (Ito et al., 1989).

### 1.3. A *Drosophila melanogaster* COMO UM ORGANISMO EXPERIMENTAL

A medida que a Mutagênese foi se desenvolvendo como um novo campo de atuação dentro da Genética, foram criados uma série de sistemas teste, tanto em pró como em eucariotos, que tiveram como objetivo a diagnose de agentes genotóxicos.

Entre os diferentes organismos experimentais disponíveis para a avaliação dos diversos tipos de eventos relacionados com alterações da informação genética, a *Drosophila melanogaster* oferece uma série de vantagens. Entre estas, destaca-se a presença de inúmeros genes marcadores, que permitiram a construção de linhagens específicas, capazes de detectar:

- mutações gênicas com efeitos deletéreos;
- pequenas deleções que serão efetivamente transmitidas;
- pequenas duplicações que surgem, provavelmente, por instabilidades na replicação do DNA;



- rearranjos cromossômicos estruturais como inversões e translocações;
- não-disjunção, levando a aberrações cromossômicas numéricas;
- recombinação genética (Zijlstra, 1987).

Todos estes eventos podem ser observados tanto em tecidos gonadais, como em tecidos somáticos. Além disso, os resultados que são obtidos nas células somáticas podem fornecer evidências indiretas quanto às potencialidades carcinogênicas da substância que está sendo analisada (Zijlstra, 1987), com a possibilidade de extrapolação para mamíferos superiores, com um índice de acerto de 80% (Graf, comunicação pessoal).

O uso da *D. melanogaster* na Genética Toxicológica tem se baseado, principalmente, na resposta de células germinais - obtida através do teste para detecção de letal recessivo ligado ao sexo (SLRL) e do teste para perda do cromossomo X em anel (RXL). Ambos fornecem resultados importantes no que se refere aos riscos genéticos das mutações para as gerações futuras.

O ensaio de SLRL é capaz de detectar mutagênicos que induzem alterações herdáveis - desde simples trocas de pares de bases até pequenas deleções - abrangendo um número considerável de danos genéticos transmissíveis, que ocorrem nas células germinais de um organismo eucariótico (Zijlstra, 1987). Através desta metodologia, pode-se obter resultados sobre mutações gênicas, que ocorrem simultaneamente em 600 a 800 locos, presentes no cromossomo X (Lee et al., 1983).

O teste de RXL fornece informações sobre o efeito clastogênico de um dado agente em uma só geração. Ele permite detectar quebras cromossômicas totais ou parciais, bem como a ocorrência de não-disjunção entre os cromossomos X e Y, permitindo a obtenção de resultados conclusivos sobre aberrações cromossômicas estruturais e numéricas (Valencia et al., 1984).



Entre os testes disponíveis, o teste para detecção de mutação e recombinação em células somáticas (SMART), em *D. melanogaster*, é prioritário, tendo em vista a sua indiscutível precisão e valor para discriminar agentes mutagênicos, clastogênicos e/ou recombinogênicos, tanto de ação direta, quanto de atividade indireta, dependente de metabolização por citocromo P-450 (Graf et al., 1984 e Würgler e Vogel, 1986). Este ensaio baseia-se na detecção de manchas de pêlos mutantes presentes nas asas dos adultos trans-heterozigotos para genes marcadores específicos. Tanto o número como o tamanho destas manchas são analisados. O primeiro parâmetro fornece resultados sobre a ocorrência de eventos genéticos, e o segundo informa sobre o tempo de atuação do mutagênico ao longo da embriogênese. Adicionalmente a presença de dois genes marcadores específicos, localizados no cromossomo 3, permite a distinção entre eventos mutacionais - principalmente do tipo mutação pontual - e recombinação mitótica entre regiões de hetero ou eucromatina (Graf et al., 1984).

A comparação entre os resultados obtidos no SMART, com aqueles detectados pelo teste de SLRL, em células germinais de *D. melanogaster*, indica uma alta concordância de resposta entre ambos os testes. Assim, dos 80 compostos avaliados, 55 (ou 69%) mostraram resposta positiva nos dois ensaios genéticos. Quatorze compostos classificados como negativos ou inconclusivos, através do SLRL, foram claramente identificados como positivos quando avaliados pelo teste SMART. Somente 2 substâncias foram mutagênicas em ensaios que utilizaram SLRL e negativas em SMART (Würgler e Vogel, 1986; Graf, comunicação pessoal).

Adicionalmente, a eficiência do SMART em relação a testes germinais que visam detectar a ação clastogênica, evidenciou que dos 46 compostos analisados, 35 foram positivos em ambos os ensaios. Nove foram positivos em SMART e negativos em testes que visam a identificação de quebras cromossômicas em células germinais. Somente 2 substâncias foram negativas em SMART e em células germinais. Todos estes resultados indicam que o teste SMART é efetivo, no que se refere à diagnose do potencial mutagênico e clastogênico de uma substância. Quando a validade desta metodologia experimental é expressa em percentagens, observa-se um acerto de 86 e 96% do SMART em relação a, respectivamente, 71% obtido pelo SLRL - que reflete a ação mutagênica - e 80% pelos testes que visam a detecção de atividade clastogênica (Würgler e Vogel, 1986).



## 2. OBJETIVOS

Na verdade, são poucas as investigações específicas sobre a atividade antimutagênica do AT em organismos eucariotos intactos, como é o caso da *D. melanogaster*. Adicionalmente, os mesmos ensaios genéticos empregados para a detecção de atividade genotóxica de agentes químicos e físicos tem fornecidos respostas extremamente precisas no que se refere a identificação de fatores anti-risco, presentes na dieta alimentar humana.

Desta forma, considerando o alto poder discriminatório do SMART, nós nos propusemos a atingir os seguintes objetivos:

1. Avaliar as potencialidades da *D. melanogaster* e do teste SMART como um sistema para a análise da atividade antimutagênica do AT.
2. Detectar a atividade antimutagênica do AT, em células somáticas de *D. melanogaster*, através da determinação do potencial modulador do AT sobre:
  - as lesões espontâneas
  - os efeitos genotóxicos induzidos pelos agentes alquilantes mitomicina C e metilmetano-sulfonato

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 AGENTES QUÍMICOS

Foram utilizados: o ácido tânico (AT; CAS N. 1401-55-4), obtido da Vetec Química Fina Ltda., RS, Brasil; o mutagênico bifuncional mitomicina C (MMC; CAS N. 50-07-5), adquirido da Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltda., Japan e o agente alquilante monofuncional, metilmetanossulfonato (MMS; CAS N. 66-27-3), obtido da Sigma Chemical Company, St. Louis, USA. No momento dos tratamentos, os agentes químicos foram dissolvidos em tampão fosfato 0,03M, pH 6,8, contendo 5% de sacarose (E. Merck, Darmsted). Sendo a MMC uma substância facilmente degradada pela luz visível, todos os tratamentos envolvendo a sua utilização foram realizados ao abrigo da luminosidade.

#### 3.2 MEIOS DE CULTURA

Tanto os estoques de *Drosophila melanogaster*, como os cruzamentos das moscas adultas, permaneceram em vidros de 1/4 ou 1/8 de litro contendo meio de cultura padrão, segundo Marques et al. (1966), modificado: 14 l de água, 750 g de farinha de centeio, 2.000 g de farinha de milho grossa, 100 g de farinha de soja, 1.550 g de açúcar cristal, 50 g de nipagin, dissolvido em álcool etílico 96° C (1:1) e 15 g de cloreto de sódio.

A obtenção de larvas de 2° estágio foi realizada em meio de ovoposição, contendo uma base de ágar 2,35% (Biobrás, S.A.) coberta com uma camada, de aproximadamente 5mm, de fermento pastoso (Fleischmann e Royal Ltda.), de acordo com protocolo descrito por Graf et al. (1984).

O tratamento das larvas foi realizado em vidros de 1/36 l contendo 1,5 g de meio sintético (Fórmula 4-24, Carolina Biological Supply Company, Burlington, North Carolina) onde foram adicionados 5 ml das diferentes soluções de tratamento.



### 3.3. TESTE PARA A DETECÇÃO DE MUTAÇÃO E RECOMBINAÇÃO SOMÁTICA (SMART)

#### 3.3.1. LINHAGENS

Foram utilizadas linhagens de *D. melanogaster* portadoras de genes marcadores específicos, localizados no cromossomo 3, que permitem detectar a indução de mutação e recombinação em células somáticas. Tais linhagens são designadas como *flr<sup>3</sup>* e *mwh* e apresentam, respectivamente, as seguintes constituições genéticas:

- *flr<sup>3</sup>/In (3LR) TM3, ri pP sep bx<sup>34e</sup> e<sup>S</sup> Ser*
- *mwh/mwh*

Para a obtenção de maiores informações sobre os marcadores genéticos existentes nestas linhagens, ver Lindsley e Grell (1968); Garcia-Bellido e Dapena (1974); Lindsley e Zimm (1992); Graf e van Schaik (1992).

