

**AValiaÇÃO DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS E ANTIMUTAGÊNICOS
DO FATOR DE CRESCIMENTO *Chlorella* Growth Factor (CGF)
PELO ENSAIO DE *Allium cepa***

**EVALUATION OF MUTAGENIC AND ANTIMUTAGENIC EFFECTS OF *CHLORELLA*
GROWTH FACTOR (CGF) USING *ALLIUM CEPA* TEST**

*Nádia Calvo Martins Okuyama*¹

*Bruna Isabela Biazi*²

*Thiago Cezar Fujita*³

*Karina de Almeida Gualtieri*⁴

*Rodrigo Juliano Oliveira*⁵

RESUMO:

O desenvolvimento do câncer está diretamente relacionado ao estilo de vida, histórico familiar, hábitos alimentares, idade, sexo, entre outros. Uma hiper-alimentação, consumo reduzido de frutas e hortaliças, bem como o consumo excessivo de gorduras e carnes seriam as causas alimentares mais prováveis do câncer. A *Chlorella*, alga unicelular de água doce, pertence à categoria de células eucarióticas. Esta alga contém uma substância chamada de Fator de Crescimento (*Chlorella* Growth Factor - CGF). A este Fator de Crescimento pertencem glicoproteínas as quais possuem efeitos inibidores contra o câncer.

PALAVRAS-CHAVE: câncer, *Chlorella*, hábitos alimentares.

ABSTRACT:

The development of cancer is directly related to lifestyle, family history, dietary habits, age, gender, among others. A hyper-power, low consumption of fruits and vegetables, and excessive consumption of fats and meats are the most likely dietary causes of cancer. *Chlorella*, unicellular algae fresh water belongs to the category of eukaryotic cells. This algae contains a substance called Growth Factor (*Chlorella* Growth Factor - CGF). This growth factor contains glycoproteins which have inhibitory effects against cancer.

KEYWORDS: cancer, *Chlorella*, dietary habits.

INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um amplo conjunto de doença que têm em comum o crescimento descontrolado de células transformadas, que podem invadir todos os tecidos e órgãos por meio de metástases, prejudicando suas funções básicas. Segundo Beltran – Ramirez e col. (2006), mais de um milhão de pessoas desenvolvem câncer a cada ano sendo citados como principais fatores de risco para o desenvolvimento da patologia, a idade, o sexo, a raça, estilo de vida incluindo histórico familiar e hábitos de vida, como exposição ao sol, por exemplo, e alimentares.

Atualmente, existe uma grande preocupação com relação à existência de substâncias às quais o homem se expõe constantemente em função da sua interação com o ambiente. Essas substâncias podem gerar danos ao DNA e levar ao desenvolvimento de doenças, dentre elas o câncer, hoje considerado uma doença genética, uma vez que resulta de alterações em genes que controlam a proliferação e a diferenciação celular (protooncogenes e genes supressores

23

¹ Graduada em Biomedicina pelo Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL). – nana_082@hotmail.com

² Graduada em Biomedicina pelo Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL). – bruna_ib@hotmail.com

³ Graduado em Biomedicina pela Universidade Estadual de Londrina (UEL). Mestre em Patologia Experimental, UEL. Docente no Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL). – tcfujita@hotmail.com

⁴ Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Londrina (UEL). Mestrado em Patologia Experimental (UEL). Doutoranda em Patologia Experimental. Professora titular e coordenadora do curso de Biomedicina no Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL). – kagualtieri@gmail.com

⁵ Graduado em Ciências Biológicas (Bacharelado/Licenciatura), Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – IBB/UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. Especialista em Análises Clínicas – UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. Mestre em Genética e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas, Estadual de Londrina – CCB/UEL, Londrina, Paraná, Brasil. Doutor em Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBRC/UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil. Professor Adjunto I da Faculdade de Medicina “Dr. Hélio Mandetta”, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil – rodrigo.oliveira@ufms.br

tumorais), ou de alterações em genes comprometidos com os mecanismos de reparo do DNA (MEIRELES *et al.*, 2006).

O câncer é um problema de saúde pública, quando detectado precocemente pode ter cura, entretanto fato este que não acontece em todos os casos. Assim, faz-se necessário mobilizar os esforços na prevenção e na cura da doença. Nesta busca, incluem-se substâncias quimioprotetoras que não permitam que a doença se instale ou progrida razão pela qual têm sido extraídos diferentes extratos de plantas, já descritas como medicinais.

Os alimentos que possuem agentes antioxidantes constituem um dos principais grupos de alimentos com propriedades funcionais, conhecidos também como nutracêuticos ou fármaco-alimentos (FERRARI & TORRES, 2002). A dieta pode modular funções orgânicas reduzindo o risco do surgimento de patologias (BORGES, 2001).

