

VALIAÇÃO COMPARATIVA DOS EFEITOS TÓXICO-GENÉTICOS DA PRÓPOLIS EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*, PORTADORAS DE DIFERENTES NÍVEIS DE ENZIMAS DE METABOLIZAÇÃO

IGOR GOMES DE OLIVEIRA

Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brasil.

KARLA DE CASTRO PEREIRA

Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brasil.

CAROLINA COSTA GUIMARÃES

Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brasil.

TORQUATO NAVES MORAES

Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brasil.

LEE CHEN CHEN

Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brasil.

KÊNYA SILVA CUNHA

Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brasil, E-mail: kenya@icb.ufg.br,

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade genotóxica e anticitotóxica da própolis sobre as lesões induzidas por mitomicina C (MMC) utilizando linhagens de *Drosophila melanogaster* portadoras de diferentes níveis de expressão de enzimas de metabolização do tipo citocromo P-450. Empregou-se o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação em Células Somáticas de asas de *D. melanogaster* (SMART), que fornece grande espectro de informações sobre a detecção de mutações gênicas, cromossômicas e/ou recombinações genéticas. Os resultados obtidos indicaram que a própolis atuou como modulador direto dos efeitos citotóxicos induzidos pela MMC. Além disso, demonstrou-se que a própolis não induziu eventos mutagênicos e/ou recombinogênicos em células somáticas de *D. melanogaster*. O conjunto de dados apresentados neste trabalho corrobora aqueles descritos na literatura, contribuindo para que se determine o nível de atividade protetora exercida pela própolis quando administrada juntamente com agentes genotóxicos que apresentam diferentes mecanismos de ação.

PALAVRAS-CHAVE: Anticiclotóxico, *Drosophila melanogaster*, mutagênese, própolis, teste SMART.

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the genotoxic and anti-cytotoxic activities of propolis on mitomycin C (MMC) induced lesions using *Drosophila melanogaster* strains with different cytochrome P-450 metabolic enzymes expression levels. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) was used and supplied a wide spectrum of information concerning genic and chromosomal mutations and/or genetic recombinations. The results indicated that propolis acted as a direct modulator on cytotoxic effects induced by MMC. Furthermore, it was demonstrated that propolis did not induce mutagenic and/or recombinagenic events in *D. melanogaster* somatic cells. The data showed in this paper corroborates the ones described in the literature, contributing to determine the protective activity of propolis when administrated with genotoxic agents presenting different mechanisms of action.

KEY WORDS: Anticytotoxic, *Drosophila melanogaster*, mutagenesis, propolis, SMART test.

INTRODUÇÃO

A própolis é um produto natural que atrai o interesse de muitos pesquisadores por apresentar efeitos antibacteriano, antiviral, antiinflamatório, imuno-estimulatório e por ser utilizada na medicina popular como tratamento de uma variedade de doenças humanas (Marcucci, 1995; Burdock, 1998; Clerice, 1999; Macedo, 1999; Mujaili, 1999). Essa mistura complexa é elaborada por abelhas a partir de resinas de brotos, exsudatos e outras partes do tecido vegetal. As principais substâncias químicas encontradas na própolis são o ácido benzóico e seus ésteres, os ácidos e ésteres fenólicos, carboidratos, ácidos graxos, ligninas, terpenos, álcoois terpênicos e pequenas quantidades de flavonóides e sua ação farmacológica deve-se, em grande parte, à presença dos ácidos fenólicos e seus derivados (Banskota et al., 1998).

