

Avaliação da atividade mutagênica da miricitrina

Dariana Rambor¹, Ana Paula de Souza², Maurício Lehmann³, Ivana Grivicich³,
Rafael Rodrigues Dihl^{3,4}

¹Acadêmica do Curso de Farmácia/ULBRA-Canoas – Bolsista PROICT; ²Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA; ³Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA; ⁴Programa de Pós-Graduação em Odontologia/ULBRA.

Resumo

Os estudos toxicológicos de compostos naturais têm sido ferramentas importantes para a identificação de compostos químicos com potencial terapêutico, contribuindo para o desenvolvimento de fármacos. A miricitrina (MIR), flavonol presente em folhas e frutos de plantas da família *Myrtaceae*, possui ação anti-inflamatória, antidiabética e antioxidante em humanos. Em razão da escassez de estudos sobre a toxicidade genética da MIR, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial mutagênico da MIR *in vitro* em uma linhagem celular de mamíferos. Para isso, o Teste de Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese – CBMN foi escolhido para detecção de instabilidade cromossômica, expressa na forma de micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (PN) ou brotos nucleares (BN). A MIR foi testada nas concentrações de 10 µM, 21,25 µM e 42,5 µM por 4 e 24 horas em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1). Os resultados obtidos revelaram a ausência de genotoxicidade da MIR nas células CHO-K1 quando comparadas ao controle negativo (CN) no período de 4h. Já no período de 24h, a maior concentração da MIR (42,5 µM) induziu aumentos na frequência de MN e PN, quando comparado ao CN. Os dados apontam para a ação pró-oxidante da MIR na maior concentração e no tempo de tratamento prolongado.

Palavras-chave: Miricitrina, instabilidade cromossômica, micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas, brotos nucleares.

Abstract

Toxicological studies of natural compounds have been important tools for the identification of chemical compounds with therapeutic potential, contributing to the development of new drugs. Myricitrin (MIR), a flavonol present in leaves and fruits of plants of the *Myrtaceae* family, has anti-inflammatory, antidiabetic and antioxidant action in humans. Due to the scarcity of studies on the genetic toxicity of MIR, this study aimed to evaluate the mutagenic potential of MIR *in vitro* in a mammalian cell line. For this, the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay - CBMN was selected to detect chromosomal instability, expressed in the form of micronuclei (MN), nucleoplasmic bridges (NP) or nuclear buds (BN). MIR was tested at concentrations of 10 µM, 21.25 µM and 42.5 µM for 4 and 24 hours in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1). The results obtained revealed the absence of MIR genotoxicity in CHO-K1 cells when compared to the negative control (NC) in the period of 4h. In the 24-hour period, the highest concentration of MIR (42.5 µM) induced increases in the frequency of MN and NP, when compared to NC. The data point to the pro-oxidant action of MIR in the highest concentration and in the extended treatment time.

Keywords: Myricitrin, chromosomal instability, micronuclei, nucleoplasmic bridges, nuclear buds.

Introdução

A utilização de plantas e seus componentes como fonte alimentar e cuidados com a saúde é uma prática antiga, tornando-se um recurso terapêutico importante para muitas populações (HOBBS *et al.*,

2015, RAMOS *et al.*, 2019). No Brasil, há uma variedade de espécies de plantas ainda não estudadas, que merecem atenção, pois possuem propriedades farmacológicas que podem auxiliar no tratamento de doenças e assegurar o uso consciente pela população (GOIS *et al.*, 2016,

MICHELINI et al., 2018). A miricitrina (MIR), está presente em diversos alimentos, sendo muito utilizada como conservante (CASCAES et al., 2015). MIR pode ser consumida por meio de frutas e plantas tais como *Corylus avellana* (Avelã), *Myrica rubra* (Bayberry chinês), *Myrciaria cauliflora* (Jabuticaba), *Psidium guajava* L. (Goiaba) e *Eugenia uniflora* (Pitanga) (HOBBS et al., 2015, RAMOS et al., 2019). Estudos realizados com extratos de plantas indicam que a MIR possui ação antiproliferativa (SARKAR et al., 2020), anti-inflamatória (SUN et al., 2013, DOMITROVIĆ et al., 2015, KIM et al., 2019), antidiabética (AHANGARPOUR et al., 2018, GAL et al., 2019), antialérgica (SHIMOSAKI et al., 2014), além de antioxidante (CASCAES et al., 2015, LI et al., 2020).

