

ANÁLISE MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA DO CAROTENOIDE LUTEÍNA PELO TESTE DE *Allium cepa* MUTAGENIC AND ANTIMUTAGENIC ANALYSIS FROM LUTEIN IN *Allium cepa* TEST

Bruna Isabela Biazil¹
Fernanda Mithie Ogo²
Rodrigo Juliano de Oliveira³

RESUMO:

O presente estudo avaliou o potencial mutagênico e antimutagênico da luteína (pigmento vegetal) por meio do ensaio de *Allium cepa*. Os tratamentos utilizados foram: controle negativo (água destilada); controle positivo (solução aquosa de Metilmetanosulfonato (MMS) - 0,01mg/mL); mutagenicidade (luteína nas concentrações de 0,14mg/mL, 0,28mg/mL e 0,56mg/mL) e antimutagenicidade onde as mesmas concentrações de luteína foram associadas ao MMS em protocolos de pré-tratamento, simultâneo (simples e com pré-incubação) e pós-tratamento. Os tratamentos com luteína e o MMS foram realizados por 48 horas. Para o tratamento simultâneo com pré-incubação as duas substâncias foram préincubadas em estufa BOD por 1 hora a 37°C. Devido ao pico mitótico ocorrer ao meio dia, os meristemas foram coletados neste período. As raízes foram fixadas em solução de Carnoy, hidrolisadas, coradas com reativo de Schiff e Carmim Acético. Em seguida fez-se o esmagamento dos meristemas e montagem de lâminas. Analisou-se 15.000 células/tratamento (3 repetições), em microscopia de campo claro (40x), e a análise estatística foi realizada pelo ANOVA/Tukey. A luteína não se mostrou mutagênica, já que não houve diferenças significativas em relação ao controle negativo. Na avaliação da antimutagenicidade (MMS associado à luteína) observou-se o efeito quimioprotetor da luteína e as porcentagens de redução de danos foram de 80,97%, 96,35% e 84,21% em protocolo de pré-tratamento; 76,11%, 78,54% e 83,80% em simultâneo simples; 93,11%, 78,94% e 70,02% em simultâneo com pré-incubação; 79,35%, 79,14% e 74,49% em pós-tratamento para as concentrações de 0,14mg/mL, 0,28mg/mL e 0,56mg/mL, respectivamente.

PALAVRAS CHAVE: luteína, mutagênese, antimutagênico.

11

ABSTRACT:

This study evaluated the mutagenic and antimutagenic potential of a plant pigment called lutein through the *Allium cepa* test. Treatments used were: negative control (distilled water), positive control -aqueous Metilmetanosulfonato (MMS) - 0.01 mg / mL; mutagenicity: lutein concentrations of 0.14 mg/mL, 0.28mg/mL and 0,56mg/mL. In The antimutagenic protocols, the same concentrations of lutein were associated with the MMS. Protocols: pre-treatment, simultaneous (simple and with pre-incubation) and post-treatment. We analyzed 15,000 cells/treatment (triplicate) in bright field microscopy (40x), and statistical analysis was performed by ANOVA/Tukey. Lutein was not mutagenic, since no significant differences in relation to the negative control. In assessing the antimutagenic (MMS associated lutein) was observed the protector effect of lutein; harm reduction percentages were 80.97%, 96.35% and 84.21% in pre-treatment protocol, 76, 11%, 78.54% and 83.80% at the simultaneous simple, 93.11%, 78.94% and 70.02% at the simultaneous with pre-incubation, 79.35%, 79.14% and 74.49 % post-treatment concentrations of 0.14 mg / mL, 0.28 mg / mL and 0.56 mg / mL, respectively.

KEYWORDS: lutein, mutagenesis, antimutagenic.

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

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

3 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 Aplicada à Reprodução Humana, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FMB/UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. Mestre em Genética e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas, Universidade 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

R
E
V
I
S
T
A

INTRODUÇÃO

A exposição humanos aos denominados agentes mutagênicos, compostos químicos efetivos em causar danos ao material genético, constitui uma das grandes preocupações no mundo atual. Tais agentes estão relacionados com o desenvolvimento de doenças de etiologia genética, como o câncer, por exemplo, visto que o mesmo resulta de alterações em genes que controlam a proliferação e a diferenciação celular (protooncogenes e genes supressores tumorais), ou de alterações em genes comprometidos com os mecanismos de reparo do DNA (FUTREAL *et al.*, 2004; CHIN *et al.*, 2011).

