

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas

**Efeito Genotóxico do Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) em
células somáticas de *Drosophila melanogaster***

Elaine Sílvia Dutra

Monografia apresentada à coordenação do
curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas

Uberlândia – MG
Dezembro – 2003

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas

Efeito Genotóxico do Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Orientado: **Elaine Sílvia Dutra**

Orientador: **Dr. Júlio César Nepomuceno**

Monografia apresentada à coordenação do curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

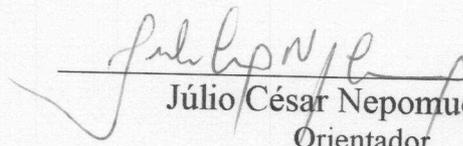
Uberlândia – MG
Dezembro – 2003

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas

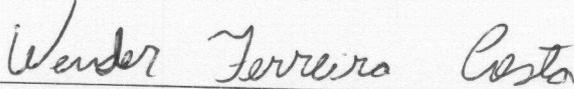
Efeito Genotóxico do Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Elaine Sílvia Dutra

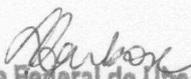
Aprovada pela Banca Examinadora em 11 / 12 / 03 Nota: 100,00


Júlio César Nepomuceno
Orientador

Bruno Lassmar Bueno Valadares
Membro da banca examinadora


Wender Ferreira Costa
Membro da banca examinadora

Uberlândia, _____ de _____ de 2003


Universidade Federal de Uberlândia
Prof.ª Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

EFEITO GENOTÓXICO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂) EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*

EFFECT GENOTOXIC FROM HYDROGEN PEROXIDE (H₂O₂) ON SOMATIC CELLS OF *Drosophila melanogaster*

Elaine Silvia DUTRA¹ & Júlio César NEPOMUCENO²

RESUMO: O agente químico Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) é um liberador de radicais livres que podem causar danos ao DNA e outras moléculas orgânicas. Ele assemelha-se à água na sua estrutura molecular e é muito difundido dentro e entre as células. O Peróxido de Hidrogênio atua no ciclo celular e tem capacidade de induzir a apoptose de algumas células. Considerando a propriedade de formar radicais livres do Peróxido de Hidrogênio, que induzem alterações na molécula de DNA, utilizou-se o teste da mancha da asa em *Drosophila melanogaster* (Somatic Mutation and Recombination Test – SMART) para avaliar seu potencial genotóxico. O teste permitiu concluir que o Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) na concentração de 10mM é genotóxico para os descendentes do cruzamento de alta bioativação - HB quando tratados cronicamente.

UNITERMOS: Peróxido de Hidrogênio, Radicais livres, SMART, *Drosophila melanogaster*

¹ Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia

² Biólogo, Doutor em Genética, Professor e Pesquisador na Universidade Federal de Uberlândia

INTRODUÇÃO

O Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) assemelha-se à água em sua estrutura molecular e é muito difundido dentro e entre as células. O H_2O_2 é um agente oxidante e por isso, é um potente liberador de radicais livres. Estes radicais podem causar danos às moléculas orgânicas, especialmente ao DNA, aos lipídeos e às proteínas. Erros no material genético, causados por radicais hidroxilas, podem ter uma significativa contribuição para o desenvolvimento de câncer (HALLIWELL, 1994).

A genotoxicidade de espécies reativas de oxigênio estão bem estabelecidas. Contudo, o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) é o principal mediador do estresse oxidativo que causa alteração no genoma (KONAT, 2003).

Fontes endógenas e exógenas de hidroperóxidos têm um importante papel na geração de radicais livres que danificam o DNA. As mutações induzidas por hidroperóxidos são uma consequência direta dos radicais gerados continuamente de sua decomposição (FERRER et al., 2002). Danos endógenos no DNA, causados por radicais livres Oxigênio liberados durante a respiração normal, podem ter significância na etiologia do câncer. Lesões no material genético podem inferir para mudanças genéticas que acontecem em diferentes estágios em progressão para metástases, e no entanto, há fatores na dieta, que reduz o impacto dos ataques dos radicais livres, sendo apropriados para a proteção contra o câncer (DUTHIE et al., 1996).