Poucas informações estão disponíveis na literatura científica sobre o potencial mutagênico da MIR em células eucarióticas. Embora vários benefícios para a saúde possam ser adquiridos com o consumo da MIR, este polifenol também pode desenvolver a capacidade pró-oxidante e com isso demonstrar atividade genotóxica em células eucarióticas.

A análise de micronúcleos (MN) é usada como padrão de mutações cromossômicas em organismos eucarióticos, sendo, portanto, utilizada na detecção de agentes aneugênicos ou clastogênicos. O teste de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN) tem sido frequentemente empregado, uma vez que apresenta algumas vantagens, como a facilidade na identificação das células binucleadas portadoras de MN, o que torna o teste mais sensível e acurado. Adicionalmente, o teste CBMN permite a avaliação de instabilidade genômica e amplificação gênica relacionadas, respectivamente, a pontes nucleoplasmáticas (PN) e broto nuclear (BN) (FENECH, 2007).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a indução de alterações cromossômicas em células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1) expostas a MIR no teste CBMN. A linhagem celular CHO-K1 é amplamente utilizada e recomendada para a investigação da toxicidade genética de diferentes compostos (OECD, 2016).

Materiais e Métodos

Para a determinação da mutagenicidade da MIR, o teste CBMN foi realizado de acordo com Fenech (2007). Os experimentos foram realizados em duplicata, com dois períodos de tratamento (curto: 4h e longo: 24h) em dias diferentes para assegurar a reprodutibilidade do teste. As células CHO-K1 foram semeadas em uma densidade de 2×10^5 por poço em placas de 24 poços (TPP) e incubadas durante 24 horas em meio de cultivo completo.

Após, as células foram lavadas com solução salina e, em seguida, foram submetidas aos tratamentos por 4 e 24 h; (a) controle negativo (CN) (DMSO 1%), (b) controle positivo (CP) Bleomicina 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e (c) diferentes concentrações da MIR (42,5 μM , 21,25 μM e 10,62 μM). Transcorrido o período de tratamento, as células foram lavadas duas vezes com solução salina e adicionado meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Sigma-Aldrich) com citocalasina B (Sigma-Aldrich) à uma concentração de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por mais dois ciclos de divisão.

Após os tratamentos, as células foram lavadas com solução salina e tripsinizadas com 350 μL de tripsina (GIBCO), neutralizadas com 650 μL de meio de cultivo completo e transferidos 150 μL da suspensão de células para citocentrífuga de bancada (CIENTEC), sendo centrifugadas a 700 x g por 5 min. A coloração das lâminas foi realizada por panótico InstantProv (Newprov®). Após a secagem, a leitura das lâminas foi realizada em microscopia óptica com aumento de 400x, sendo analisadas 1000 células binucleadas por tratamento para a quantificação de MN, PN e BN.

Resultados e Discussão

As concentrações de MIR utilizadas neste estudo foram selecionadas com base em um experimento piloto para a avaliação da viabilidade celular. Apenas as concentrações não citotóxicas foram utilizadas no ensaio CBMN. Os resultados referentes à exposição das células CHO-K1 às diferentes concentrações de MIR são mostrados na Figura 1. Foram testadas as concentrações de 10,62, 21,25 e 42,50 μM de MIR pelo tempo de exposição de 4 e 24 horas. Quanto à avaliação da mutagenicidade, no período de 4h, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com MIR e o controle negativo, indicando a ausência de atividade mutagênica da MIR. Entretanto, no período de 24 h de exposição, foram observadas diferenças significativas nas frequências de indução de MN e PN, na concentração de 42,50 μM , em comparação ao controle negativo. Dessa forma, os dados apontam para a ação mutagênica de MIR na maior concentração.