As substâncias mutagênicas promovem alterações nas sequências de bases nitrogenadas do DNA, caracterizadas por mutações pontuais, alterações na estrutura cromossômica e/ou no número total de cromossomos (LEME *et al.*, 2008). Componentes alimentares podem atuar diretamente como mutagênicos, ou inversamente, podendo interferir diretamente ou indiretamente na ação dos mutagênicos (WISEMAN, 2007).

Estudos tem mostrado que componentes naturais contendo duplas ligações conjugadas atuam por seu efeito antimutagênico na eliminação de substâncias mutagênicas. Um exemplo desses compostos são os carotenóides da dieta ou de formulações medicamentosas que, podem desempenhar efeito benéfico no organismo humano pelo sequestro de tais componentes maléficos a saúde (KRINSKY, 1989; MOLNÁR *et al.*, 2004).

Os estudos epidemiológicos têm sugerido que o carotenóide luteína pode agir como antimutagênico, podendo diminuir a incidência das principais doenças crônico-degenerativas tais como câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular relacionada com a idade e doenças de pele causadas pela radiação ultravioleta (PARK *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004; KRINSKY & JOHNSON, 2005; STRINGHETA *et al.*, 2006; ASTNER *et al.*, 2007).

Segundo STRINGHETA *et al.* (2006), luteína é um carotenóide diidroxilado, pertencente a classe das xantofilas de coloração amarela, podendo ser encontrado na gema do ovo e em uma grande variedade de frutas, legumes e verduras, tais como, folhosos verdes escuros, abóbora, manga, mamão, pêssigo, ameixa e laranja (GOMES, 2007).

Estudos *in vitro* utilizando modelos de cultura de células da retina, mostram que tratamento com antioxidantes, incluindo luteína, diminuiu drasticamente o estresse oxidativo, um dos principais eventos que podem produzir instabilidade genômica (RODRIGUES *et al.*, 2004). Sua propriedade protetora é caracterizada pelo potencial de sequestro do oxigênio *singlet*, bem como aumentando a expressão do RNAm pró-apoptótico do gene TP53 (GOSWAMI *et al.*, 2005).

Apesar de já descrita como antígeno tóxica e antimutagênica a literatura não indica o modo de ação deste composto. Assim, a avaliação do modo de ação antimutagênica da luteína poderia ser realizada em diferentes modelos experimentais. Porém, a presente pesquisa propõe o uso da espécie *Allium cepa* que tem sido utilizada como organismo teste em diversos trabalhos, a fim de identificar químicos potencialmente genotóxicos, mutagênicos e antimutagênicos. As células de meristemas radiculares de *Allium cepa* apresentam características que as credenciam como um eficiente material para estudos citogenéticos, sendo indicadas para ensaio de aberrações cromossômicas (MAZZEO *et al.*, 2009). Além disso, os estudos de Rank & Nielsen (1997) indicam uma boa correlação entre danos mutagênicos causados em sistemas testes de mamíferos e de *Allium cepa* o que sugere que este último seja adequado para o tipo de estudo proposto. Cita-se também

12

R
E
V
I
S
T
A

o estudo de Rignonato *et al.* (2005) propõe o uso do ensaio de *Allium cepa* para avaliação do modo de ação antimutagênico de produto natural.

Frente a estas considerações o presente estudo teve por objetivo avaliar a ação mutagênica e antimutagênica do carotenóide Luteína, bem como os modos de ação do mesmo, em células meristemáticas de *Allium cepa*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes químicos

As soluções de luteína (0,14mg/L; 0,28mg/L e 0,56mg/L) e metilmetanosulfonato (0,010mg/mL) utilizadas no experimento foram preparadas em água destilada. A primeira delas foi testada como agente quimiopreventivo e a segunda como agente indutor de danos no DNA.

Para a indução dos danos fez-se solução de metilmetanosulfonata (MMS) na concentração de 0,010mg/mL. O MMS é considerado um agente alquilante e clastogênico, já que adiciona radicais alquil na molécula de DNA, provocando danos diretos a mesma.

Delineamento experimental

Fez-se o experimento utilizando sementes comerciais de *Allium cepa* (Top Sed, lote1970A). As sementes foram germinadas em placas de petri sob uma folha de papel filtro e embebidas em 3mL de água destilada ou solução. O tempo de germinação de cada placa de petri foi de 120 horas, do qual as sementes foram submetidas aos seguintes protocolos:

Protocolos de mutagenicidade:

- I. Controle: as sementes foram germinadas durante as 120h em água destilada;
- II. MMS: as sementes foram germinadas nas primeiras 72h em água destilada e nas últimas 48h em solução de MMS;
- III. Luteína: as sementes foram germinadas nas primeiras 72h em água destilada e nas últimas 48h em solução de Luteína nas três diferentes concentrações.