Muitos danos endógenos do DNA surgem da redução intermediária do oxigênio por qualquer ataque de bases ou da coluna deoxirribosil do DNA. Alternativamente, radicais oxigênicos podem atacar outros componentes celulares como os lipídeos, que geram intermediários reativos que pareiam com as bases do DNA. Lesões endógenas do ácido desoxirribonucleico são genotóxicas e induzem mutações que são comumente observadas em oncogenes e em genes supressores de tumor. Radicais oxigênio gerados durante a redução de O_2 podem atacar bases do DNA ou resíduos de desoxirribose para produzir bases danificadas ou quebrar fitas (MARNETT, 2000).

A todo tempo, estamos expostos a agentes que causam danos em nosso material genético. Estes agentes estão presentes no meio, tais como radiações ou agentes químicos. Vários medicamentos, defensivos agrícolas e, até mesmo, substâncias naturais podem possuir efeitos mutagênicos. Outros agentes possuem efeito protetor contra mutações, são antimutagênicos, que ativam os sistemas de reparo (agentes bioantimutagênicos) ou anulam a ação do agente mutagênico antes deste atacar o material genético (agentes desmutagênicos). Devido a isso, é importante a realização de estudos para detectar esses efeitos nas mais diversas substâncias com as quais estamos em contato ocasional ou constantemente (VALADARES, 2000).

De acordo com GRAF et al., (1984) a análise dos possíveis efeitos de substâncias mutagênicas e recombinogênicas pode ser realizada por meio do teste da mancha da asa, denominado **SMART** (Somatic Mutation And Recombination Test), que detecta diferentes tipos de manchas mutantes (simples ou gêmeas) que podem ser resultantes tanto de mutação, recombinação ou deleção, ocorridas no cromossomo nº 3 de *Drosophila melanogaster*.

O Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) utiliza machos de *D. melanogaster* da linhagem “mwh” cruzados com fêmeas virgens da linhagem “flr” (Cruzamento padrão) e machos “mwh” cruzados com fêmeas virgens da linhagem “ORR; flr³” (Cruzamento de alta bioativação), produzindo indivíduos trans-heterozigotos. Este teste detecta a perda de heterozigose em células somáticas resultantes de alterações genéticas ocorridas em células heterozigotas primordiais nos discos imaginais da larva.

A mosca da fruta, *D. melanogaster*, oferece uma série de vantagens como sistema de prova eucariótica de genotoxicidade *in vivo*. É fácil de cultivar, seu ciclo reprodutivo é curto e os ensaios somáticos são baratos porque requerem equipamento de laboratório básico e de baixo custo (SPANÓ et al., 1998).

Neste estudo utilizou-se o teste SMART para avaliar os possíveis efeitos genotóxicos do Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), para que o mesmo possa ser utilizado como controle positivo, gerador de radicais livres.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

Foram utilizadas linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster* (*ORR*, *flr*³, *mwh*) mantidas em frascos de ¼ de litro, contendo meio de cultura (820mL de água, 25g de fermento biológico – *Sacharomyces cerevisiae*, 11g de ágar, 150g de banana e 1g de Nipagin).

Agentes Químicos

O Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), um liberador de radicais livres, conhecido como água oxigenada, foi utilizado nas concentrações de 1mM, 5mM, 10mM e 20mM.

O Etil carbamato ($NH_2COOCH_2CH_3$, CAS nº 51-79-6, PM 89,10), o uretano (URE), foi dissolvido, em água destilada, instantes antes do tratamento, na concentração de 10mM sendo utilizado como o controle positivo. Para o controle negativo foi utilizada água bidestilada.

Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART)

Cruzamento padrão e de alta bioativação entre as linhagens mutantes

Foram realizados cruzamentos de fêmeas virgens *flr*³ /*In(3LR)TM3*, *rip sep l(3)89Aa bx*^{34e} e *Bd*^s, com machos *mwh/mwh* – Cruzamento padrão (ST), e fêmeas virgens *ORR*; *flr*³ /*In(3LR)TM3*, *ri p^p sep l(3)89Aa bx*^{34e} e *Bd*^s foram cruzadas com machos *mwh/mwh* – Cruzamento de alta bioativação

(HB) (GRAF *et al.*, 1996). Destes cruzamentos foram obtidos descendentes heterozigotos marcados (MH: *mwh + / + flr³*), e heterozigotos balanceados (BH: *mwh + / + TM3, Bd^s*).

O cromossomo balanceador *TM3 Bd^s* provoca, na fase larval, um recorte na borda da asa, deixando-as com aspecto serrilhado, enquanto os adultos trans-heterozigotos apresentam a borda da asa lisa, diferenciando-os fenotipicamente (GRAF *et al.*, 1984).