Nossos achados estão de acordo com os estudos disponíveis na literatura. Hobbs *et al.* (2015) não observaram genotoxicidade da MIR no Teste de Ames, com cepas de *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*. Adicionalmente, não foram observadas alterações cromossômicas e danos no DNA nos testes de micronúcleos e cometa, respectivamente, *in vivo* em células de roedores. Os autores também testaram a MIR por 4 e 24 h de

exposição em células TK6 humanas e, neste sentido, obtiveram resultados diferentes. MIR não foi mutagênica no período de 4 h com ou sem ativação metabólica. No tratamento de 24 h, sem ativação metabólica, a MIR induziu um aumento significativo na frequência de MN. Perdomo et al. (2020) avaliaram a ação da MIR em *Drosophila melanogaster* utilizando o teste de mutação e recombinação somática (SMART) em larvas oriundas do cruzamento aprimorado, que possuem enzimas de metabolização da família CYP450 em níveis aumentados, e larvas provenientes do cruzamento padrão, que possuem essas enzimas em níveis basais. Os resultados obtidos pelos autores não apontaram para ação mutagênica da MIR em nenhum dos cruzamentos, demonstrando que a presença ou a ausência de metabolização não parece ter influência na atividade mutagênica de MIR. A linhagem celular CHO-K1 não é metabolicamente competente. Assim, a atividade mutagênica da MIR está possivelmente relacionada a ação direta da MIR sobre o DNA, em um tempo de exposição prolongado e em altas concentrações. De fato, compostos fenólicos, em altas concentrações, podem exercer atividade pró-oxidante por meio da formação de espécies reativas de oxigênio (CAO et al., 1997, MORISHITA e OHNISHI, 2001). Desta forma, podemos sugerir que a maior concentração de MIR aumentou a frequência de instabilidade cromossômica devido a sua ação pró-oxidante.

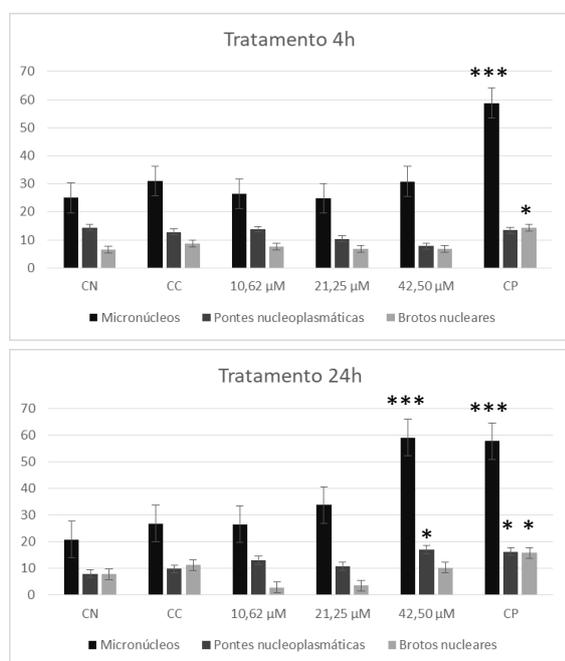


Figura 1. Efeitos da mutagenicidade da MIR no teste CBMN em células CHO-K1 no período de exposição de 4 e 24 horas. CN (controle negativo), CC (controle da cultura), CP (controle positivo). Anova post hoc Dunnet. *p<0,05, ***p<0,001