Protocolos de antimutagenicidade:

- I. Pré-Tratamento: as sementes foram germinadas nas primeiras 24h em água destilada, nas 48h seguintes em solução de Luteína, nas três diferentes concentrações, e nas últimas 48h em solução de MMS;
- II. Simultâneo simples: as sementes foram germinadas nas primeiras 72h em água destilada e nas últimas 48h em uma associação de 1,5mL de solução de MMS e 1,5mL de solução de Luteína nas três diferentes concentrações.
- III. Simultâneo com pré-incubação: as sementes foram germinadas nas primeiras 72h em água destilada e nas últimas 48h em uma associação de 1,5mL de solução de MMS e 1,5mL de solução de luteína, nas três diferentes concentrações, previamente incubados em estufa BOD a 37°C por uma hora;
- IV. Pós-Tratamento: as sementes foram germinadas nas primeiras 24h em água

destilada, nas seguintes 48h seguintes em solução de MMS, e nas últimas 48h em solução de luteína nas três diferentes concentrações.

- V. Nas mudanças dos meios de germinação (transferências de soluções), as sementes foram lavadas por duas vezes em água destilada a fim de retirar os resíduos das soluções usadas anteriormente nos processos de germinação. As soluções de MMS possuíam sempre a concentração final de 0,010mg/mL. Já a luteína, testada em três diferentes concentrações, possuíam concentrações finais de 0,14mg/L; 0,28mg/L e 0,56mg/L. Todos os cultivos (tratamentos) foram realizados em triplicata.

Confecção de lâminas

Após as 120 horas de germinação, as sementes foram lavadas em água destilada e colocadas em solução fixadora (1 ácido acético: 3 álcool etílico) por um período de 6 horas. Posteriormente as raízes sofreram hidrólise ácida (HCl 1N) a fim de que o material genético fosse exposto para coloração a posteriori. Em seguida as raízes foram colocadas em reativo de Schiff durante um período de 2h para coloração do DNA. Sobre uma lâmina, cortou-se o meristema da raiz, pingou-se uma gota de Carmim acético (2%) para coloração do citoplasma. Posteriormente colocou-se uma lamínula e os meristemas sofreram esmagamento com auxílio de uma pinça. Para fixação do material na lâmina, as mesmas foram levemente aquecidas em Bico de Bunsen. Em seguida mergulhadas em nitrogênio líquido para retirada da lamínula. Após 24h de secagem, foi colocado sob o material uma gota de resina sintética (Permout®) e colada uma nova lamínula sobre o material a ser analisado.

14

Análise microscópica e estatística

Analizou-se 15.000 células por tratamento (1000células/lâmina/repetição) em microscopia de luz com aumento de 40 vezes. As células foram quantificadas e qualificadas quanto à fase do ciclo celular (interfase, prófase, metáfase, anáfase ou telófase), as alterações encontradas e micronúcleos.

A percentagem de redução de danos (RD%) foi obtida por meio do seguinte cálculo (WATERS *et al.*, 1990):

$$\%RD = [(aberrações MMS - aberrações do associado) / (aberrações MMS - aberrações controle)] \times 100$$

A análise estatística foi realizada por ANOVA/Tukey e as diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

A tabela 1 apresenta os dados referentes aos testes de mutagenicidade e antimutagenicidade. Na avaliação mutagênica do carotenoide, verifica-se que as alterações não se apresentam significativamente diferentes do teste controle. A média de alterações nucleares foi de $10,33 \pm 0,33$; $175,00 \pm 5,56$; $11,33 \pm 2,96$; $12,00 \pm 2,88$ e $22,00 \pm 8,71$ para os tratamentos controle, MMS, LUT [1], LUT [2], LUT [3], respectivamente.

A análise antimutagênica evidenciou característica antimutagênica da luteína

em todos os protocolos executados, apresentando variáveis taxas de redução de danos e diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo MMS. No pré-tratamento, as porcentagens de redução de danos foram de 80,97%; 96,35% e 84,21% para as doses Pré [1], Pré [2] e Pré [3], respectivamente, e as médias de alterações cromossômicas/nucleares foram de 41,66±8,33; 16,33±5,24; 36,33±2,60. O tratamento simultâneo simples obteve médias de alterações de 49,66±2,33; 45,66±6,69 e 37,00±4,16 e porcentagens de redução de danos de 76,71%; 78,54% e 83,80% para as doses Sim [1], Sim [2] e Sim [3], respectivamente. O protocolo de tratamento simultâneo com pré-incubação apresenta médias de alterações cromossômicas/nucleares de 21,66±2,73; 45,00±2,52; 60,00±6,81 e porcentagens de redução de danos de 93,11%, 78,94% e 70,02% para SPI [1], SPI [2] e SPI [3], respectivamente. As porcentagens de redução de danos no pós tratamento foram de 79,35%; 79,14% e 74,49% e as médias de alterações nucleares de 44,33±8,84; 44,66±6,41 e 52,33±5,70 para Pós [1], Pós [2] e Pós [3], respectivamente.