Além desses efeitos, o extrato de própolis apresentou atividade antimutagênica quando avaliado através de testes com *Salmonella typhimurium* (TA98 e TA100) e *Allium cepa*, inibindo a ação mutagênica dos compostos isoquinilina e 4-nitro-o-fenilediamina (Moreno et al., 2005). A atividade antimutagênica da própolis, comprovada por Moreno et al. (2005) e reforçada por outros autores (Bazo et al., 2002; Fu et al., 2004; Orsolich et al., 2006), foi demonstrada por meio da ação direta do extrato. Um único trabalho utilizando linhagens de *Drosophila melanogaster* portadoras de alta ativação de enzimas de metabolização, desenvolvido por Valadares (2002), evidenciou atividade antirecombinogênica do extrato de própolis por intermédio do co-tratamento com doxorubicina. O autor demonstrou, ainda, que não houve diferença significativa entre a utilização de linhagens portadoras de níveis basais de metabolização e aquelas portadoras de altos níveis de atividade metabólica. Considerando esses resultados e os escassos dados encontrados na literatura (Moreno et al., 2005) relacionados com organismos portadores de alta atividade metabólica, a finalidade deste estudo foi avaliar comparativamente a ação genotóxica indireta da própolis e o seu potencial anticancerígeno relacionados com as possíveis lesões induzidas pela mitomicina C

(MMC). Para atingir esse objetivo, empregou-se o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação em Células Somáticas de *D. melanogaster* (SMART), que fornece um grande espectro de informações sobre a detecção de mutações gênicas, cromossômicas e/ou recombinações genéticas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 AGENTES QUÍMICOS

Foram utilizados os seguintes compostos: própolis (Polenectar) e mitocin[®] (Bristol - mitomicina C – MMC – CAS N. 50-07-7), Tween 80 e etanol. As diferentes soluções de tratamento foram preparadas no momento do uso por dissolução em água destilada. Os controles positivo e negativo foram, respectivamente, MMC e solvente (5% Tween/5% etanol).

2.2 TESTE DE MUTAÇÕES E RECOMBINAÇÕES EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* (SMART)

O teste SMART de asa baseia-se na identificação de pêlos com fenótipos mutantes que representam a expressão fenotípica da ocorrência de lesões em nível de DNA. Tais alterações são primordialmente induzidas nas células dos discos imaginais que, por inúmeras divisões mitóticas, darão origem às asas dos adultos com seus pêlos ou tricomas. Os tricomas mutantes organizam-se em manchas, com fenótipos característicos, que indicam a ocorrência de eventos genéticos relacionados com mutações pontuais, mutações cromossômicas e rearranjos estruturais devido à recombinação mitótica.

2.3 CRUZAMENTOS E TIPOS DE LARVAS

Foram utilizados os cruzamentos padrão (ST) e aprimorado (HB), no qual fêmeas virgens *flr³* (ST) ou *ORR;flr³* (HB) foram cruza-

das com machos *mwh*. As fêmeas *ORR; flr³* são portadoras de cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem Oregon R(R), resistente ao DDT (Dapkus & Merell, 1977; Frölich & Würigler, 1989). Conseqüentemente, essa linhagem possui alto nível constitutivo de citocromo P450, que está associado à presença de: (I) um gene principal dominante R, localizado no cromossomo 2, e (II) vários genes menores ligados ao cromossomo 1 (Hällström & Blanck, 1985).

Os cruzamentos originam larvas com duas constituições genotípicas:

(i) larvas *mwh +/+ flr³* – trans-heterozigotas para os marcadores recessivos *mwh* e *flr³*;

(ii) larvas *mwh +/TM3, Bd^s* - heterozigotas para o cromossomo balanceador *TM3*. Esse cromossomo é indispensável para manter a heterozigose do gene marcador *flr³*, já que este é letal em homozigose (Garcia-Bellido & Dapena, 1974). O marcador *Bd^s*, presente no genótipo desses indivíduos, determina um padrão de recorte nas asas dos adultos, o que permite diferenciá-los dos imagos trans-heterozigotos, que apresentam asas com formato normal.