#### 3.3.2. CRUZAMENTO

Na presente abordagem experimental, foi empregado o cruzamento padrão, em que fêmeas virgens *flr<sup>3</sup>* foram cruzadas com machos *mwh*, originando larvas portadoras de nível moderado de atividade metabólica dependente de P-450, com duas constituições genótípicas no que se refere aos genes marcadores localizados no cromossomo 3:

- (i) larvas *mwh + / + flr<sup>3</sup>* - que são trans-heterozigotas para os marcadores recessivos *mwh* e *flr<sup>3</sup>*.
- (ii) larvas *mwh +/TM3, Ser* - heterozigotas para o cromossomo *TM3*, necessário para balancear o marcador *flr<sup>3</sup>*, já que este é letal em homozigose (Garcia-Bellido e Dapena, 1974). Os adultos heterozigotos para o cromossomo *TM3* apresentam recortes nas asas - determinados pelo gene marcador *Ser* - o que permite diferenciá-los dos imagos trans-heterozigotos que apresentam asas com formato normal.



### 3.3.3. TRATAMENTOS

Os cruzamentos foram realizados em massa (80 fêmeas:40 machos), durante três dias, em vidros contendo meio de cultura padrão. Após este período, os casais foram transferidos para tubos de 1/8 l contendo meio de ovoposição, onde permaneceram por 8 h. Passado este tempo, os adultos foram descartados. Depois de 48 h do início do período de ovoposição, foram coletadas larvas de 2º estágio, por flotação em água destilada. Estas larvas foram, então, colocadas em frascos de 1/36 l (aproximadamente 50 por tubo) contendo 1,5 g de meio sintético, onde foram acrescentados 5 ml das seguintes soluções de tratamento:

- (i) tampão fosfato (controle negativo),
- (ii) AT (10 e 20 mM),
- (iii) MMS (0,3 e 1,25mM) ou MMC (0,025 e 0,1 mM) (controles positivos) e
- (iv) combinação entre MMS (0,3 e 1,25 mM) ou MMC (0,025 e 0,1 mM) com duas diferentes concentrações de AT (10 e 20 mM) - caracterizando os co-tratamentos.

As larvas ficaram em tratamento por cerca de 72 h (tratamento crônico), ou seja, até atingirem o estágio de pupa. Através deste procedimento experimental, as células dos discos imaginais, que irão originar as asas dos adultos, permaneceram expostas às diferentes soluções, por um período que corresponde a 95% de todas as divisões celulares que ocorrem desde o desenvolvimento do embrião até o início da pupação (Frei et al., 1992) (Esquema 4).

Todos os adultos, que nasceram 10-12 dias após a postura dos ovos, foram conservados em etanol 70%. As culturas de *D. melanogaster* permaneceram à temperatura de 25° C e à umidade de 60-70%.

### 3.3.4. MONTAGEM DAS ASAS

Somente as asas dos indivíduos trans-heterozigotos foram submetidas a montagem em lâminas. Para tanto, os adultos portadores deste genótipo foram lavados em água corrente e, posteriormente, colocados em solução de FAURE (30 g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato de cloral, 50 ml de água). Com o auxílio de duas pinças de relojoeiro, as asas dos indivíduos trans-heterozigotos foram separadas do corpo e distendidas sobre a superfície de lâminas de vidro. As lâminas, contendo 10 asas de fêmeas e 10 de machos, permaneceram a 40° C



por um período mínimo de 24 h. Em seguida, foram cobertas com lamínulas (24 X 32 mm) contendo uma gota de solução de FAURE, sendo, então, mantidas por mais 24 h à temperatura de 40° C. Durante este período, cubos de metal com peso total de 400 g foram colocados sobre as lamínulas, para garantir a perfeita aderência das asas às lâminas (Graf et al., 1984).

### 3.3.5. ANÁLISE MICROSCÓPICA

Foram analisadas as asas, de no mínimo 10 indivíduos de cada sexo - por ponto de tratamento - em microscópio com aumento de 400X, onde foram observados os fenótipos dos pêlos ou tricomas existentes nas superfícies dorsal e ventral das asas.

Estes pêlos originaram-se dos discos imaginais das asas de larvas de 2° estágio, que foram expostas aos diferentes tratamentos. A ocorrência - ao longo do desenvolvimento larval - de alterações no material genético destas células, leva ao aparecimento, nas asas dos adultos, de manchas com os fenótipos pêlos múltiplos e/ou pêlos com a base alargada - refletindo a expressão dos marcadores genéticos, representados pelos genes recessivos *mwh* e/ou *flr<sup>3</sup>*, respectivamente.

Os diferentes tipos de manchas foram designados como simples *mwh* ou *flr<sup>3</sup>*, quando apenas um dos marcadores se expressou, ou como manchas gêmeas, quando tanto pêlos múltiplos (*mwh*), como pêlos com a base alargada (*flr<sup>3</sup>*) estavam presentes dentro de uma mesma mancha. Foram considerados clones independentes, aqueles separados por 3 ou mais fileiras de tricomas normais (Graf et al., 1984) (Esquema 5).

Foram analisados somente os compartimentos distais das asas, onde se determinou a posição e o tamanho das manchas, de acordo com o setor da asa e o número de células com os fenótipos mutantes (Garcia-Bellido et al., 1976). Conforme o tamanho, as manchas simples foram divididas em diferentes classes: 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, -64, -128, -256, -512, -1024, >1024. As duas primeiras classes representam manchas pequenas e as demais, manchas grandes.

### 3.3.6. BASES GENÉTICAS

Através da análise dos tricomas presentes nas asas dos adultos trans-heterozigotos são



detectadas manchas simples (pequenas e grandes) e/ou gêmeas, que refletem a ocorrência de eventos genéticos específicos.

Assim, as manchas simples, com os fenótipos pêlos múltiplos ou pêlos com a base alargada, podem se originar por:

- (i) alteração no conteúdo informacional dos genes selvagens  $mwh^+$  ou  $flr^{3+}$ ;
- (ii) deleção de um fragmento cromossômico contendo os marcadores selvagens  $mwh^+$  ou  $flr^{3+}$ ;
- (iii) conversão gênica nos genes  $mwh^+$  ou  $flr^{3+}$ ;

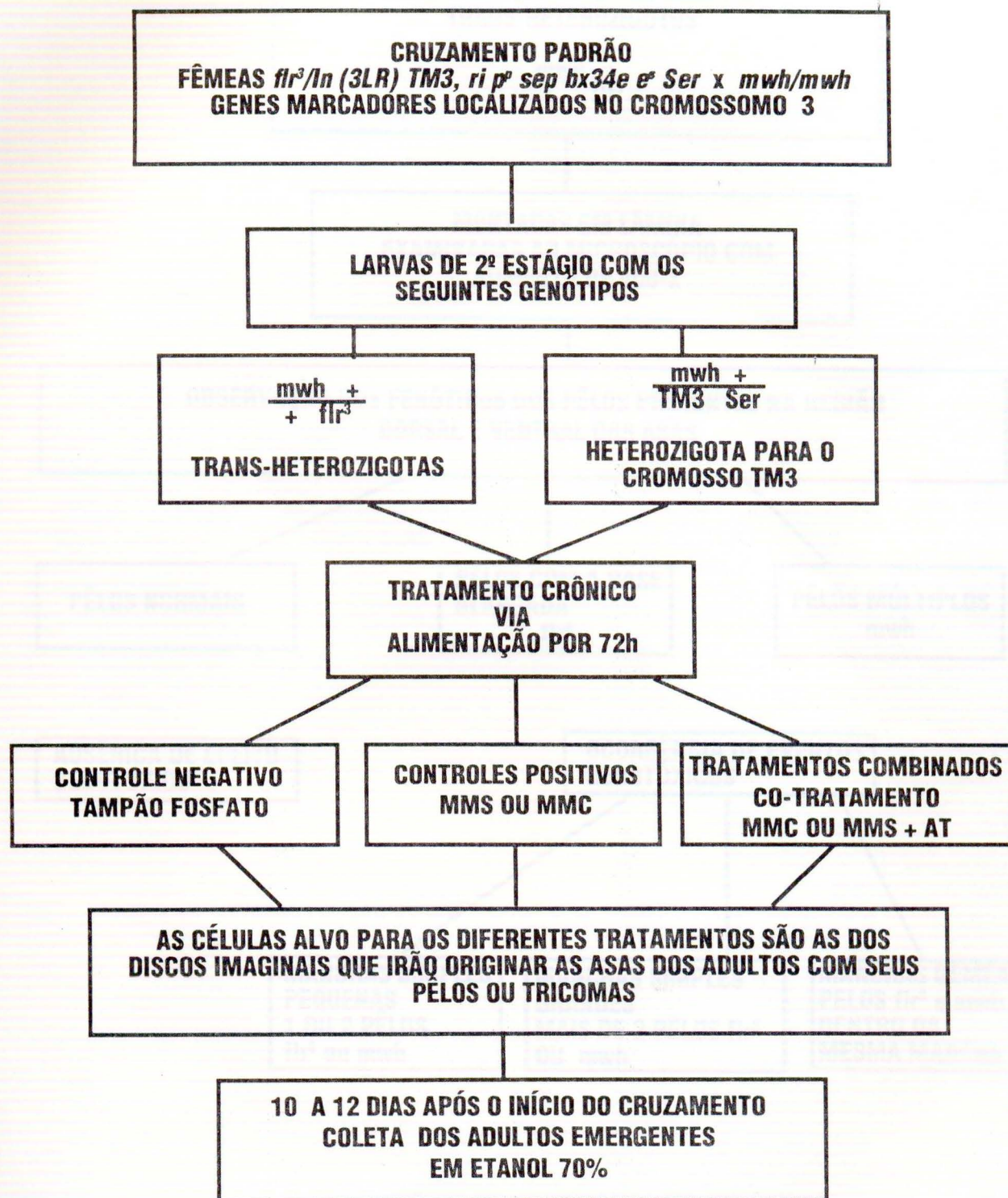
Adicionalmente, a ocorrência de: (i) uma recombinação simples entre os locos  $mwh$  e  $flr^3$  leva ao aparecimento de manchas simples com o fenótipo pêlos múltiplos; (ii) uma recombinação simples entre  $flr^3$  e o centrômero, seguida de uma segunda recombinação simples entre  $mwh$  e  $flr^3$  origina pêlos com a base alargada.