Tabela 1. Alterações cromossômicas/nucleares avaliadas em 15.000 células meristemáticas de *Allium cepa*.

Tratamento	Aberrações Cromossômicas/nucleares						FTA	M±EPM	%RD
	MN	PON	QUE	PER	ATR	BRO			
Controle	18	10	2	1	0	0	31	10,33±0,33a	-
MMS	465	18	3	3	6	30	525	175,00±5,56	-
Análise mutagênica									
LUT [1]	20	5	3	3	2	1	34	11,33±2,96a	-
LUT [2]	21	8	2	1	3	1	36	12,00±2,88a	-
LUT [3]	25	21	7	4	9	0	66	22,00±8,71a	-
Análise antimutagênica									
Pré [1]	97	16	4	5	2	1	125	41,66±8,33b*	80,97
Pré [2]	34	2	5	4	1	3	49	16,33±5,24 ^{a*}	96,35
Pré [3]	80	8	8	3	3	7	109	36,33±2,60 ^{a*}	84,21
Sim [1]	90	19	8	15	4	13	149	49,66±2,33c*	76,11
Sim [2]	96	16	7	2	7	9	137	45,66±6,69c*	78,54
Sim [3]	92	7	2	7	0	3	111	37,00±4,16 ^{a*}	83,80
SPI [1]	43	6	4	4	3	5	65	21,66±2,73 ^{a*}	93,11
SPI [2]	104	12	2	8	2	7	135	45,00±2,52c*	78,94
SPI [3]	130	8	7	16	7	11	179	60,00±6,81d*	70,02
Pós [1]	87	20	7	8	5	6	133	44,33±8,84b*	79,35
Pós [2]	103	10	11	2	3	5	134	44,66±6,41c*	79,14
Pós [3]	125	11	5	10	0	6	157	52,33±5,70d*	74,49

Legenda: MN - Micronúcleo; PO - Ponte; QUE - Quebra; ATR - Atraso; PER - Perda; BRO - Broto; FTA - Frequência Total de Alterações Cromossômicas/Nucleares; M±EPM: Média ± Erro Padrão da Média do número de alterações cromossômicas/nucleares; %RD – Porcentagem de redução de danos; MMS - Metilmetanosulfonato; LUT - Luteína; Pré - Pré-Tratamento; Sim - Simultâneo simples; SPI - Simultâneo com pré-incubação; Pós - Pós-tratamento; [1] – concentração de 0,14mg/L de luteína em meio de germinação; [2] – concentração de 0,28mg/L luteína em meio de germinação; [3] – concentração de 0,57mg/L de luteína em meio de germinação. a – diferença não significativa em relação ao controle $p > 0,05$. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle, sendo, b: $p < 0,05$; c: $p < 0,01$; d: $p < 0,001$. * - Diferença significativa em relação ao MMS ($p < 0,001$).

DISCUSSÃO

Em função da exposição do homem a compostos capazes de alterar a sequência de DNA bem como a expressão genes, há um apelo cada vez maior por ensaios dentro da Genética Toxicológica que sejam capazes de fazer um *screening* e/ou determinar possíveis compostos tóxicos ou benéficos às populações humanas, animais e vegetais e também ao meio ambiente. A identificação desses podem, por exemplo, determinar uma redução na incidência de câncer, uma doença degenerativa e que tem grandes repercussões em saúde pública.

Neste ínterim, uma variedade de ensaios biológicos e protocolos experimentais são empregados em estudo que envolve danos ao DNA. O teste de *Allium cepa* é amplamente utilizado devido à sua capacidade de avaliar macroalterações geradas no ciclo celular e por isso determinar o potencial de substâncias atuarem como agentes mutagênicos ou antimutagênicos. Esses estudos podem abranger desde biomonitoramento (LEME *et al.*, 2008; BARBÉRIO, *et al.*, 2009; PRZEDPELSKA-WASOWICZ & WIERZBICKA, 2010) até estudos de infusões de plantas medicinais e substâncias naturais isoladas (BAGATINI *et al.*, 2007; STURBELLE, *et al.*, 2010). Além das mutações o teste por meio da contagem de células em divisão pode indicar citotoxicidade (BARBÉRIO *et al.*, 2009).