2.4 TRATAMENTO

Os cruzamentos foram realizados em massa (80 fêmeas: 30 machos), durante três dias, em vidros contendo meio de cultura padrão. Após esse período, os casais foram transferidos para tubos contendo meio de ovoposição, nos quais permaneceram por 8 horas, sendo, em seguida, descartados. Passadas 72 ± 4 horas do início do período de ovoposição, foram coletadas larvas de terceiro estágio por flotação em água corrente e com uso de peneira. As larvas foram, então, colocadas em frascos de 1/36 L (precisamente 100 por tubo de tratamento) contendo 0,9 g de meio sintético, aos quais foram acrescentados 3 mL das soluções de tratamento. As larvas foram submetidas ao tratamento crônico por administração oral, permanecendo em tratamento por aproximadamente 48 horas, isto é, até atingirem o estágio de pupa. Por meio desse procedimento experimental, as células dos discos imaginais que originaram as asas dos adultos ficaram ex-

postas às diferentes soluções por 5 a 6 ciclos de divisão mitótica – o 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). Posterior ao estágio de pupa, os adultos, que nasceram 10–12 dias após a postura dos ovos, foram conservados em etanol 70%. As culturas de *D. melanogaster* permaneceram a temperatura de 25°C e umidade de 60–70%.

2.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA E ESTATÍSTICA

Para cada ponto de tratamento foram analisadas as asas dos adultos trans-heterozigotos. As asas foram montadas em solução de Faure e as lâminas analisadas sob microscópio no aumento de 400 vezes para verificação de ocorrência de manchas simples ou manchas gêmeas. Nesse momento foram avaliados os compartimentos distais das asas e determinadas as seções e o número de células mutadas (Garcia-Bellido et al., 1976). A análise dos tricomas, presentes nas superfícies dorsal e ventral das asas, permitiu a identificação de manchas de pêlos mutantes que podem ser classificadas como:

(i) simples *mwh* ou *flr³*, quando somente um dos marcadores se expressar;

(ii) gêmeas, quando ambos os fenótipos mutantes – pêlos múltiplos (*mwh*) e com a base alargada (*flr³*) – estiverem presentes.

As comparações estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste de qui-quadrado para proporções, com nível de significância de 5% para cada hipótese testada, seguindo-se o procedimento de múltiplas decisões, de acordo com Frei & Würigler (1988). Nas análises de mutagênese, as comparações foram realizadas entre grupos tratados e grupo controle negativo (solvente).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi determinada a taxa de sobrevivência dos indivíduos tratados com própolis, obtidos dos cruzamentos padrão e aprimorado, por meio da análise do número de indivíduos que sobreviveram por tubo de tratamento. Foi observado alto índice de so-

brevivência das larvas tratadas com diferentes concentrações de própolis, demonstrando ausência de efeito citotóxico. Por outro lado, a relação existente entre as diferentes concentrações de própolis + MMC utilizadas no tratamento das larvas de *D. melanogaster*, provenientes de ambos os cruzamentos, e a proporção de indivíduos adultos sobreviventes ao tratamento, evidenciou taxa de sobrevivência em torno de 50% do controle positivo (MMC), revelando a alta toxicidade da MMC (Figuras 1 e 2).

Observando as Figuras 1 e 2, que tratam as taxas de sobrevivência das larvas tratadas com própolis + MMC provenientes dos cruzamentos ST e HB, respectivamente, pode-se verificar que os resultados demonstram diminuição da citotoxicidade induzida pela MMC em presença da própolis em suas diferentes concentrações em ambos os cruzamentos utilizados. Também observa-se que os resultados demonstram índice de sobreviventes cerca de 30% maior nos tratamentos com a própolis, exceção feita para a dose de 50% no cruzamento ST, em que a frequência de sobrevivência foi praticamente igual à do controle.

Os cruzamentos padrão e aprimorado produzem indivíduos com diferentes níveis

de expressão de enzimas de metabolização do tipo citocromo P-450. A ausência de diferenças significativas nas respostas citotóxicas obtidas em ambos os cruzamentos indica que a própolis do tipo exportação, produzida pelo laboratório Poleneqpar (São Paulo-SP), é capaz de proteger os indivíduos testados dos efeitos citotóxicos produzidos pela MMC e que esse fato independe da diferença nos níveis de enzimas de metabolização do tipo citocromo P-450, presentes em ambos os cruzamentos testados (ST e HB).