Desta forma, as manchas simples podem ser originadas tanto por eventos mutacionais, incluindo mutações pontuais e aberrações cromossômicas, como por conversão ou recombinação mitótica.

Por outro lado, as manchas gêmeas, que expressam simultaneamente os fenótipos pêlos com a base alargada e pêlos múltiplos, originam-se exclusivamente de uma recombinação simples entre  $flr^3$  e o centrômero, com posterior segregação de um cromossomo recombinado e um parental (Esquema 6).

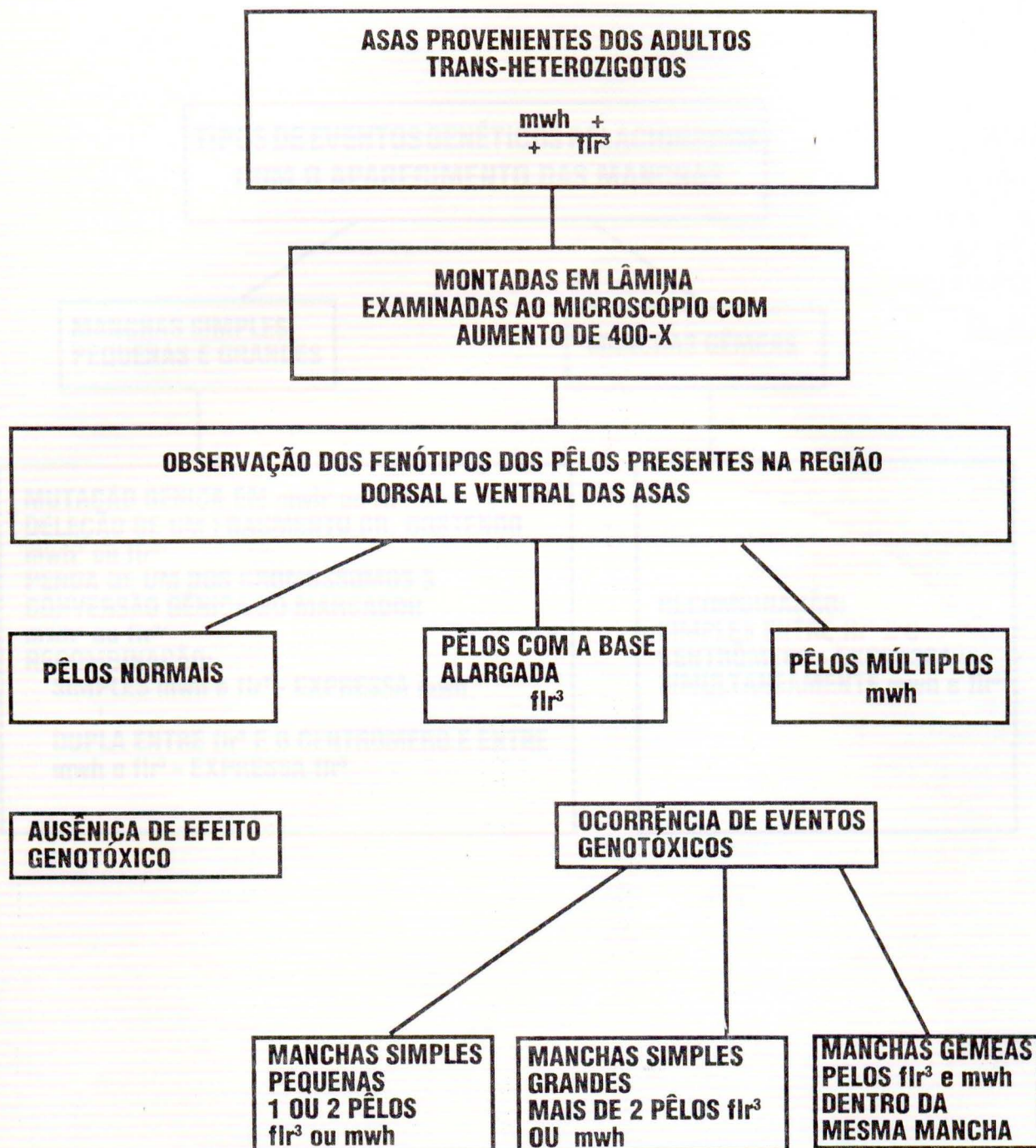


## ESQUEMA 4



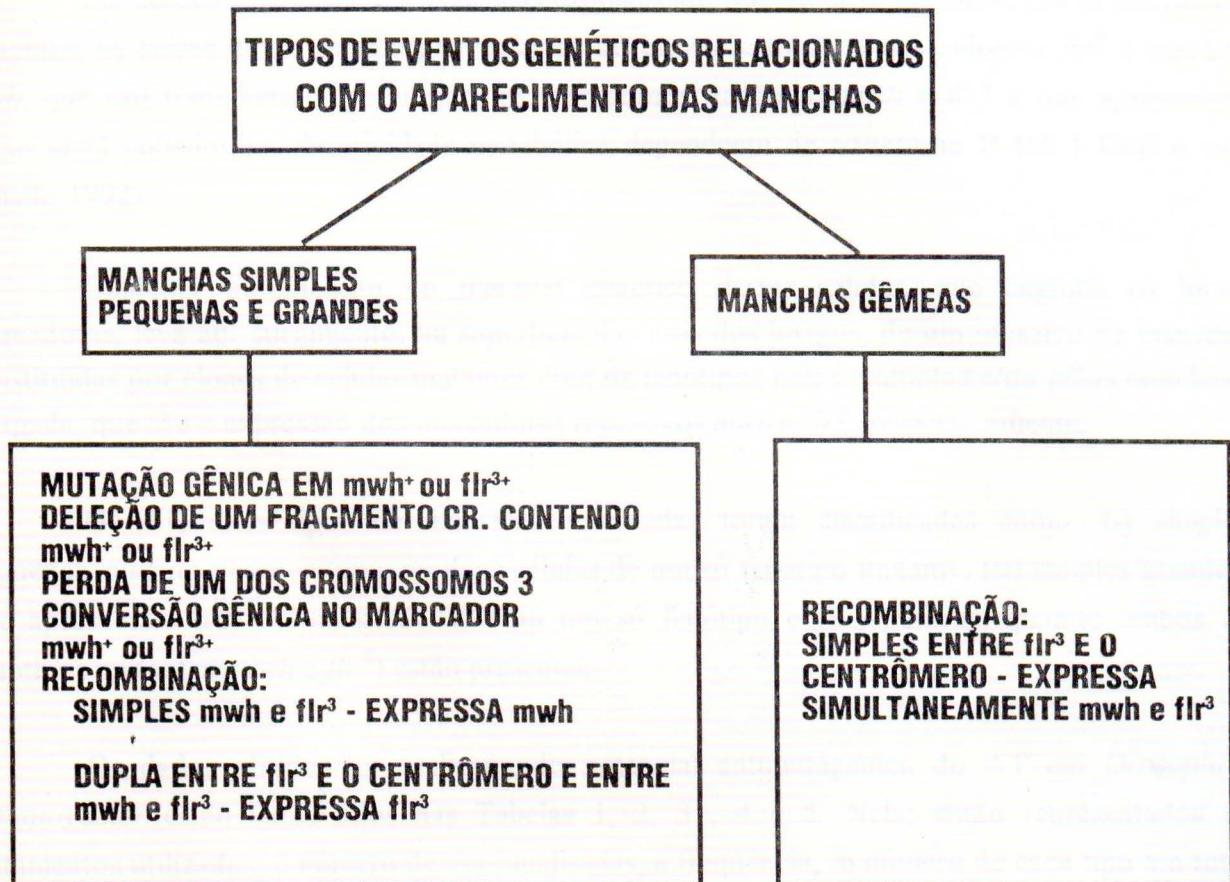


ESQUEMA 5





## ESQUEMA 6





#### 4. RESULTADOS

Em nossos experimentos, as células expostas aos diferentes tratamentos são as dos discos imaginiais de larvas de 2º estágio provenientes do cruzamento de fêmeas virgens *flr<sup>3</sup>* e machos *mwh*, que são trans-heterozigotas para os marcadores genéticos *mwh* e *flr<sup>3</sup>* e que apresentam baixo nível constitutivo de atividade metabólica dependente de citocromo P-450 ( Graf e van Schaik, 1992).

Qualquer modificação no material genético destas células, que englobe os locos marcadores, leva ao surgimento, na superfície das asas dos imagos, de um mosaico de manchas constituídas por clones de células mutantes com os fenótipos pêlos múltiplos e/ou pêlos com base alargada, que são a expressão dos marcadores recessivos *mwh* e *flr<sup>3</sup>*, respectivamente.

Os diferentes tipos de manchas observadas foram classificadas como: (i) simples pequenas, quando possuem uma ou duas células de um só fenótipo mutante; (ii) simples grandes, que apresentam três ou mais células com um só fenótipo e (iii) gêmeas, quando ambos os fenótipos mutantes (*mwh* e *flr<sup>3</sup>*) estão presentes.

Os dados obtidos na avaliação do potencial antimutagênico do AT em *Drosophila melanogaster* estão sumariados nas Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5. Nelas estão representados os tratamentos utilizados, o número de asas analisadas, a frequência, o número de cada tipo e o total de manchas observadas, juntamente com o diagnóstico estatístico. Os dados foram estatisticamente analisados através de testes de qui-quadrado para proporções, bicaudal, com os níveis de significância  $\alpha=\beta=0,05$ . Para a avaliação dos resultados foi utilizado o procedimento de decisão múltipla descrito por Frei e Würigler (1988), que permite distinguir entre quatro tipos diferentes de resultados: positivo, fraco positivo, negativo e inconclusivo.

A Tabela 1 descreve os dados obtidos nos experimentos que investigaram o efeito do AT sobre as lesões que ocorrem espontaneamente em células somáticas de *D. melanogaster*. Foram analisadas um total de 120 asas, em 3 experimentos que incluíram o controle negativo e duas concentrações de AT (10 e 20 mM).



**Tabela 1**

Efeito do AT sobre as lesões espontâneas que ocorrem em células somáticas de larvas de *D. melanogaster*.

Tratamento (mM)	Nº de asas analisadas	Manchas/Asa, (nº de manchas), Diagnóstico estatístico <sup>a</sup>			
		Manchas simples pequenas (1-2 células) d = 2,00	Manchas simples grandes (>2 células) d = 5,00	Manchas gêmeas d = 5,00	Total de manchas d = 2,00
Contr. Neg.	40	0,375(15)	0,025(1)	0	0,400(16)
AT, 10	40	0,325(13)-	0,075(3)i	0	0,400(16)-
AT, 20	40	0,300(12)-	0,025(1)-	0,025(1)-	0,350(14)-

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico, segundo Frei e Würigler (1988), para comparação com o controle positivo: -, negativo; i, inconclusivo. d, fator divisor para a determinação da significância dos resultados negativos. Testes de  $\chi^2$  para proporções, bicaudal. Níveis de probabilidade:  $\alpha = \beta = 0,05$ .