A *Chlorella* é uma alga unicelular de água doce e pertence à categoria de células eucarióticas. Cultivada em larga escala na Ásia, ela contém uma substância denominada *Chlorella Growth Factor* (CGF) composta por glicoproteínas (NODA *et al.*, 1996) as quais possuem efeitos inibidores contra o câncer. É utilizada como suplemento alimentar e pode ser incorporada a alimentos como cereais.

Para a triagem de compostos a espécie *Allium cepa* tem sido utilizada como organismo teste em diversos trabalhos para a identificação químicos genotóxicos e mutagênicos. As características celulares desta espécie credenciam-nas como um eficiente material para estudos citogenéticos, sendo indicadas para ensaio de aberrações cromossômicas (MAZZEO & MARIN-MORALES, 2009).

MATERIAIS E MÉTODOS

24

Para induzir danos ao DNA, utilizou-se o metilmetanosulfonato (MMS) na concentração de 10×10^{-3} mg/mL (Acros Organics®; CAS 156890050). O metilmetanosulfonato foi escolhido como agente indutor de dano, pois causa alquilação, isto é, adiciona radicais alquil substituindo as bases da molécula de DNA em várias posições (OGA *et al.*, 2008). Os danos causados por este agente indutor podem ser cross-links, quebras e aductos no DNA, os quais se expressam como aberrações cromossômicas (JENKINS *et al.*, 2005), portanto, podem ser avaliadas no teste de *Allium cepa*. No experimento, utilizaram-se sementes de *Allium cepa* (Agristar do Brasil LTDA; Lote: 19870E).

O Fator de Crescimento da *Chlorella* (CGF) (Green Gem Paversul; Lote: 1021), foi testado nas três concentrações seguintes: 0,075; 0,15 e 0,30 mg/mL. A substância foi diluída em água destilada e, para a realização da cultura das raízes de *Allium cepa*, foram utilizados 3 mL de cada uma das concentrações citadas anteriormente.

Na observação da mutagenicidade, as sementes foram cultivadas por 120 horas, seguindo-se os seguintes protocolos: (A) controle negativo, onde as células meristemáticas foram cultivadas somente em 3 mL de água destilada; (B) controle positivo, onde as células foram cultivadas em 3 mL de água destilada por 72 horas e transferidas para outra placa de Petri e embebidas em solução aquosa de MMS na concentração de 10×10^{-3} mg/mL, por 48 horas; (C) solução aquosa do Fator de Crescimento da *Chlorella* (CGF), as células meristemáticas foram cultivadas em água destilada por 72 horas e transferidas para outra placa, onde foram embebidas em solução aquosa de CGF nas três concentrações a serem testadas (0,075, 0,15 e 0,30 mg/mL) por 48 horas.

Para a observação da antimutagenicidade, a solução aquosa do Fator de Crescimento da *Chlorella* foi adicionada ao MMS de acordo com os seguintes protocolos:

(A) Pré-tratamento: As sementes foram cultivadas em água destilada por 24 horas,

submetidas à 3 mL de solução aquosa do Fator de Crescimento da *Chlorella* nas três diferentes concentrações por 48 horas, em seguida lavadas duas vezes em água destilada e embebidas em 3 mL de solução aquosa de MMS por 48 horas.

(B) Simultâneo Simples: As sementes foram cultivadas em 3 mL de água destilada por 72 horas e em seguida, embebidas em solução contendo simultaneamente 1,5 mL da solução aquosa do Fator de Crescimento da *Chlorella* e 1,5 mL de solução aquosa de MMS por 48 horas.

(C) Simultâneo com Pré-incubação: As sementes foram cultivadas em 3 mL de água destilada por 72 e em seguida, embebidas por 48 horas em solução contendo simultaneamente 1,5 mL de solução aquosa do Fator de Crescimento da *Chlorella* e 1,5 mL de solução aquosa de MMS encubados a 37°C durante 1 hora.

(D) Pós-tratamento: As sementes foram cultivadas em 3 mL de água destilada por 24 horas e em seguida, foram transferidas para outra placa e embebidas em 3 mL de solução aquosa de MMS por 48 horas. Logo após, as sementes foram lavadas duas vezes em água destilada e, novamente, transferidas para outra placa de Petri onde foram submetidas à 3 mL de solução aquosa do Fator de Crescimento da *Chlorella* por 48 horas.

Os tratamentos e protocolos foram realizados em triplicata. As células meristemáticas de *Allium cepa* foram cultivadas sempre na concentração de 10×10^3 mg/mL para o MMS e nas três concentrações 0,075, 0,15, 0,30 mg/mL para o Fator de Crescimento da *Chlorella*.