A coleta dos ovos foi realizada durante um período de 8 horas, em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% de ágar em água) e uma camada de fermento suplementado com sacarose. Após 72h, as larvas foram lavadas com água destilada e coletadas com o auxílio de uma peneira de malha fina.

Os tratamentos foram realizados com larvas de 3º estágio, provenientes dos dois cruzamentos (ST e HB). As larvas foram colocadas em frascos contendo 1,5g de meio de cultura alternativo (purê de batata instantâneo), onde adicionamos o agente oxidante Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) em diferentes concentrações, e frascos adicionados somente com uretano (URE).

Larvas de 3º estágio foram submetidas a um tratamento crônico, por um período de, aproximadamente, 48 horas, quando estas sobem às paredes dos frascos, passando para o estágio de pupa.

A análise do material foi feita coletando-se adultos emergentes portadores dos dois tipos de genótipos: *mwh + / + flr³* ou *mwh + / + TM3, Bd^s*, e conservando-os em etanol 70%. Retiramos as asas das moscas sob microscópio estereoscópico, marca Olympus[®], utilizando-se um par de pinças entomológicas. As asas foram montadas entre lâmina e lamínula com solução de Faure (goma arábica, 20mL de glicerol, 50g de hidrato cloral e 50mL de água) e, posteriormente, analisadas, quanto à ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, em microscópio óptico de luz, marca Olympus[®], com aumento de 400X.

Neste experimento, apenas os descendentes trans-heterozigotos marcados foram analisados, devido baixa ocorrência de manchas gêmeas, que são originadas exclusivamente por recombinação, não sendo necessária a análise dos indivíduos BH que confirmaria a ocorrência dessa alteração.

As lâminas foram analisadas sendo registrado o número de manchas, os tipos de manchas mutantes encontradas (simples ou gêmeas), o número de pêlos mutantes existentes em cada mancha e a posição em que eram encontrados na asa.

Para a análise estatística deste experimento foi aplicado o teste estatístico descrito por FREI & WÜRGLER (1988).

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta a freqüência de manchas mutantes encontradas nos descendentes trans-heterozigotos dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação metabólica (HB) tratados com Peróxido de Hidrogênio nas concentrações 1mM, 5mM, 10mM e 20mM, água e uretano (10mM). A tabela apresenta, também, o número de células com manchas simples pequenas, manchas simples grandes, manchas gêmeas e o número total de manchas mutantes.

Os resultados obtidos demonstraram que não houve aumento, estatisticamente significativo, nas freqüências de manchas mutantes, quando se compara o controle negativo com as diferentes concentrações utilizadas do Peróxido de Hidrogênio nos descendentes trans-heterozigotos do Cruzamento Padrão (ST).

A concentração de 10mM de H_2O_2 induziu um aumento significativo no número total de manchas e de manchas simples pequenas nos descendentes MH do Cruzamento de Alta Bioativação (HB), quando comparado ao controle negativo.

No tratamento com o uretano (10mM) observa-se um aumento, estatisticamente significativo, de manchas simples e total de manchas, nos descendentes do Cruzamento Padrão (ST), quando comparado

com o controle água. Nos descendentes do cruzamento de Alta Bioativação (HB) este aumento foi observado em todas as categorias de manchas (simples pequenas, simples grandes, gêmeas e total) para os tratamentos com uretano.

O aumento de manchas gêmeas, que indicam recombinação, não foi estatisticamente significativo em nenhum dos tratamentos com Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), como pode ser observado na Tabela 1.

As Figuras 1 e 2 apresentam as distribuições dos tamanhos de manchas simples (pequenas e grandes) por mosca, dos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB, respectivamente, tratados com H_2O_2 (1mM, 5mM, 10mM, 20mM), água (controle negativo) e uretano (10mM).

A predominância de manchas pequenas simples sobre manchas grandes, visualizada nas Figuras 1 e 2, indica a ocorrência de mutação nas células dos discos imaginais da larva em estágios tardios do seu desenvolvimento em um tratamento crônico de 48 horas, estando de acordo com GRAF et al., (1984) e SPANÓ et al., (2000).

Tabela 1. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos MH de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos ST e HB, tratados com Peróxido de Hidrogênio(H₂O₂) e somente uretano (10mM).