A análise estatística dos dados, que foi realizada através da comparação das séries tratadas com o controle negativo, mostrou que o AT não modificou a frequência, tanto de manchas simples (pequenas ou grandes), quanto de manchas gêmeas, o mesmo acontecendo em relação ao total de manchas. Esses resultados demonstraram que o AT não foi capaz de atuar como um antimutagênico em relação a eventos espontâneos relacionados com mutação gênica, deleção, não-disjunção, conversão gênica e recombinação mitótica em células somáticas de *D. melanogaster* com baixo nível de atividade de metabolização.

Nas Tabelas 2 e 3 estão sumariados os resultados referentes a ação do AT sobre a atividade citotóxica e genotóxica do agente alquilante bifuncional MMC. Foram efetuados dois experimentos, incluindo o controle negativo, o controle positivo (MMC 0,1 e 0,025 mM) e dois tratamentos combinados de MMC (0,1 e 0,025 mM) mais AT (10 e 20 mM).

A Tabela 2 fornece informações sobre o número total de larvas submetidas aos diferentes tratamentos, bem como o número de adultos sobreviventes (machos e fêmeas), classificados como sendo trans-heterozigotos ou heterozigotos para o cromossomo balanceador TM3. Adicionalmente, apresenta o número total de imagos e as percentagens de adultos sobreviventes observadas nos vários tratamentos efetuados. Como pode ser visto, a dose de 0,1 mM de MMC causou uma mortalidade larval de 100%. Entretanto, quando esta mesma concentração de MMC



foi combinada com AT (10 e 20 mM) observou-se uma sobrevivência das larvas tratadas da ordem de 94,5 e 84,5%, respectivamente. Assim, o conjunto destes resultados inviabilizou a comparação do número de manchas mutantes presentes nos tratamentos combinados (MMC + AT) com o controle positivo. Apesar disto, a sobrevivência das larvas e o seu desenvolvimento normal até o estágio adulto, observado nos tratamentos combinados, são um indicativo de que o AT está exercendo um efeito protetor sobre a atividade citotóxica da MMC.

**Tabela 2**

Efeito do AT sobre a sobrevivência de larvas de 2º estágio de *D. melanogaster* trans-heterozigotas (*mwh+/+flr<sup>3</sup>*) e heterozigotas para inversão (*mwh/TM3*) após o co-tratamento; MMC (0,1mM) + AT (10 ou 20 mM).

Tratamento MMC/AT (mM)	Nº larvas tratadas	Nº de adultos sobreviventes				Total de adultos sobreviventes	Porcentagem de sobrevi- ventes <sup>a</sup>
		<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>		<i>mwh/TM3</i>			
		Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos		
Contr. Neg.	100	24	24	22	26	96	96
0,1	200	0	0	0	0	0	0
0,1 + 10	200	30	47	43	69	189	94,50
0,1 + 20	200	36	35	56	41	168	84,50

A Tabela 3 contém dados relativos a atividade moduladora do AT sobre a genotoxicidade da MMC na dose de 0,25 mM. Em cada tratamento foram analisadas 40 asas, num total de 160 asas. A comparação dos dados obtidos nas séries tratadas em relação ao controle positivo (MMC) mostrou, através da análise estatística utilizada, que o co-tratamento com AT diminuiu significativamente a indução dos três tipos de manchas avaliadas e, conseqüentemente, o número total de manchas. Estes resultados demonstram que o AT exerce uma ação antimutagênica em relação à indução de todos os eventos genéticos, relacionados com o aparecimento de pêlos mutantes: mutação gênica, quebras cromossômicas e de eventos ligados a recombinação e não disjunção mitótica, em células somáticas de *D. melanogaster*.



**Tabela 3**

Efeito desmutagênico do AT sobre a atividade genotóxica induzida pela MMC (0,025 mM) em células somáticas de *D. melanogaster*.