Segundo Sturbelle *et al.*, (2010), a mutação ocorre tendo como causa eventos físicos e interação com agentes químicos e biológicos capazes de induzir aberrações cromossômicas (AC), caracterizados por mudanças na estrutura cromossômica ou no número total de cromossomos (LEME *et al.*, 2008).

As aberrações cromossômicas podem originar-se através de 2 mecanismos distintos: no primeiro, conhecido como ação clastogênica, o agente mutagênico interage diretamente ao DNA gerando quebras cromossômicas durante os processos de divisão celular; no segundo modo, conhecido como ação aneugênica, ocorre alterações de estruturas envolvidas na formação do fuso mitótico, gerando atrasos e perdas cromossômicas. A formação do micronúcleo pode ocorrer em ambos processos de formação das AC. O micronúcleo é resultado da perda de fragmento(s) cromossômico(s) ou de cromossomo(s) inteiro(s), podendo ser induzido por agentes que danificam diretamente o cromossomo, produzindo quebras, ou por agentes que afetam o fuso mitótico. Os fragmentos ou cromossomos inteiros que não se orientam para os núcleos filhos de uma célula em divisão perdem-se no citoplasma e com a formação de uma própria membrana nuclear, originam-se os micronúcleos (ALBERTINI *et al.*, 2000; FENECH, 2000).

A alta frequência de micronúcleos em relação às outras alterações evidenciadas no estudo é justificada pela origem dos micronúcleos que são as próprias outras alterações. Confirma-se também, o potencial clastogênico e aneugênico da substância indutora de danos utilizada no estudo, o metilmetanosulfonato (MMS).

Partindo desses pressupostos a presente pesquisa utilizou-se o ensaio de *Allium cepa* para avaliar o potencial mutagênico e antimutagênico da Luteína. Em uma análise geral os resultados demonstraram que tal carotenóide não possui atividade mutagênica e pode agir tanto por desmutagênese como por bioantimutagênese. Fato esse que abre novas perspectivas de pesquisa com este mesmo carotenóide.

Os dados de mutagênese indicam que com o aumento da concentração de luteína testada há um incremento da frequência de alteração cromossômica/nuclear, em relação

16

R
E
V
I
S
T
A

àquelas observadas no controle, da ordem de 1,10; 1,16 e 2,13 vezes para as concentrações de 0,14mg/mL; 0,28mg/mL e 0,57mg/mL, respectivamente. Apesar do aumento de mais de duas vezes de alterações para a maior concentração do carotenóide, o teste estatístico não indicou mutagenicidade para a mesma. Mas, este fato sugere que concentrações ainda maiores possam correlacionar-se a eventos mutagênicos.

Em relação aos protocolos de antimutagenicidade não se verificou relação dose resposta, exceto para o protocolo de simultâneo simples. Para este protocolo o aumento da concentração de luteína é diretamente proporcional ao aumento da porcentagem de redução de danos. No entanto, o incremento entre as diferentes concentrações não demonstrou alterações estatisticamente significativas.

No protocolo de pré-tratamento a dose que apresentou a melhor resposta antimutagênica foi a concentração intermediária. A prevenção atingida foi da ordem de 96,35%. Este valor corresponde a 1,19 e 1,14 vezes maior que a menor e maior concentração testadas, respectivamente. A segunda e a terceira concentração apresentaram danos estatisticamente não diferentes quando comparados ao controle (representado por a na tabela 1)

Como já relatado anteriormente, o protocolo de simultâneo simples demonstrou relação dose resposta e as porcentagens de redução de danos foram de 76,11, 78,54 e 83,80% para as concentrações de 0,14mg/mL; 0,28mg/mL e 0,57mg/mL, respectivamente. Apesar de não haver diferenças significativas entre as concentrações pode-se perceber um incremento de proteção aos danos da ordem de 1,03 e 1,10 vezes para a concentração intermediária e a maior em relação à menor dose utilizada.

No protocolo de simultâneo com pré-incubação verificou-se que a menor dose reduziu os danos causados pelo MMS a níveis estatísticos semelhantes ao controle. As outras duas concentrações foram menos efetivas. Porém, ainda assim apresentaram importante ação desmutagênica e as porcentagens de redução de danos foram de 78,94 e 70,02 para as doses de 0,28mg/mL e 0,57mg/mL, respectivamente.