Pela análise microscópica dos pêlos mutantes presentes nas asas dos adultos trans-heterozigotos, a aplicação do teste estatístico e a comparação com os resultados obtidos nos experimentos realizados utilizando o cruzamento padrão, foi possível determinar que a própolis não induziu eventos mutagênicos e/ou recombinogênicos em células somáticas de *D. melanogaster*.

Os resultados demonstrados neste trabalho corroboram os dados descritos na literatura, contribuindo para que se determine o nível da atividade protetora exercida pela própolis quando co-administrada com agentes genotóxicos que apresentam diferentes mecanismos de ação.

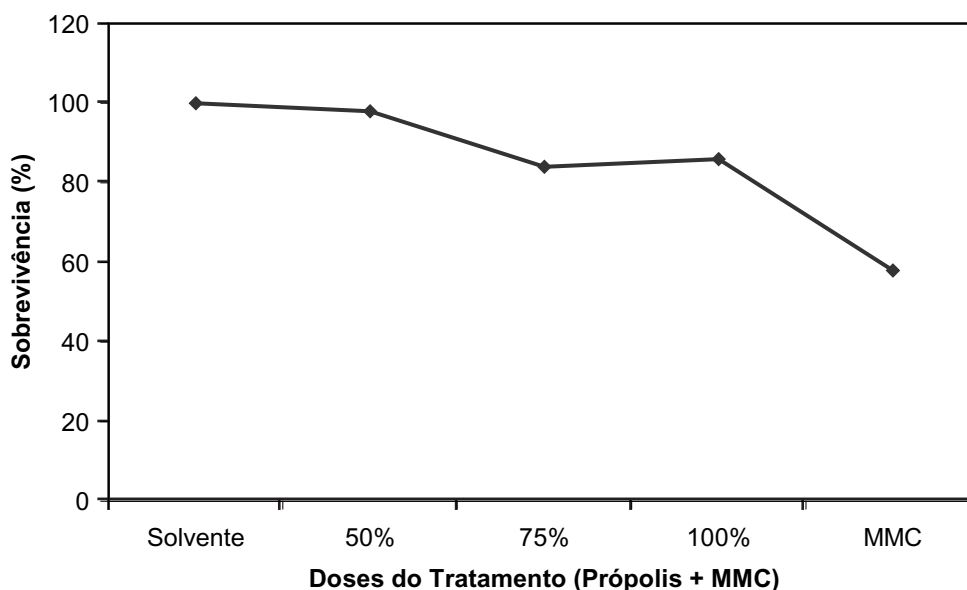


Figura 1 - Curva de sobrevivência dos indivíduos obtidos do cruzamento ST tratados com diferentes concentrações de própolis + MMC.