Após o período de 120 horas de cultivo, as raízes de *Allium cepa* foram coletadas ao meio-dia, devido ao índice mitótico ser maior neste período. Fez-se então, a fixação das raízes em solução de Carnoy (3 etanol em solução: 1 ácido acético glacial) por 6 horas.

As raízes foram hidrolisadas em HCl 1N por 6 minutos a 60° C e em seguida, foram submetidas a coloração por reagente de Schiff durante 2 horas em frascos escuros. As pontas das raízes foram seccionadas com o auxílio de lâminas de corte para a extração da região meristemática. Para a coloração do citoplasma das células meristemáticas, foi utilizada uma gota de Carmim acético 2%. Em seguida, colocou-se uma lamínula sobre a raiz, onde se fez uma leve pressão para que as células meristemáticas se espalhassem para melhor visualização. As lâminas foram submetidas a nitrogênio líquido para auxiliar na remoção da lamínula e então, o material ficou em temperatura ambiente para secagem por 24 horas. Posteriormente, uma nova lamínula foi colada sobre o material biológico com o auxílio de resina sintética Permout® e novamente, aguardou-se 24 horas para o início das análises.

Analisou-se 15 mil células/tratamento, sendo 1000 células/lâminas em 3 repetições, em microscopia de luz em aumento de 40X. Para obter o índice mitótico, dividiu-se o número de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) pelo total de células analisadas e entre elas verificou-se também as aberrações cromossômicas existentes. Para a obtenção da frequência total de aberrações cromossômicas, dividiu-se o número total de aberrações pelo número total de células. Já a porcentagem de redução de danos (%RD) foi obtida pelo seguinte cálculo:

$$X = \frac{\text{Média do controle positivo} - \text{média do grupo associado}}{\text{Média do controle positivo} - \text{média do controle negativo}}$$
$$\%RD = X \times 100$$

A análise estatística foi realizada por ANOVA/Tukey. As diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,005$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 1 – Células com danos e porcentagem de redução de danos referentes ao ensaio de *Allium cepa*.

Tratamentos % RD Mutagênicidade	Células com danos
Controle –	37 ^a
MMS –	274 ^{b*}
CGF [1] –	16 ^a
CGF [2] –	26 ^a
CGF [3] –	7 ^a
Antimutagênicidade	Células com danos
Pré – Tratamento [1] 99,95	34 ^{b*}
Pré- Tratamento [2] 97,91	41 ^{b*}
Pré- Tratamento [3] 92,98	51 ^{b*}
Tratamento Simultâneo Simples [1] 96,00	42 ^{b*}
Tratamento Simultâneo Simples [2] 91,17	49 ^{b*}
Tratamento Simultâneo Simples [3] 90,46	57 ^{b*}
Tratamento Simultâneo com Pré - Incubação [1] 96,96	43 ^{b*}
Tratamento Simultâneo com Pré - Incubação [2] 93,10	50 ^{b*}
Tratamento Simultâneo com Pré - Incubação [3] 90,24	57 ^{b*}
Pós- Tratamento [1] 108,24	15 ^{b*}
Pós- Tratamento [2] 104,44	24 ^{b*}
Pós- Tratamento [3] 100,13	34 ^{b*}

Legenda: [1] – 0,075 g/L; [2] – 0,15 g/L; [3] – 0,3 g/L. Controle – H₂Odestilada; MMS - H₂Odestilada por 72h + MMS (0,010g/L) por 48h; CGF – H₂Odestilada por 72h + CGF por 48h; Pré- Tratamento – H₂Odestilada por 24h + CGF por 48h + MMS 48h; Tratamento Simultâneo Simples- H₂Odestilada por 72h + MMS (0,010g/L) + CGF por 48h; Tratamento Simultâneo com Pré- Incubação – H₂Odestilada por 72h + MMS (0,010g/L) + CGF incubados por 1h a 37°C por 48h; Pós- Tratamento – H₂Odestilada por 24h + MMS por 48h + CGF por 48h. ^a Comparado com o Controle; ^b Comparado com o MMS; * Diferença estatisticamente significativa (Teste estatístico - Qui- Quadrado – p < 0,05).

26

R
E
V
I
S
T
A

As células possuem mecanismos complexos de controle de sua proliferação. Sabe-se que mutações ocorridas em genes que controlam estes mecanismos podem levar a um descontrole da atividade celular, desregulando vias importantes como a divisão e proliferação celular e a apoptose, que podem levar ao surgimento de neoplasias.