O protocolo de pós-tratamento apresentou-se eficiente na bioantimutagênese, com porcentagens de redução de danos foram significativas. No entanto, neste protocolo há, numa visão geral, as menores taxas de prevenção de danos ao DNA.

Frente a estes dados pode-se afirmar que a luteína, no ensaio de *Allium cepa*, indica boa atividade antimutagênica mediada tanto por desmutagênese como por bioantimutagênese. Estudos indicam dois tipos de substâncias protetoras do DNA. Como relatado anteriormente, as que agem por desmutagênese, e aquelas que agem por bioantimutagênese. As substâncias desmutagênicas são capazes de impedir a ação dos agentes indutores de danos, principalmente por adsorção aos mesmos. Já as bioantimutagênicas, em geral, atuam como moduladoras do reparo e replicação do DNA. Logo, na tentativa de elucidar o mecanismo de ação do carotenóide Luteína, utilizou-se de protocolos descritos pela literatura pertinente: pré-tratamento, tratamento simultâneo simples e após pré-incubação e pós-tratamento (KADA *et al.*, 1982; KADA & SHIMOI, 1987; DE FLORA, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Ainda segundo Oliveira *et al.* (2006) pode-se considerar que o protocolo de tratamento simultâneo simples indique tanto a atividade desmutagênica como bioantimutagênica; o simultâneo pré-incubação uma atividade desmutagênica; e que o pré-tratamento e o pós-tratamento indiquem uma atividade, preferencialmente, bioantimutagênica; a análise do experimento permite inferir que o modo de ação do carotenóide luteína é do tipo

tanto desmutagênico como bioantimutagênico. Apesar de uma análise geral demonstrar as menores taxas de prevenção para o protocolo de pós-tratamento, as porcentagens não variam muito, impedindo a descrição de um modo de ação preferencial. Contudo, acredita-se que a luteína seja uma forte candidata a ação desmutagênica uma vez que a literatura a descreve como um importante agente antioxidante e a partir de agora também relatada como um importante quimiopreventivo.

Segundo Pierce (2004), qualquer agente que aumente significativamente a taxa basal de mutações é denominado mutagênico. Conhecem-se diversos grupos de componentes químicos que podem atuar como mutagênicos, e entre os principais estudados incluem: os análogos de bases que são substâncias incorporadas ao DNA não distinguíveis pelas DNA polimerases; compostos que geram desaminação e hidroxilação de bases; agentes intercalantes que atuam por modificação na estrutura espacial do DNA; as espécies reativas de oxigênio (EROs) que promovem reações oxidativas; e agentes alquilantes, como o utilizado nesta pesquisa (MMS), que atuam adicionando radicais alquil as estruturas do DNA.

O metilmetanosulfonato é um agente alquilante monofuncional de ação direta e fraca. Sua ação acontece em especial pela sua capacidade de alquilar moléculas nucleofílicas como o DNA, visto que todas as bases deste ácido possuem sítios susceptíveis à alquilação, especificamente no nitrogênio (N) e oxigênio (O) (O'CONNOR *et al.*, 1988; BERANEK, 1990; MOORE *et al.*, 1991; TAO *et al.*, 1993; JENKINS *et al.*, 2005). Este fato pode explicar algumas aberrações cromossômicas encontradas no tratamento com MMS, como por exemplo, quebras e fragmentações cromossômicas (RANK & NIELSEN, 1997). Este estuda evidencia portanto, o potencial antimutagênico deste carotenoide frente a utilização de um agente alquilante.

Sabe-se que os danos causados pelo MMS mesmo podem ser correlatos àqueles causados também pelos radicais livres. A ocorrência de radicais livres refere-se às chamadas espécies reativas do oxigênio. A formação dessas se dá primeiramente pelo radical superóxido (O_2^-) formado durante a cadeia respiratória, que pode ser dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Tais agentes podem reagir com outros substratos e estruturas biológicas, levando a formação de outras espécies reativas de oxigênio que também possuem alto potencial de oxidação (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Lee *et al.* (2004) evidenciou em seus experimentos *in vivo* a diminuição radicais livres em pele de murinos, induzidos por UVR, quando suplementados dieteticamente com luteína. Este fato demonstra a capacidade antioxidante da luteína e indica e/ou reforça a sua capacidade de agir por desmutagênese como indicado nesse estudo.