Tratamento	Número de Moscas	Manchas por (números de manchas) *Diagnóstico estatístico				Total
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes simples (>2 células) m=5	Gêmeas m=5	Total m=2	
Cruzamento ST						
Controle (água)	19	0,526 (10)	0,105 (2)	0,000 (0)	0,631 (12)	
Uretano (10mM)	20	1,950 (39)+	0,250 (5)i	0,100 (2)i	2,300 (46)+	
H ₂ O ₂ (1mM)	20	0,200 (4)-	0,000 (0)i	0,000 (0)i	0,200 (4)-	
H ₂ O ₂ (5mM)	19	0,421 (8)-	0,053 (1)i	0,053 (1)i	0,526 (10)-	
H ₂ O ₂ (10mM)	20	0,500 (10)i	0,100 (2)i	0,050 (1)i	0,650 (13)i	
H ₂ O ₂ (20mM)	20	0,400 (8)-	0,050 (1)i	0,000 (0)i	0,450 (9)-	
Cruzamento HB						
Controle (água)	19	0,842 (16)	0,053 (1)	0,053 (1)	0,947 (18)	
Uretano (10mM)	20	6,650 (133)+	2,700 (54)+	1,300 (26)+	10,650 (213)+	
H ₂ O ₂ (1mM)	20	0,900 (18)i	0,050 (1)i	0,050 (1)i	1,000 (20)-	
H ₂ O ₂ (5mM)	20	1,450 (29)i	0,050 (1)i	0,050 (1)i	1,550 (31)i	
H ₂ O ₂ (10mM)	20	1,700 (34)+	0,250 (5)i	0,000 (0)i	1,950 (39)+	
H ₂ O ₂ (20mM)	20	1,050 (21)i	0,050 (1)i	0,050 (1)i	1,150 (23)i	

*Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha < 0,05$.

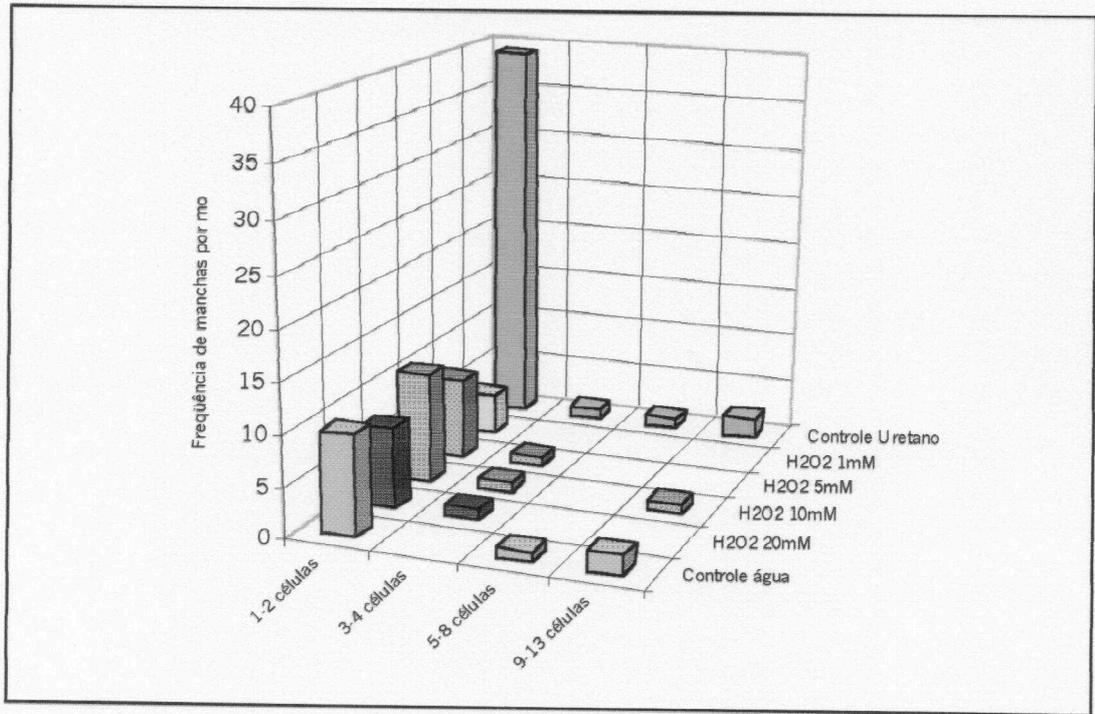


Figura 1 – Distribuição de manchas simples (pequenas e grandes) nos descendentes trans-heterozigotos do Cruzamento Padrão – ST