Segundo Lee & Park (2003) um terço de todos os cânceres humanos estão relacionados à dieta. Diante deste contexto, salienta-se a importância de compreender melhor o processo de mutagênese, onde as alterações genéticas acompanham modificações no fenótipo das células levando ao desenvolvimento neoplásico. A quimioproteção baseia-se na interrupção dos eventos biológicos envolvidos nas alterações do material genético através de substâncias naturais ou sintéticas (BELTRAN-RAMIREZ Y COL, 2006).

Substâncias bioantimutagênicas são moduladoras do reparo e replicação do DNA e agem em nível celular. Estas substâncias têm a capacidade de inibir sistemas de reparo que estão sujeitos a erros e manter fidedigna a replicação do material genético. Já as substâncias desmutagênicas, são capazes de inativar um agente mutagênico por ação direta ou através de enzimas moduladoras após a metabolização ou então, através do sequestro de agentes mutagênicos e radicais livres impedindo sua ligação ao DNA.

Uma vez elucidados os mecanismos pelos quais pode agir o composto testado, a literatura sugere que para o estudo da antimutagenicidade, podem ser utilizados diferentes protocolos como o pré-tratamento, simultâneo simples, simultâneo com pré-incubação e o pós-tratamento. Para tanto, é necessário saber que o protocolo de pré-tratamento bem como o pós-tratamento atuam através da bioantimutagênese, o protocolo simultâneo simples tem atividade desmutagênica e bioantimutagênica e o protocolo simultâneo com pré-incubação indique atividade desmutagênica (OLIVEIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Fazendo uma análise dos protocolos, o protocolo pré-tratamento obteve porcentagem de redução de danos (%RD) que variou entre 99,95% a 92,98%. Para este protocolo pode-se pensar em dois modos de ação: (a) os compostos bioativos do Fator de Crescimento da *Chlorella* tem a capacidade de interagir diretamente com o MMS impedindo que este exerça sua ação mutagênica e assim o mecanismo de ação seria por desmutagenese e/ou (b) os compostos bioativos do Fator de Crescimento seriam capazes de modular o sistema enzimático de reparo do DNA que reduziria os danos causados pelo MMS o que indicaria uma atividade por bioantimutagenese.

No protocolo simultâneo simples, O CGF modularia o sistema de reparo do DNA, uma vez que o agente mutagênico já estaria no interior do núcleo celular (mecanismo de bioantimutagênese). A %RD variou entre 96,00% a 90,46%.

No protocolo simultâneo com pré-incubação, o MMS quando incubado com o CGF é inativado pela substância em teste antes de entrar em contato com a célula. Este protocolo age preferencialmente por desmutagênese e teve %RD entre 96,96% e 90,24%.

Por fim, no protocolo de pós-tratamento sabe-se que a atividade quimioprotetora é por bioantimutagênese. O CGF seria capaz de modular o sistema de reparo aumentando sua eficiência e sua fidelidade. Neste protocolo houve uma importante porcentagem de redução de danos que variou de 108,24 a 100,13%.

Sendo assim, podemos inferir que a melhor forma de quimioproteção do Fator de Crescimento da *Chlorella* é por bioantimutagenese uma vez que este protocolo age preferencialmente por este mecanismo.

Com relação ao índice mitótico, Segundo Fiskesjö (1993a), é considerado normal quando há uma inibição na divisão celular em até 36% e que a mitose reduzida em valores acima de 50%, a substância em análise é considerada tóxica as células. Levando-se em consideração os dados deste autor e quando comparados aos dados

da pesquisa com o CGF, infere-se que este alimento funcional não é citotóxico para a cultura das células de *Allium cepa*. As porcentagens de redução do índice mitótico encontrados nos protocolos de mutagenicidade foram de 3,52; 3,26 e 3,55% para as concentrações de 0,075; 0,15 e 0,3mg/mL, respectivamente.

Nos protocolos de antimutagenicidade pré-tratamento, simultâneo simples e simultâneo com pré-incubação, não houve variações significativas ficando em média na taxa de 1% entre as três diferentes concentrações.

A *Chlorella* vem sendo amplamente estudada a fim de se conhecer o mecanismo antioxidante desta alga. O CGF tem importante efeito carcinostático contra vários tipos de tumores em cobaias. Acredita-se que este efeito seja através da correção do material genético uma vez danificado anteriormente promovendo renovação dos tecidos, além de estimular as células do sistema imunológico para que ataquem as células cancerígenas.