A suplementação utilizando luteína, impediu o aumento da formação dos EROs no estresse oxidativo induzido em camundongos no trabalho de Sasaki *et al.* (2010), e em ratos no trabalho de Miranda *et al.* (2006), que verificou também a capacidade de sequestro de peroxinitrito por este carotenóide. Estudos envolvendo peróxido de hidrogênio na indução do estresse oxidativo, verificaram diminuição da concentração do mesmo frente à utilização de luteína em células de carcinoma gástrico (KIM *et al.*, 2011), e em células ganglionares da retina (LI & LO, 2010). Cita-se também o estudo de Zhang *et al.* 2011, que verificou diminuição do risco de câncer pancreático pela ingestão de luteína.

A luteína utilizada nesta pesquisa pertence a um grupo de substâncias conhecidas como carotenóides, que conferem potencial protetor baseado em suas características de anti-fotossensibilização, as quais em processos de transferência de energia devolvem o

18

R
E
V
I
S
T
A

oxigênio *singlet* a seu estado basal, e após isso dissipam a energia incorporada na forma de calor ao ambiente, retornando a seu estado original sem a ocorrência de degradações (RIOS *et al.*, 2009). Cita-se também que ao interagirem com as espécies reativas de oxigênio, os carotenóides, incluindo a luteína, podem atuar de 3 maneiras: transferência de elétrons, doação de hidrogênio ou por adição (MORAES, 2006; CERQUEIRA *et al.*, 2007; STRINGHETA *et al.*, 2006) e tais eventos podem relacionar-se com o efeito anticarcinogênico verificado em trabalhos utilizando luteína e que não exploram os modos de ação antimutagênicos pelos quais tal carotenóide estaria atuando, como também o trabalho de Raju *et al.* (2005), que estuda o efeito anticarcinogênico dose-dependente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Frente ao exposto, o presente estudo mostrou-se pioneiro em demonstrar a atividade antimutagênica e o modo de ação da luteína. No entanto, esse é um método de *screening* e, portanto, sugere novos modelos de estudo, principalmente aqueles que envolvam os sistemas-testes de cultivo de células de mamíferos. Se o modo de ação da luteína também for confirmado nestes, ter-se-á neste carotenóide um eficiente quimiopreventivo, haja vista as altas porcentagens de redução de danos indicadas, com potencial uso como coadjuvante de terapias contra doenças relacionadas a alterações do material genético, como o câncer, por exemplo.

REFERENCIAS

ALBERTINI, R.J.; *et al.* IPCS guideline for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety. **Mutation Research**, v.463, p.111-172, 2000.

ASTNER, S., *et al.* Dietary Lutein/Zeaxanthin Partially Reduces Photoaging and Photocarcinogenesis in Chronically UVB-Irradiated Skh-1 Hairless Mice. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.20, p.283-291, 2007.

BAGATINI, M.D.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p.444-447, Jul./Set. 2007.

BARBÉRIO, A. *et al.* Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from the River Paraíba do Sul, in Brazil, with the *Allium cepa* L. test. **Brazilian Journal of Biology**, v.69, n.3, p.837-42, 2009.

_____. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from the River Paraíba do Sul, in Brazil, with the *Allium cepa* L. test. **Brazilian Journal of Biology**, v.69, n.3, p.837-42, 2009.

BERANEK, D.T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. **Mutation Research**, v. 231, p.11-30, 1990.

CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v.30, n.2, p.441-449, 2007.

19

R
E
V
I
S
T
A

CHIN, L.; ANDERSEN, J.N.; FUTREAL, P.A. Cancer genomics: from discovery science to personalized. **Nature Medicine**, v.17, n.3, march, 2011.

DE FLORA, S., 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v.402, p.151-158, 1998.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v.455, p. 81-95, 2000.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FUTREAL, P.A. *et al.* A census of human cancer genes. *Nature Reviews Cancer*, v.4, n.3, p. 177-183, abril, 2004.

GOMES, F.S. Carotenoids: a possible protection against cancer development. **Revista de Nutrição de Campinas**, v.20, p. 537-548, set./out., 2007.

GOSWAMI, U.C., SHARMA, N. Efficiency of a few retinoids and carotenoids *in vivo* in controlling benzo[a]pyrene-induced forestomach tumour in female Swiss mice. **British Journal of Nutrition**, v.94, p. 540–543, 2005.

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

20

KADA, T.; INOUE, T.; NAMIKI, N. **Environmental desmutagens and antidesmutagens**. In: Klekowski, E.J. ed. *Environ Mutag Plant Biol*. New York: Praeger, p.137-151, 1982.

KADA, T.; SHIMOI, K., 1987. Desmutagens and bio-antimutagens: Their modes of action. **Bio Essays**. v.7, p.113-115, 1987.

KIM, Y.; SEO, J.H.; KIM, H. Carotene and Lutein Inhibit Hydrogen Peroxide-Induced Activation of NF- κ B and IL-8 Expression in Gastric Epithelial AGS Cells. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 57, p.216–223, 2011.