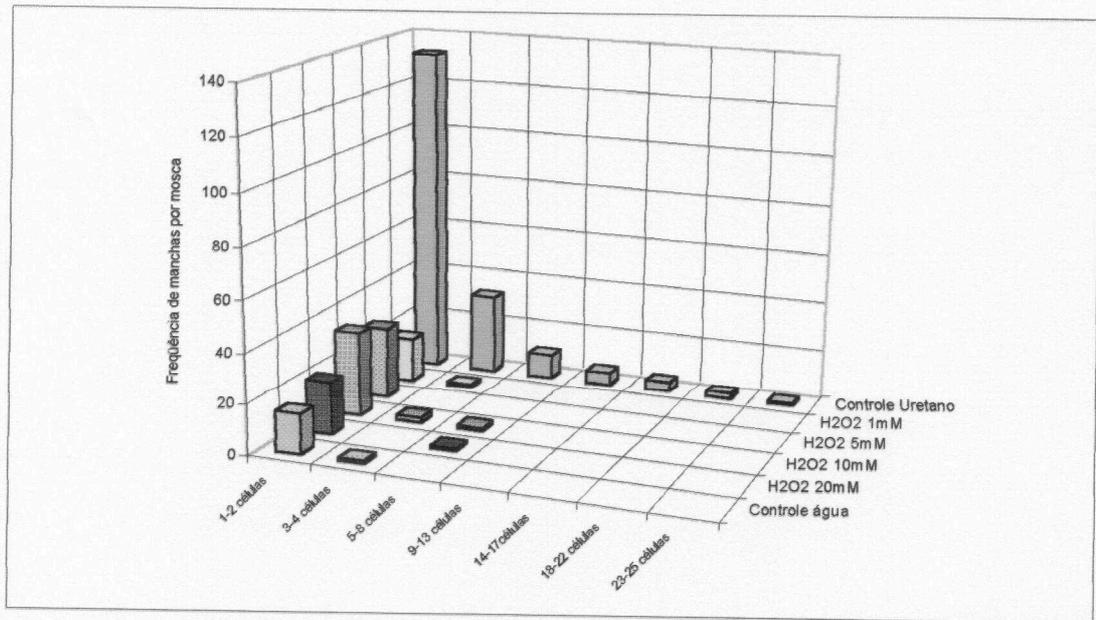


Figura 2 – Distribuição de manchas simples (pequenas e grandes) nos descendentes trans-heterozigotos do Cruzamento de Alta Bioativação - HB

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Nos descendentes trans-heterozigotos marcados, do Cruzamento Padrão, não foram observadas diferenças significativas no número de manchas mutantes pequenas simples nas concentrações utilizadas do Peróxido de Hidrogênio (1mM, 5mM, 10mM e 20mM). Este resultado mostra que o H_2O_2 , nas concentrações utilizadas não induziu uma atividade genotóxica nos descendentes do Cruzamento Padrão ST.

Ao analisarmos os descendentes do Cruzamento de Alta Bioativação (HB), constatamos que houve um aumento progressivo, nas frequências de manchas pequenas simples nas diferentes concentrações de H_2O_2 . Este aumento progressivo sugere uma relação dose-dependente. Com o aumento da dose para 10mM verifica-se um aumento estatisticamente significativo, nestas frequências de manchas (Tabela 1). No entanto, na maior concentração de H_2O_2 (20mM) ocorreu uma diminuição nas frequências de manchas, indicando, uma possível ação citotóxica do mesmo. A citotoxicidade leva a uma redução no aparecimento de manchas mutantes (COSTA, 2002).

O Peróxido de Hidrogênio reage rapidamente em contato com a água e matéria orgânica (PETIGARA et al., 2002). No SMART, as larvas são mantidas, durante todo o tratamento, em frascos contendo purê de batatas. É possível que durante o contato do H_2O_2 com o purê de batatas tenha ocorrido uma reação de oxidação com esse substrato, diminuindo assim, sua capacidade na indução da genotoxicidade, nas larvas de *D. melanogaster*. Resultados semelhantes foram verificados por Ferrer et al., (2002), que constataram mudanças no potencial genotóxico do H_2O_2 quando co-administrado com extratos vegetais. Os autores discutiram a possibilidade de uma reação química entre o agente oxidativo Peróxido de Hidrogênio e os componentes do extrato vegetal.