Tratamento MMC/AT (mM)	Nº de asas analisadas	Manchas/Asa, (nº de manchas), Diagnóstico estatístico <sup>a</sup>			
		Manchas simples pequenas (1-2 células) d = 2,00	Manchas simples grandes (>2 células) d = 5,00	Manchas gêmeas d = 5,00	Total de manchas d = 2,00
0.	40	0,125(5)	0,025(1)	0,075(3)	0,225(9)
0,025	40	0,675(27)	0,975(39)	0,275(11)	1,925(77)
0,025 + 10	40	0,400(16)+	0,400(16)f+	0,050(2)+	0,850(34)+
0,025 + 20	40	0,200(8)+	0,125(5)+	0,000(0)+	0,325(13)f+

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico, segundo Frei e Würigler (1988), para comparação com o controle positivo: -, positivo: +, positivo; f+, fraco positivo. d, fator divisor para a determinação da significância dos resultados negativos. Testes de  $\chi^2$  para proporções, bicaudal. Níveis de probabilidade:  $\alpha = \beta = 0,05$ .

Nas Tabelas 4 e 5 estão representados os dados referentes à ação do AT sobre a mutagênese e/ou recombinogênese induzida pelo MMS, um alquilante monofuncional, em células somáticas de *D. melanogaster*.

A Tabela 4 descreve os resultados obtidos nos co-tratamentos combinados de duas concentrações de AT (10 e 20 mM) com a concentração de 0,3 mM de MMS. Foi observado, que o tratamento combinado com AT, comparado com o controle positivo, reduziu significativamente a frequência de manchas simples pequenas e do total de manchas, nas duas concentrações utilizadas. No entanto, na dose de 10 mM, este composto também reduziu a incidência de manchas simples grandes, não tendo efeito sobre as manchas gêmeas. O contrário ocorreu quando utilizamos uma concentração maior de AT (20 mM), uma vez que esta substância apresentou uma atividade protetora em relação as manchas gêmeas, mas nenhuma ação sobre as manchas simples grandes.



**Tabela 4**

Efeito desmutagênico do AT sobre a atividade genotóxica induzida pelo MMS (0,3 mM) em células somáticas de *D. melanogaster*.

Tratamento MMS/AT (mM)	Nº de asas analisadas	Manchas/Asa, (nº de manchas), Diagnóstico estatístico <sup>a</sup>			
		Manchas simples pequenas (1-2 células) d = 2,00	Manchas simples grandes (>2 células) d = 5,00	Manchas gêmeas d = 5,00	Total de manchas d = 2,00
0	40	0,125(5)	0,05(2)	0,025(1)	0,200(8)
0,3	40	1,375(55)	2,025(81)	0,675(27)	4,075(163)
0,3 + 10	40	0,500(20)+	1,450(58)f+	0,550(22)-	2,500(100)+
0,3 + 20	40	0,400(16)+	1,525(61)-	0,100(4)+	2,025(81)+

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico, segundo Frei e Würigler (1988), para comparação com o controle positivo: -, positivo; -, negativo; +f, fraco positivo. d, fator divisor para a determinação da significância dos resultados negativos. Testes de  $\chi^2$  para proporções, bicaudal. Níveis de probabilidade:  $\alpha = \beta = 0,05$ .

Por outro lado, quando se utilizou uma dose maior (1,25 mM) de MMS (Tabela 5), verificamos que o AT não apresentou nenhum resultado significativo em relação a redução da frequência de qualquer um dos tipos de manchas, a não ser na concentração de 20mM onde este composto mostrou um resultado fraco positivo no que se refere ao total de manchas.

**Tabela 5**

Efeito desmutagênico do AT sobre a atividade genotóxica induzida para MMS (1,25 mM) em células somáticas de *D. melanogaster*.

Tratamento MMS/AT (mM)	Nº de asas analisadas	Manchas/Asa, (nº de manchas), Diagnóstico estatístico <sup>a</sup>			
		Manchas simples pequenas (1-2 células) d = 2,00	Manchas simples grandes (>2 células) d = 5,00	Manchas gêmeas d = 5,00	Total de manchas d = 2,00
0	40	0,125(5)	0,05(2)	0,025(1)	0,200(8)
1,25	40	1,025(41)	2,225(89)	0,450(18)	3,700(148)
1,25 + 10	40	0,700(28)i	2,20(88)-	0,200(8)i	3,100(124)-
1,25 + 20	40	0,650(26)i	1,700(68)-	0,225(9)-	2,575(103)f+

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico, segundo Frei e Würigler (1988), para comparação com o controle positivo: -, positivo: ft+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo. d, fator divisor para a determinação da significância dos resultados negativos. Testes de  $\chi^2$  para proporções, bicaudal. Níveis de probabilidade:  $\alpha = \beta = 0,05$ .



Os dados apresentados em cada uma das Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5 representam o somatório dos resultados obtidos em dois ou mais experimentos independentes, que mostraram ser similares quando comparados por qui-quadrado.



## 5. DISCUSSÃO

Uma série de evidências experimentais, acumuladas a partir da década de 1980, tem evidenciado que o AT é capaz de modular o efeito genotóxico e/ou carcinogênico de uma série de agentes mutagênicos químicos e físicos (Stich et al., 1982; Huang et al., 1985).

Na verdade, este composto fenólico é capaz de interferir sobre muitas das diferentes etapas que antecedem a fixação das lesões genéticas responsáveis pelo aparecimento de eventos como mutação, aberração cromossômica e/ou recombinação mitótica. Estes efeitos moduladores podem ser realizados via ação desmutagênica e/ou bioantimutagênica.

No que se refere às potencialidades do AT como um agente desmutagênico, a maioria dos resultados foram obtidos em ensaios genéticos que empregaram bactérias e culturas de células de mamíferos. Estas abordagens demonstraram que o AT é capaz de exercer a sua atividade moduladora por: (i) inativação exógena da substância genotóxica; (ii) prevenção da formação de metabólitos mutagênicos a partir de precursores químicos (Mirvish, 1975; Stich et al., 1982; Wood et al., 1982; Huang et al., 1983, 1985; Das et al., 1987a, 1987b; Athar et al., 1989); (iii) inibição da reação do mutagênico com o DNA por competir ou reagir com os sítios alvo (Coney, 1982; Das et al., 1987).

Considerando estes achados, nós investigamos o possível efeito desmutagênico do AT em células somáticas de *D. melanogaster*, através da determinação do potencial modulador do AT sobre as lesões que ocorrem espontaneamente e sobre os efeitos genotóxicos dos agentes alquilantes: monofuncional MMS e bifuncional MMC.

No que se refere à ação antimutagênica do AT sobre as lesões espontâneas, o presente estudo evidenciou que em *D. melanogaster* o tratamento crônico - de larvas trans-heterozigotas em 2º estágio larval - com duas diferentes concentrações deste composto fenólico, não alterou a expressão dos eventos genéticos espontâneos relacionados com mutação, aberrações cromossômicas e/ou recombinação mitótica. Esta afirmativa está baseada nos resultados experimentais obtidos em três abordagens independentes, as quais não detectaram nenhuma



diferença estatisticamente significativa, entre os tratamentos com AT e o controle negativo, no que se refere tanto as freqüências de manchas simples (pequenas e grandes) e gêmeas, como as freqüências totais de manchas (Tabela 1).

Estes resultados são confirmados por diversos estudos relacionados à ação desmutagênica do AT, que não observaram nenhum efeito deste composto sobre a ocorrência de lesões genéticas espontâneas. Adicionalmente, o nosso grupo de trabalho, estudando a possível ação bioantimutagênica do AT em células sexuais de *D. melanogaster*, obteve resultados que indicam a ausência de efeito anticlastogênico do AT sobre a perda completa de cromossomo X em anel que ocorre espontaneamente em espermatozóides (Cunha et al., 1993).

A metodologia mais simples, utilizada na avaliação do modo de ação de um agente antimutagênico, baseia-se na variação do tipo de tratamento, envolvendo o agente modulador e o mutagênico. Desta forma, a exposição das células alvo aos moduladores pode tanto preceder, coexistir ou seguir a exposição à substância genotóxica - caracterizando, respectivamente, os pré-, co- e pós-tratamentos. O pré-tratamento possibilita a investigação de reações intracelulares do modulador, ou de seus derivados, com o composto mutagênico. Já o co-tratamento permite investigar as possíveis reações que ocorrem entre o modulador e o mutagênico, a nível extracelular. Desta forma os pré- ou co-tratamentos fornecem resultados sobre moduladores que atuam como desmutagênicos intra ou extracelulares. Ao contrário, quando o composto genotóxico já está incorporado à célula, tendo iniciado, portanto, a indução das lesões no DNA, o pós-tratamento com o modulador pode revelar os seus efeitos sobre os processos de reparação do DNA (De Flora et al., 1992). Estes agentes inibidores são, então, classificados como bioantimutagênicos de acordo com Kada et al. (1982).

Na busca da identificação do AT como um agente desmutagênico extracelular, empregamos o sistema de co-tratamento, combinando duas diferentes concentrações de MMS ou MMC com duas doses de AT.