KRINSKY, N.I. Carotenoids as Chemopreventive Agents. **Preventive Medicine**, v.8, p.592-602, 1989.

KRINSKY, N.I.; JOHNSON, E.J.; Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v.26, p. 459-516, 2005.

LEE, E.H. *et al.* Dietary Lutein Reduces Ultraviolet Radiation-Induced Inflammation and Immunosuppression. **The journal of investigative dermatology**, v. 122, p. 510 –517, 2004.

LEME, D.M., ANGELIS, D.F., MORALES, M.A.M. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v.88, p.214–219, 2008.

LI, S-Y.; LO, A.C.Y. Lutein Protects RGC-5 Cells Against Hypoxia and Oxidative Stress.

International Journal of Molecular Sciences, v.11, p.2109-2117, 2010.

MAZZEO, D.E.C., MORALES, M.A.M. 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.

MIRANDA, M. *et al.* Estrés oxidativo en un modelo de retinopatía diabética experimental ii: utilidad de agentes secuestrantes de peroxinitritos. **Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología**, v.81, p. 27-32, 2006.

MOLNÁR, J.*et al.* Modulation of Multidrug Resistance and Apoptosis of Cancer Cells by Selected Carotenoids. **in vivo**, v.18, p. 237-244, 2004.

MOORE, M.M. *et al.* Comparison of mutagenicity results for 9 compounds evaluated by HGPRT locus in standard and suspension CHO assays. **Mutagenesis**, v.6, p.77-85, 1991.

MORAES, F.L. **Carotenóides: características biológicas e químicas**. Tese – Curso de especialização em qualidade de alimentos. Universidade de Brasília, 2006.

O'CONNOR, T.R.; BOITEAX, S.; LAVAL, J. Ring opened 7methylGuanine residues are a block to *in vitro* DNA synthesis. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 5879-5894, 1988.

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

PARK, J.S., CHEW, B.P., WONG, T.S. Dietary Lutein from Marigold Extract Inhibits Mammary Tumor Development in BALB/c Mice. **Biochemical and Molecular Roles of Nutrients**. July, 2009.

PIERCE, B. A. **Genética: Um Enfoque Conceitual**. Guanabara Koogan. Traduzido por Paulo Motta, 2004.

PRZEDPELSKA-WASOWICZ, E.M.; WIERZBICKA, M. Gating of aquaporins by heavy metals in *Allium cepa* L. epidermal cells. **Protoplasma**, v.21, Oct. 2010.

RAJU, J. *et al.* Low doses of carotene and lutein inhibit AOM-induced rat colonic ACF formation but high doses augment ACF incidence. **International Journal of Cancer**, v.113, p.798-802, 2005.

RANK, J.; NIELSEN, M.H.. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazine, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, v.390, p.121-127, 1997.

RIGONATO, J.; MANTOVANI, M.S.; JORDÃO, B.Q.. Mechanism of action of Chlorophyllin

21

R
E
V
I
S
T
A

against Mitomycin-C mutagenicity in *Allium cepa*. **Cytologia**, v.69, p.459-495, 2005.

RIOS, A.O.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Proteção de carotenóides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina. **Alimentos e Nutrição**, v.20, n.2, p.343-350, jan./mar. 2009.

RODRIGUES, A.A., SHAO, A. The science behind lutein. **Toxicology Letters**, v.150 p.57-83, 2004.

SASAKI, M. *Et al* Neurodegenerative influence of oxidative stress in the retina of a murine model of diabetes. **Diabetologia**: v.53, p.971-979, 2010.

STRINGHETA, P.C. *et al*. Lutein: antioxidant properties and health benefits. **Alimentos e nutrição**, v.17, n.2, p.229-238, 2006.

STURBELLE, R.T. *et al*. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da Aloe vera em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.20, v.3. p. 409-415, Jun./Jul. 2010.

TAO, K.S.; URLANDO, C.; HEDDLE, J.A. Mutagenicity of methylmethane- sulfonate in vivo at the dlb-1 locus and a lac I transgene. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 22, p.293-296,1993.

WATERS, M.*et al*. Antimutagenic profiles for some model compounds. **Mutation Research**, v.238, p.57-85, 1990.

22

WISEMAN, M. The Second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Expert Report. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.67, p.253-256, 2008.

ZHANG, J.*et al*. Sequence variants in antioxidant defense and DNA repair genes, dietary antioxidants, and pancreatic cancer risk. **International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, v.2, n.3, p.236-244, 2011.