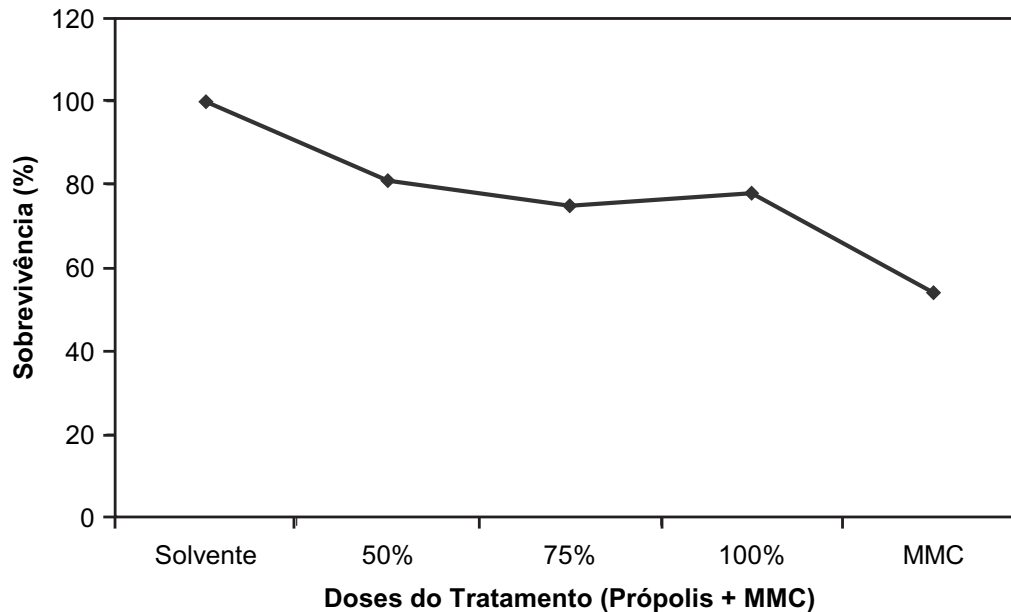


Figura 2 - Curva de sobrevivência dos indivíduos obtidos do cruzamento HB tratados com diferentes concentrações de própolis + MMC.

4. REFERÊNCIAS

- Banskota, A. H. Y. Tezuka, J. K. Prasain, K. Matsushige, I. Saiki, & S. Kadota.** 1998. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.* 6: 896-900.
- Bazo, A. P., M. A. M. Rodrigues, M. Sforcin, J. L. V. Camargo, L. R. Ribeiro, & D. M. F. Salvadori.** 2002. Protective action of propolis in the rat colon carcinogenesis. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 22: 183-194.
- Burdock, G. A.** 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.* 36: 347-363.
- Clerice, M. T. P. S.** 1999. Dermatologia e cosméticos. *Revista da Universidade de Franca* 7: 20.
- Dapkus, J. & D. J. Merell.** 1977. Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 87: 685-697.
- Frei, H., J. Clements, D. Howe & F. E. Würigler.** 1992. The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 279: 21-33.
- Frei, H. & F. E. Würigler.** 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203: 297-308.
- Frölich, A. & F. E. Würigler.** 1989. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutat. Res.* 216: 179-187.
- Fu, J. Y., Y. Xia & Y. Y. Zheng.** 2004. Antimutagenicity of propolis against some mutagens in vivo and in vitro. *Biomed. Environ. Sci.* 17: 469-75.
- Garcia-Bellido, A. & J. Dapena.** 1974. Induction, detection, and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila melanogaster*. *Molec. Gen. Genet.* 128: 117-130.
- Garcia-Bellido, A., P. Ripio, G. Morata.** 1976. Developmental compartmentalization in the dorsal mesothoracic disc of *Drosophila*. *Dev. Biol.* 48: 132-147.
- Hällström, I. & A. Blanck.** 1985. Genetic regulation of the cytochrome P450 system in *Drosophila melanogaster*. II. Localization of some genes regulating cytochrome P450 activity. *Chem. Biol. Interact.* 56: 157-171.
- Macedo, S. B.** 1999. Uso da própolis em clínica odontológica. *Revista da Universidade de Franca* 7: 15.
- Marcucci, M. C.** 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic

- activity. *Apdologie* 26: 83-99.
- Mujaili, L.** 1999. Uso da própolis na cirurgia plástica. *Revista da Universidade de Franca* 7: 15.
- Moreno, M. I. N., I. C. Zampini, R. M. Ordonez, G. S. Jaime, M. A. Vattuone & M. I. Isla.** 2005. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, and antimutagenicity of propolis from Tucuman, Argentina. *J. Agric. Food Chem.* 16: 8957-62.
- Orsolíc, N., A. B. Saranovic & I. Basic.** 2006. Direct and indirect mechanism(s) of antitumour activity of propolis and its polyphenolic compounds. *Planta Med.* 72: 20-27.
- Valadares, B. L. B.** 2002. Ação anti-recombinogênica da própolis contra efeitos genotóxicos da doxorubicina em *Drosophila melanogaster*. Dissertação de Mestrado. 83 p. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

Recebido em 22.IX.2006

Aceito em 07.II.2007