Num primeiro momento, tentamos avaliar a resposta das células somáticas de *Drosophila melanogaster* expostas a: MMC (0,1 e 0,025 mM) - controles positivos; e co-tratadas - tratamentos combinados de MMC mais AT. No entanto, a ausência de sobreviventes no controle positivo, que utilizou a dose de 0,1 mM de MMC, inviabilizou a diagnose da atividade moduladora do AT -no que se refere à ação genotóxica da MMC. Apesar disto, observamos que



os tratamentos, combinando 0,1 mM de MMC mais AT (10 ou 20 mM), conduziram a uma percentagem de sobrevivência larva-adulto, que alcançou valores iguais ou próximos aos do controle negativo. Estes resultados são indicativos da interferência do AT sobre a ação citotóxica da MMC (Tabela 2).

Por outro lado, quando comparamos os resultados obtidos no controle positivo, que utilizou a MMC na concentração de 0,025 mM, com aqueles observados após o co-tratamento MMC mais AT, verificamos que este composto fenólico causou uma diminuição estatisticamente significativa sobre todos os tipos de manchas analisadas pelo teste SMART - e que refletem a atividade genotóxica da MMC (Tabela 3).

Assim, o conjunto destes resultados, evidencia que o AT é capaz de exercer um efeito desmutagênico extracelular que se reflete, tanto sobre a ação citotóxica (Tabela 2), como sobre a atividade genotóxica da MMC (Tabela 3).

O nosso trabalho investigou, também, a ação moduladora do AT sobre duas diferentes concentrações do mutagênico químico MMS. Na concentração de 0,3 mM de MMS observou-se uma diminuição, estatisticamente significativa, na indução de manchas simples pequenas, bem como no número de manchas totais em ambos os co-tratamentos que combinaram o MMS com duas doses de AT (10 e 20 mM). Ainda que a resposta das manchas simples grandes e gêmeas tenha apresentado resultados negativos e/ou positivos, o conjunto de nossas observações é indicativo de que o AT esteja atuando extracelularmente por reagir com os sítios ativos do MMS - e, assim, diminuindo a sua ação genotóxica, especialmente no que se refere aos eventos relacionados com mutação gênica e aberrações cromossômicas (Tabela 4).

Adicionalmente, a resposta observada, quando o MMS (1,25 mM) foi utilizado em uma dose quatro vezes superior a anteriormente mencionada (MMS, 0,3 mM), demonstra que a ação moduladora do AT é dependente de uma relação direta dose-efeito -isto é, dose do mutagênico (MMS) e concentração do modulador (AT). Esta afirmativa está fundamentada nos resultados apresentados na Tabela 5, onde observa-se que os decréscimos nas frequências dos diferentes tipos de pêlos mutantes analisados nos co-tratamentos não são estatisticamente conclusivos quando comparados com o controle positivo. Os resultados inconclusivos, ou fracamente positivos - no que se refere ao número total de manchas no co-tratamento com a dose de 20 mM de AT - significam que, apesar do AT ter influenciado a atividade genotóxica do MMS, esta ação moduladora não foi capaz de reduzir os eventos genotóxicos a valores duas ou cinco vezes



menores que os previamente estabelecidos pela nossa análise estatística. Assim, em doses altas de MMS as concentrações de AT empregadas não foram suficientes para interagir com todas as moléculas do agente mutagênico, permitindo que este reaja com o DNA das células alvo, induzindo tanto lesões mutagênicas quanto recombinogênicas.

Na verdade, de acordo com a classificação proposta por De Flora e Ramel (1988) os inibidores da mutagênese com atividade extracelular podem atuar via: (i) inibição da captação ou da formação endógena dos mutagênicos; (ii) desativação dos mutagênicos. Considerando que ambos os agentes genotóxicos utilizados em nossos experimentos são mutagênicos químicos de ação direta, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a ação moduladora do AT está relacionada com a sua interação com os sítios reativos da MMC ou do MMS, impedindo que eles reajam com o DNA dos tecidos alvo.

A atividade desmutagênica do AT é preferencialmente exercida sobre mutagênicos de ação indireta, que requerem ativação metabólica para exercer o seu efeito. No que se refere aos pró-mutagênicos metiluréia (MU), benzo[a]pireno (B[a]P) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), o AT é capaz de suprimir a indução de mutação em *Salmonella typhimurium* e de aberrações cromossômicas em camundongos, bem como a formação de tumores malignos em roedores. Esta atividade moduladora é realizada por dois mecanismos distintos relacionados com (i) o bloqueio do metabolismo destes compostos, através da inibição das reações enzimáticas mediadas pela enzima citocromo P-450 ou (ii) a interação com os metabólitos carcinogênicos e/ou mutagênicos, impedindo a sua reação com o DNA dos tecidos alvo (Conney, 1982; Stich et al., 1982; Huang et al., 1985; Das et al., 1987a, 1987b; Bik et al., 1988; Khan et al., 1988; Mukhtar, 1988; Athar et al., 1989).

Ainda que tenhamos demonstrado que o AT, utilizado em nossos experimentos, apresenta atividade desmutagênica sobre os agentes genotóxicos MMC e MMS - o que caracterizaria o seu efeito protetor e permitiria o seu emprego na melhoria das condições da saúde humana - algumas considerações adicionais devem ser avaliadas. Em primeiro lugar, o nosso grupo de trabalho demonstrou que, variando a metodologia de tratamento e o tipo de célula alvo - isto é, utilizando o AT como pós-tratamento e analisando a perda de cromossomo X em anel em células sexuais de *D. melanogaster* - o AT exerceu um potente efeito amplificador sobre as lesões induzidas pela MMC no DNA dos espermatozóides. Esta atividade co-clastogênica está diretamente relacionada com a ação deste composto sobre a atividade de incisão mediada pelos



genes do tipo *uvr ABC* (Cunha et al., 1993). Tal afirmativa baseou-se em uma série de trabalhos que demonstraram que o AT é capaz de estimular a primeira etapa do processo de reparação por excisão-ressíntese - tanto em bactérias como em células de mamífero *in vitro* e *in vivo* (Shimoi et al., 1985; Sasaki et al., 1988, 1990). Em segundo lugar, em outro estudo, também realizado em nosso laboratório, foi avaliada a atividade mutagênica e/ou clastogênica do AT em células sexuais masculinas de *D. melanogaster* - com e sem enzimas de ativação metabólica. Esta investigação demonstrou que o AT não exerceu nenhum efeito direto ou indireto sobre a indução, desde trocas de bases até efeitos associados com aberrações cromossômicas numéricas e estruturais. Adicionalmente, a análise da atividade genotóxica do AT em células somáticas de *D. melanogaster*, através do teste SMART, permitiu concluir que o AT não foi efetivo no que se refere à indução de eventos do tipo mutação e/ou recombinação somática (Cunha, 1993).

De fato, o AT têm sido objeto de uma série de investigações experimentais que apresentam resultados contraditórios, uma vez que sua ação sobre o DNA celular estende-se desde atividade citotóxica, cirrogênica, genotóxica e carcinogênica *in vitro* e *in vivo*, até atividade antimutagênica - caracterizada pela diminuição das frequências de mutação gênica, aberrações cromossômicas e câncer, induzidas por uma série de agentes genotóxicos.

Trabalhos pioneiros, desenvolvidos a partir da década de 1940, demonstraram propriedades hepatotóxicas do AT, utilizando protocolos de tratamento prolongado via subcutânea, intraperitoneal e sangüínea em mamíferos (Wells et al., 1942; Baker e Handler, 1943; Cameron et al., 1943; Forbes e Evans, 1943; Korpássy e Kóvacs, 1949). Entretanto, esta atividade hepatotóxica não foi observada quando o AT foi administrado via alimentação (Handler e Baker, 1944).



As atividades carcinogênicas e cirrogênicas do AT foram demonstradas durante as décadas de 1950 e 1960. Korpássy e Mosonyi (1950) verificaram que o tratamento de ratos, via parenteral, com diferentes doses de AT induz ao aparecimento de cirrose e câncer de fígado. Sua atividade tumoral foi comparável ao efeito promotor de potentes agentes carcinogênicos. Todavia, este efeito restringe-se ao tratamento parenteral, uma vez que a administração via oral não induziu nenhum tipo lesão carcinogênica. Além disto, quando foram analisadas as potencialidades de extratos de taninos quanto a indução de tumores em ratos e camundongos, observou-se que os taninos hidrolisados, entre eles o AT, são capazes de induzir tumores hepáticos, bem como pequenos focos de metaplasia mielóide com hiperplasticidade da medula óssea (Kirby, 1960; Korpássy, 1961).