O aumento significativo, encontrado nos descendentes do cruzamento de alta bioativação, sugere, a princípio, a necessidade de bioativação do Peróxido de Hidrogênio pelas enzimas citocromo P450. A ação das enzimas do citocromo P450 evita efeitos tóxicos agudos de agentes químicos estranhos ao

organismo de animais, mas resultam em subprodutos oxidantes (HAWCO et. al., 1980 apud CECCHI, 1998). Sendo assim, é possível que a transformação, induzida no H_2O_2 pelas enzimas citocromo P450, tenha resultado em subprodutos genotóxicos.

Os descendentes de ambos os cruzamentos, ST e HB, tratados com o uretano apresentaram aumentos estatisticamente significativos ($P < 0,05$) nas frequências de manchas pequenas simples, quando comparados ao controle negativo. Contudo, o aumento significativo de manchas grandes simples e gêmeas foi constatado apenas nos descendentes do cruzamento de alta bioativação – HB (Tabela 1), como visto, também por COSTA (2002). As manchas gêmeas sugerem uma atividade recombinogênica do agente químico uretano (GRAF et al., 1984). No entanto, não foi observado aumento significativo de manchas gêmeas nos descendentes dos cruzamentos ST e HB nas diferentes concentrações de H_2O_2 , o que sugere que este agente oxidante, não apresentou atividade recombinogênica sob as condições mencionadas neste experimento.

Os resultados obtidos nesse estudo, em relação à ação genotóxica do H_2O_2 , estão de acordo com a revisão feita por CECCHI (1998) que constatou a ação mutagênica e o potencial citotóxico deste agente. CECCHI (1998) ressaltou que a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS), entre essas o Peróxido de Hidrogênio, originada por processos endógenos, é evidentemente grande, e desta forma, fatores preventivos, assim como de reparo, são críticos para a sobrevivência de organismos de vida aeróbica. As enzimas de reparo, que removem os danos oxidativos do DNA, ajudam a impedir o potencial citotóxico, mutagênico e carcinogênico dessas lesões.

De acordo com os resultados obtidos, nas condições experimentais aqui mencionadas, podemos concluir que o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) na concentração de 10mM é genotóxico para os descendentes HB quando tratados cronicamente. Dessa maneira, o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), nesta concentração, pode ser utilizado como controle positivo, gerador de radicais livres, em descendentes do Cruzamento de Alta Bioativação. Este agente químico possui um baixo custo, sendo de fácil aquisição para experimentos laboratoriais com substâncias seqüestradoras de radicais livres e

que requerem controle negativo. Sua utilização pode ser um avanço para a pesquisa em termos econômicos e de confiabilidade.

No entanto, faz-se necessária a realização de novos testes com diferentes concentrações para uma melhor análise do efeito genotóxico do (H₂O₂).

Agradecimentos: Os autores agradecem a UFU, FAPEMIG e SeSU – MEC pelo apoio financeiro na realização deste estudo, ao Dr. Ulrich Graf do Institute of Animal Science and Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zurich, pelo fornecimento das linhagens e outros, e ao Laboratório de Bioquímica da UFU pelo fornecimento do H₂O₂.

ABSTRAT: The chemical agent Hydrogen Peroxide (H₂O₂) is a generator of free radicals that can cause damage to DNA and to other biological molecules. It is the same as water in its molecular structure and it is very diffusible within and between cells. Hydrogen Peroxide acts at cellular cycle and it has capacity of inducing apoptosis from some cells. Considering that Hydrogen Peroxide is a liberator of free radicals that inducing alterations in the DNA molecule, were used the wing spot test in *D. melanogaster*, Somatic Mutation and Recombination Test – SMART to value its genotoxic potencial. The test permitted conclue that Hydrogen Peroxide in the concentration of 10mM is genotoxic to descendents from High Bioactivation Cross (HB) when treated chronically.

UNITERMS: Hydrogen Peroxide, free radicals, SMART, *Drosophila melanogaster*

GRAF, U., WÜRGLER, F.E., KATZ, A.J., FREI, H., JUDN, H., HALL, C.B. & KALE, P.G. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, v.6, p. 153-188, 1984.