Pesquisadores brasileiros avaliaram o efeito terapêutico/profilático do extrato da *Chlorella* sobre a resposta imuno-hematopoiética de animais normais e portadores do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Houve aumento significativo da atividade das células NK na produção de citocinas IL-2 e INF-g e na liberação de TNF-a por células esplênicas, proteção da mioelossupressão agindo na manutenção do estroma medular e estimulando a produção de citocinas reguladoras IL-6 e IL-1a (RODRIGUES, 2001).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante ressaltar que a identificação de agente inibidores de mutações, é útil para a descoberta de substâncias anticarcinogênicas, uma vez que os agentes mutagênicos estão ligados a carcinogênese direta ou indiretamente.

28 Verificou-se na presente pesquisa que o Fator de crescimento da *Chlorella*, possui dois mecanismos que melhor agem no interior da célula para prevenir danos no DNA: desmutagênese e bioantimutagênese. Os protocolos que melhor demonstraram este mecanismo de ação foram o pré-tratamento e o pós-tratamento.

A inclusão de produtos antimutagênicos e anticarcinogênicos na dieta pode ser uma forma de prevenção do câncer e outras doenças crônico-degenerativas.

De acordo com os experimentos discutidos anteriormente e os resultados desta pesquisa, pode-se inferir que a atividade antioxidante do Fator de Crescimento da *Chlorella*, pode ter favorecido a alta %RD nos protocolos de antimutagenicidade, uma vez que as células meristemáticas de *Allium cepa* foram submetidas a estresse oxidativo causado pelo tratamento com o metilmetanosulfonato (MMS) que pode ter resultado na formação de espécies reativas de oxigênio (EROS).

REFERÊNCIAS

BELTRÁN-RAMÍREZ, O. y col. **Mecanismo Quimioprevención del Ester Fenético del Ácido Caféico (Cape) en la iniciación de un Modelo de Hepatocarcinogénesis: Alteración de los Cyp450. Trabalho apresentado no 2º Congresso Nacional de Química Médica. 2 al 8 Septiembre del 2006, Qro.[Querétano], Qro., México. Versão impressa In: Revista Salud Pública y Nutrición. Edición Especial No.7-2007. Disponível em: <<http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee-07-2007/index.html>>. Acesso em: 24 de mai. 2011.**

BORGES, V.C. **Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos. In: WAITZBERG, D.L. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3. ed. Atheneu, p.1495-1509. Rio de Janeiro, 2001.

FERRARI, C.K.B. & TORRES, E.A.F.S.. **New dietetic compounds with anticarcinogenic properties.** *Rev. Bras. Canc.*, v. 48, p. 375-382, 2002.

FISKESJO, G., 1993a. **The *Allium* test – a potential standard for the assessment of environmental toxicity.** In: Environmental Toxicology and Risk Assessment. Gorsuch/Dwyer/Ingersoll/LaPoint. ASTM, Philadelphia, PA., pp.331-345.

GESTER H. **β -carotene, vitamin E and vitamin C in different stages of experimental carcinogenesis.** *European Journal of Clinical Nutrition*, v.49, n.3, p. 155-168, 1995.

JENKINS, G.J.S. et al. Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents?. *Mutagenesis*, v.20, p.389–398, 2005.

LEE, B.M.; PARK, K.K. **Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents.** *Mutation Research*, v. 523-524, p. 265-278, 2003.

MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A.. **Avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do btex, utilizando o sistema teste de *Allium cepa*.** Disponível em: <<http://cecemca.rc.unesp.br/ojs/index.php/holos/article/viewFile/2018/1742>. Acesso em 21 jul. 2009.

MEIRELES, J.R.C.; LOPES, M.A.; ALVES, N.N.; CERQUEIRA, E.M.M. **Apoptose em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos ocupacionalmente expostos a agentes mutagênicos e carcinogênicos.** *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 52, p. 337-343, 2006.

NODA, K.; OHNO, N.; TANAKA, K., *et al.* **A water-soluble glycoprotein from *Chlorella vulgaris*.** *Planta Médica*, p. 423-426, 1996.

OGA, S.;CAMARGO,M.M.A.; BATISTUZZO,J.A.O.. **Fundamentos de toxicologia.** 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008, 86p.

OLIVEIRA, R.J. et al. **Protective effect of Beta-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells.** *Toxicology in Vitro*, v.21, p.41-52, 2007.

OLIVEIRA, R.J. et al. **Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of β -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test.** *Toxicology in Vitro*, v.20, p.1225-1233, 2006.

RODRIGUES, A. P. O. **Efeitos do extrato de *Chlorella vulgaris* sobre a resposta hematopoiética em camundongos expostos ao chumbo e infectados com *Listeria monocytogenes*.** Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. UNICAMP, 2001.

29

R
E
V
I
S
T
A