As evidências experimentais demonstrando a atividade mutagênica ou clastogênica do AT são bastante restritas. Dentro deste contexto, Stich e Dunn (1986) demonstraram que o AT é capaz de induzir aberrações cromatídicas, translocações e micronúcleos em células de mamíferos. Recentemente, Knasmüller et al. (1992) observaram que o AT é capaz de induzir lesões clastogênicas detectadas através de micronúcleos em *Tradescantia*. Um único trabalho, utilizando *D. melanogaster* relata que o tratamento de larvas - em diversos estágios de desenvolvimento - via alimentação com diferentes concentrações de AT induz mutações gênicas e deleções, bem como eventos recombinacionais mitóticos em células somáticas do olho (Szakmary e Knasmüller, 1991).

Esta aparente contradição, no que se refere à ação do AT sobre o DNA celular, começou a ser recentemente explicada por Makkar e Becker (1993). Estes autores testaram o AT proveniente de cinco diferentes fontes comerciais - Merck, Sigma, Aldrich, Fluka e Apin - com relação ao potencial redutor, complexação de metais e três ensaios de precipitação de proteínas. Os diversos ácidos tânicos comportaram-se diferentemente em relação às abordagens experimentais utilizadas, sugerindo que os ácidos tânicos provenientes dos diversos laboratórios apresentam diferentes proporções e tipos de núcleos de taninos - que alteram as propriedades físico-químicas dos preparados de AT, o que pode influenciar a sua resposta aos testes biológicos.

Cabe ainda ressaltar que os dados apresentados nesta dissertação, juntamente com os obtidos em nosso laboratório, referem-se a atividade do AT oriundo de uma mesma fonte de origem (Vetec Química Ltda.). Apesar disto ele pode atuar através de mecanismos múltiplos e,



dependendo da etapa em que interfere, os resultados podem ser contraditórios. Assim, o AT da Vetec pode exercer um efeito modulador, ser inefetivo ou co-mutagênico. Esta multiplicidade de resposta depende da metodologia de tratamento utilizada - dose e seqüência de administração - bem como do tipo de célula alvo e da lesão que está sendo analisada.

É, pois, importante ressaltar que a anticarcinogenicidade e antimutagenicidade do AT não deve ser generalizada, e que as suas propriedades benéficas devem ser reavaliadas à luz destes novos conhecimentos.



## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho nós investigamos o possível efeito desmutagênico do AT, através da utilização do teste para a detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. Foi investigado o potencial modulador deste composto fenólico sobre as lesões que ocorrem espontaneamente e sobre os efeitos genotóxicos dos agentes alquilantes: monofuncional MMS e bifuncional MMC. A nossa metodologia de trabalho empregou o sistema de co-tratamento, que permite obter resultados sobre agentes moduladores que atuam como desmutagênicos de ação extracelular. Esta avaliação demonstrou que:

(i) o AT não exerceu nenhum efeito protetor sobre as lesões espontâneas que conduzem a eventos genéticos relacionados com mutação gênica, aberração cromossômica e recombinação mitótica.

(ii) o AT causou uma diminuição estatisticamente significativa sobre o efeito genotóxico do MMS, especialmente no que se refere aos eventos relacionados com mutação gênica e aberrações cromossômicas. Entretanto, a ação moduladora do AT é dependente de uma relação direta entre dose do mutagênico (MMS) e concentração do modulador (AT).

(iii) o AT atuou como um modulador da atividade genotóxica da MMC (0,025 mM), reduzindo a indução de mutação, aberração cromossômica e recombinação mitótica. Adicionalmente, observamos que o AT é também capaz de interferir sobre o efeito citotóxico da MMC - expresso pela alta sobrevivência larva-adulto observada nos co-tratamentos em relação ao controle positivo (MMC, 0,1 mM).

Assim, o conjunto destes resultados evidencia que o AT é capaz de exercer um efeito desmutagênico extracelular que se reflete, tanto sobre a ação citotóxica da MMC, como sobre a atividade genotóxica da MMC e do MMS. Considerando que ambos os agentes genotóxicos, utilizados em nossos experimentos, são mutagênicos químicos de ação direta, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a ação moduladora do AT está relacionada com a sua interação com os sítios reativos da MMC ou do MMS, impedindo que eles reajam com o DNA das células dos discos imaginais, que irão originar as asas dos adultos com seus pêlos ou tricomas.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATHAR, M., W.A. KHAN & H. MUKHTAR, 1989. Effect of tannic acid on epidermal, lung and forestomach polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and tumorigenicity in Sencar mice. *Cancer Res.*, 49:5784-5788.
- BAKER, R.D. & P. HANDLER, 1943. Animal experiments with tannic acid. *Annals of Surgery*, 118:417-426.
- BICHEL, J. & A. BACH, 1968. Investigation on the toxicity of small chronic doses of tannic acid with special reference to possible carcinogenicity. *Acta Pharmacol.*, 26:41-45.
- BIK, D.P., M.DAS, W.A.KHAN, Z.Y.WANG, M.ATHAR, D.R.BICKERS & H.MUKHTAR, 1988. Protection against polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) - and N-methyl-N-nitrosourea (MNU) -induced skin tumorigenesis in mice by naturally occurring plant phenols. *FASEB Journal*, 2:A863.
- BOONE, C.W., G.J.KELLOFF & W.E.MALONE, 1990. Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. *Cancer Res.*, 50:2-9.
- BROWN, J.P., 1980. A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutation Res.*, 75:243-277.
- CAMERON, G.R., R.F.MILTON & J.W.ALLEN, 1943. Toxicity of tannic acid. An experimental investigation. *Lancet*, 2:179-186.
- CONNAY, A.H., 1982. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G.H.A. clowes memorial lecture. *Cancer Res.*, 42:4875-4917.



- COOPER, G.M., 1984. Activation of transforming genes in neoplasms. *Br. J. Cancer*, 50:137-142.
- CUNHA, K.S., 1983. Avaliação das potencialidades mutagênicas e bioclastogênicas do ácido tânico em células somáticas e/ou germinais de *Drosophila melanogaster*. Dissertação de Mestrado. UFRGS.
- CUNHA, K.S., M.L. REGULY, M.C. GIMMLER-LUZ, J.H. SANTOS, M. LEHMANN & H.H.R. ANDRADE, 1993. Co-mutagenic effect of tannic acid on ring-X chromosome less induced by mitomicin C in sperm cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* (in press).
- DAS, M., W.A.KHAN, P.ASOKAN, D.R.BICKERS & H.MUKHTAR, 1987a. Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in epidermis and lungs of SENCAR mice by naturally occurring plant phenols. *Cancer Res.*, 47:767-773.
- DAS, M., H.MUKHTAR, D.P.BIK & D.R.BICKERS, 1987b. Inhibition of epidermal xenobiotic metabolism in SENCAR mice by naturally occurring plant phenols. *Cancer Res.*, 47:000.
- DE FLORA, S., 1989. Role and mechanism of antimutagens and anticarcinogens. *Biol. Zent. Bl.*, 108:411-414.
- DE FLORA, S., C.BENNICELLI, P.ZANACCHI, F.D'AGOSTINI & A.CAMOIRANO, 1989. Mutagenicity of active oxygen species in bacteria and its enzymatic or chemical inhibition. *Mutation Res.*, 214:153-158.
- DE FLORA, S., A.CAMOIRANO, F.D'AGOSTINI & R.BALANSKY, 1992. Modulation of the mutagenic response in prokaryotes. *Mutation Res.*, 267:183-192.
- DE FLORA, S. & C.RAMEL, 1988. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. *Mutation Res.*, 202:285-306.
- DOLL, R. & R.PETO, 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.*, 66:1192-1265.



- ENOMOTO, M., 1987. Naturally occurring carcinogens of plant origin: tannins (tannic acid). *Bioact. Mol.*, 2:161-166.
- FORBES, J.C. & E.I.EVANS, 1943. Tannic acid and liver necrosis. *Surg. Gynec. Obstet.*, 76:612-613.
- FREI, H., J.LÜTHY, J.BRAUCHLI, U.ZWEIFEL, F.WÜRGLER & C. SCHLATTER, 1992. Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. *Chem. -Biol. Interactions*, 83:1-22.
- FREI, H. & F.E.WÜRGLER, 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Res.*, 203:297-308.
- GALI, H.U., E.M.PERCHELLET & J.P.PERCHELLET, 1991. Inhibition of tumor promoter-induced ornithine decarboxylase activity by tannic acid and other polyphenols in mouse epidermis *in vivo*. *Cancer Res.*, 51:2820-2825.
- GARCIA-BELLIDO, A. & J.DAPENA, 1974. Introduction, deletion and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila melanogaster*. *Molec. Gen. Genet.*, 128:117-130.
- GARCIA-BELLIDO, A., P.RIPOLL & G.MORATA, 1976. Developmental compartmentalization in the dorsal mesothoracic disc of *Drosophila*. *Dev. Biol.*, 48:132-147.
- GRAF, U. & N. VAN SCHAİK, 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 271:59-67.
- GRAF, U., F.E.WÜRGLER, A.J.KATZ, H.FREI, H.JUON, C.B.HALL & P.G.KALE, 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutag.*, 6:153-188.
- HANDLER, P. & R.D.BAKER, 1944. The toxicity of orally administered tannic acid. *Science*, 99:393.