Considerações finais

A investigação dos potenciais mutagênicos de extratos de plantas e de seus produtos químicos majoritários, durante a avaliação pré-clínica, é extremamente importante, devido a questões de segurança para a saúde humana. Neste trabalho, a MIR apresentou atividade mutagênica, por meio da indução de MN e PN, na maior concentração (42,50 µM) no tratamento de 24 h. Ainda que o mecanismo de ação não tenha sido investigado neste estudo, a atividade mutagênica de MIR está possivelmente relacionada ao seu efeito pró-oxidante. Neste sentido, estudos adicionais devem ser focados na caracterização do perfil genotóxico de MIR e na investigação de sua ação quimio-preventiva.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Código de Financiamento 001, e da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

Referências

- AHANGARPOUR, Akram *et al.* Antioxidant effect of myricitrin on hyperglycemia-induced oxidative stress in C2C12 cell. **Cell Stress Chaperones**. v.23, p.773–781, 2018.
- CAO, Guohua *et al.* 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 22, p.749–60, 1997.
- CASCAES, Marcia Moraes *et al.* Constituents and pharmacological activities of Myrcia (Myrtaceae): A review of an aromatic and medicinal group of plants. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 16; p. 23881–23904, 2015.
- DOMITROVIĆ, Robert *et al.* Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. **Chemico-Biological Interactions**. v.230, p. 21–29, 2015.
- FENECH, Michael. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1084-104, 2007.
- GAO, Jing *et al.* Myricitrin exhibits anti-atherosclerotic and anti-hyperlipidemic effects in diet-induced hypercholesterolemic rats. **AMB Express**. V.9, 204, 2019.
- GOIS, Maria Antonia *et al.* Etnobotânica de espécies vegetais medicinais no tratamento de transtornos do sistema gastrointestinal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v.18, n. 2, p. 547-557, 2016.

HOBBS, Cheryl *et al.* Genotoxicity evaluation of the flavonoid, myricitrin, and its aglycone, myricetin. **Food and Chemical Toxicology**. v. 83, p. 283–292, 2015.

KIM, Young-Je *et al.* Supplementation of the Flavonoid Myricitrin Attenuates the Adverse Metabolic Effects of Long-Term Consumption of a High-Fat Diet in Mice. **Journal of Medicinal Food**. v.22, n.11, p.1151-1158, 2019.

LI, Ruiqian *et al.* Myricitrin protects against cisplatin-induced kidney injury by eliminating excessive reactive oxygen species. **International Urology and Nephrology**. v.52, p.187–196, 2020.

MICHELINI, Flavia *et al.* Virucidal, antiviral and immunomodulatory activities of β -escin and Aesculus hippocastanum extract. **Journal of Pharmacy Pharmacology**. v. 70, n. 11; p. 1561-1571, 2018.

MORISHITA, Hideko; OHNISHI Motoyo. Absorption, metabolism and biological activities of chlorogenic acids and related compounds. **Studies in Natural Products Chemistry**. v.25, p. 919–953, 2001.

OECD. **Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP)**. OECD, 2016.

PERDOMO, Renata *et al.* Myricitrin from Combretum lanceolatum Exhibits Inhibitory Effect on DNA-Topoisomerase Type IIa and Protective Effect Against In Vivo Doxorubicin- Induced Mutagenicity. **Journal of Medicinal Food**. v. 24, p. 273–281, 2021.

RAMOS, Andrezza *et al.* Pedra-ume caá fruit: An Amazon cherry rich in phenolic compounds with antiglycant and antioxidant properties. **Food Research International**. v. 123, p. 674–683, 2019.

SARKAR, Monaj Kurmar *et al.* Oxidative stress mediated cytotoxicity in leukemia cells induced by active phyto-constituents isolated from traditional herbal drugs of West Bengal. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 251; p. 112527, 2020.

SHIMOSAKI, Shunsuke *et al.* Anti-allergic effect of the flavonoid myricitrin from Myrica rubra leaf extracts in vitro and in vivo. **Natural Product Research**. v.25, p.374–380, 2014.

SUN, Gui-Bo *et al.* Inhibitory effects of myricitrin on oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.271, p.114–126, 2013.