- HARTMAN, P.E. & D.M.SHANKEL, 1990. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environ. and Molec. Mutag.*, 15:145-182.
- HARWORTH, R.D., 1961. Some problems in the chemistry of the gallotannins. *Proc. Chem. Soc.*, p.401-412.
- HIROSE, M. K.OZAKI, K.TAKABA, S.FUKUSHIMA, T.SHIRAI & N.ITO, 1991. Modifying effects of the naturally occurring antioxidants gamma-oryzanol, phytic acid, tannic acid and n-tritriacontane-16,18-dione in a rat wide-spectrum organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis*, 12:1917-1921.
- HUANG, M.T., R.L.CHANG, A.W.WOOD, H.L.NEWMARK, J.M.SAYER, H.YAGI, D.M.JERINA & A.H.CONNEY, 1985. Inhibition of the mutagenicity bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by tannic acid, hydroxylated anthraquinones and hydroxylated cinnamic acid derivatives. *Carcinogenesis*, 6:237-242.
- HUANG, M.T., A.W. WOOD, H.L. NEWMARK, J.M. SAYER, H. YAGI, D.M. JERINA & D.H. CONNEY, 1983. Inhibition of the mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons by phenolic plant flavonoids. *Carcinogenesis*, 4:1631-1637.
- IARC, 1976. Tannic acid and tannins. In: *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Some Naturally Occurring Substances*. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (eds.). IARC Sci. Publ., Lyon. vol.10, p.253-262.
- IMANISHI, H., Y.F.SASAKI, T.OHTA, M.WATANABE, T.KATO & Y.SHIRASU, 1991. Tea tannin components modify the induction of sister-chromatid exchanges and chromosome aberrations in mutagen-treated cultured mammalian cells and mice. *Mutation Res.*, 259:79-87.
- ITO, Y., S.OHNISHI & K.FUJIE, 1989. Chromosome aberrations induced by aflatoxin B1 in rat bone marrow cells *in vivo* and their suppression by green tea. *Mutation Res.*, 222:253-261.
- JAIN, A.K., K. SHIMOI, Y. NAKAMURA, T. KADA, Y. HARA & I. TOMITA, 1989. Crude



- tea extracts decrease the mutagenic activity of N-methyl-N-nitro-N-nitroguanidine *in vitro* and in intragastric tract of rats. *Mutation Res.*, 210:1-8.
- KADA, T., T.INOUE & M.MANIKI, 1982. Environmental desmutagens and antimutagens. In: *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*. KLEOKOWSKY, E.J. (ed.). Praeger, New York. p.113-152.
- KADA, T. & K. SHIMOI, 1988. Desmutagens and bio-antimutagens their modes of action. *Bio Essays*, 7:113-6.
- KHAN, W.A., Z.Y.WANG, M.ATHAR, D.R.BICKERS & H.MUKHTAR, 1988. Inhibition of the skin tumorigenicity of (+)-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo [a] pyrene by tannic acid, green tea polyphenols and quercetin in Sencar mice. *Cancer Letters*, 42:7-12.
- KIRBY, K.S., 1960. Induction of tumours by tannin extracts. *The British J. of Cancer*, 14:147-153.
- KNASMÜLLER, S., T. KIM, T. MA, 1992. Sinergistic effect between tannic acid and X-rays detected by the Tradescantia - micronucleus assay. *Mutation Res.*, 27:31-37.
- KORPÁSSY, B., 1961. Tannins as hepatic carcinogens. *Progr. Exp. Tumor Res.*, 2:245-290.
- KORPÁSSY, B. & K.KÓVACS, 1949. Experimental liver cirrhosis in rats produced by prolonged subcutaneous administration of solutions of tannic acid. *British J. of Experimental Pathology*, 30:266-272.
- KORPÁSSY, B. & M. MOSONYI, 1950. Liver tumours induced in rats by prolonged subcutaneous administration of tannic acid solutions. *Br. J. Cancer*, 4:41-420.
- LEE, W.R., S.ABRAHAMSON, R.VALENCIA, E.S.VONHALLE, F.E.WÜRGLER & S.ZIMMERING, 1983. The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency, Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 123:183-279.



- LINDSLEY, D.L. & E.H.GRELL, 1968. Genetic variation of *Drosophila melanogaster*. *Carnegie Inst. Wash. Publ.*, 627:472.
- LINDSLEY, D.L. & G.G.ZIMM, 1992. *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press. New York.
- MARQUES, E.K.; M.NAPP; H.WINGE & A.R.CORDEIRO, 1966. A corn meal, soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. *Drosophila Inform. Serv.*, 41:187.
- MAKKAR, H.P.S. & K. BECKER, 1993. Behaviour of tannic acid from various commercial sources towards redox, metal complexing and protein precipitation assays of tannins. *J. Sci. Food Agric.*, 62:295-299.
- MIRVISH, H., 1975. Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics and *in vivo* occurrence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 31:325-351.
- MUKHTAR, H. M.DAS, W.A.KHAN, Z.Y.WANG, D.P.BIK & D.R.BICKERS, 1988. Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-, benzo(a)pyrene-, 3-methylcholantrene- and N-methyl-N-nitrosurea-induced skin tumorigenesis in Mice. *Cancer Res.*, 48:2361-2365.
- RAMEL, C., U.K.ALEKPEROV, B.N.AMES, T.KADA & L.W.WATTENBERG, 1986. Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. *Mutation Res.*, 121:211-223.
- SASAKI, Y.F., H.IMANISHI, T.OHTA, M.WATANABE, K.MATSUMOTO & Y.SHIRASU, 1988. Suppressing effect of tannic acid on UV and chemically induced chromosome aberrations in cultured mammalian cells. *Agric. Biol. Chem.*, 52:2423-2428.
- SASAKI, Y.F., H.IMANISHI, T.OHTA, M.WATANABE, K.MATSUMOTO & Y.SHIRASU, 1989. Suppressing effect of tannic acid on the frequencies of mutagen-induced sister-chromatid exchanges in mammalian cells. *Mutation Res.*, 213:195-203.
- SASAKI, Y.F., K.MATSUMOTO, H.IMANISHI, M.WATANABE, T.OHTA, Y.SHIRASU



- K.TUTIKAWA, 1990. *In vivo* anticlastogenic and antimutagenic effects of tannic acid in mice. *Mutation Res.*, 244:43-47.
- SHIMOI, K., Y.NAKAMURA, I.TOMITA & T.KADA, 1985. Bioantimutagenic effects of tannic acid on UV and chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli* B/r. *Mutation Res.*, 149:17-23.
- SPANDIDOS, D.A. & N.M.WILKIE, 1984. Tumorigenic conversion of early-passage rodente cells can be achieved with a single activated human oncogens. *Cancer Cells*, 2:495-500.
- STICH, H.F. & B.P.DUNN, 1986. Relationship between cellular levels beta-carotene and sensitivity to genotoxic agents. *Int. J. Cancer*, 38:713-717.
- STICH, H.F., M.P.ROSIN & L.BRYSON, 1982. Inhibition of mutagenicity of a model nitrosation reaction by naturally occurring phenolics, coffee and tea. *Mutation Res.*, 95:119-128.
- SZAKMARY, A. & S.KNASMÜLLER, 1991. Effects of tannic acid on spontaneous and induced somatic mutations in *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, 6:225-228.
- VALENCIA, R., S.ABRAHAMSON, W.R.LEE, E.S.VONHALLE, R.C.WOODRUFF, F.E.WÜRGLER & S.ZIMMERING, 1984. Chromosome mutation tests for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 134:61-88.
- VAN DER EB, A.J., R.BERNARDS, P.I.SCHRIER, J.C.BOS, R.T.M.J.VAESSEN, A.G. JOCHEMSEN & C.J.M.MELIEF, 1984. Altered expression of cellular genes in adenovirus-transformed cells. *Cancer Cells*, 2:501-510.
- WATERS, M.D., A.L.BRADY, H.F.STACK & H.E.BROCKMAN, 1990. The concept of activity profiles of antimutagens. In: *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II*. I.KURODA, D.M.SHANKEL & M.D.WATERS (eds.). Plenum Press, New York. p.87-104.