

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Genética e Bioquímica

Pós-Graduação em Genética e Bioquímica



**Efeito protetor do extrato de tomate (*Lycopersicon
esculentum*) orgânico contra a ação genotóxica da
doxorrubicina, pelo teste SMART de asa, em
*Drosophila melanogaster***

Aluna: Elaine Sílvia Dutra

Orientador: Júlio César Nepomuceno

Uberlândia – MG

2007

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica

Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Efeito protetor do extrato de tomate (*Lycopersicon
esculentum*) orgânico contra a ação genotóxica da
doxorrubicina, pelo teste SMART de asa, em *Drosophila
melanogaster***

Aluna: Elaine Sílvia Dutra

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Bioquímica (Área Genética)

UBERLÂNDIA – MG

2007

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Efeito protetor do extrato de tomate (*Lycopersicon
esculentum*) orgânico contra a ação genotóxica da
doxorubicina, pelo teste SMART de asa, em *Drosophila
melanogaster***

Aluna: Elaine Sílvia Dutra

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Júlio César Nepomuceno

**Examinadores: Dra. Lúcia Regina Ribeiro
Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori**

Data da defesa: 27/02/2007

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

Dr. Júlio César Nepomuceno

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- D978e Dutra, Elaine Sílvia, 1978-
Efeito protetor do extrato de tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico contra a ação genotóxica da doxorubicina, pelo teste SMART de asa, em *Drosophila melanogaster* / Elaine Sílvia Dutra. - 2007.
- 42 f. : il.
- Orientador: Júlio César Nepomuceno.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Mutagênese - Teses. I. Nepomuceno, Júlio César. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 575.224.4

À minha mãe, Maria Sílvia Dutra, por ser meu porto seguro em todos os momentos da minha vida

Agradecimentos Especiais

Aos meus irmãos,

Janaína Silvia Dutra Senne, Itamar Moura Dutra,

Milton Moura Dutra Júnior e Tallita Flávia Sílvia Dutra

Aos meus cunhados Wesley Senne e Monalisa Franco Dutra

Aos meus sobrinhos Débora Aline Dutra Senne e

Humberto Franco Dutra

Pelo carinho, apoio, amizade e principalmente pela compreensão da minha
ausência em tantos momentos especiais para a nossa família

Aos amigos,

Robson Oliveira Júnior, Sabrina Vaz,

Shirleny Cardoso, Antônio Joaquim, Fernando Lourenço,

Cristina Celi, Wender Costa,

Wender Faleiro, Cristina Dias, Mírian Mendes,

Karen Martins e Carol Guimarães

Pelo apoio necessário para
realização deste trabalho e principalmente pela ótima convivência e amizade

À Marjorie Ester Dutra Corrêa pela chegada inesperada: minha doce surpresa

Ao Cláudio Corrêa pelo carinho e apoio

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno**, pela paciência, amizade e principalmente pelo compromisso da aprendizagem contínua.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade na leitura e sugestões neste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Ulrich Graf** do instituto de Toxicologia-Universidade de Zurich, Schwerzenbach, Suíça, pelo fornecimento das linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*.

Ao **Prof. Dr. Mário Antonio Spanó**, pelo carisma, pela amizade e incentivo durante a realização do trabalho.

Aos colegas do laboratório de **Mutagênese** da Universidade Federal de Uberlândia, desde o nível de graduação, mestrado e doutorado, pelo companheirismo e pela colaboração no meu crescimento profissional.

Aos colegas do laboratório de Citogenética e Mutagênese do UNIPAM (Centro Universitário de Patos de Minas), em especial ao Antonio Joaquim de Souza Castro e à Cristina Dias pelo constante apoio e companheirismo.

Aos técnicos do Laboratório de Mutagênese, **Maria Aparecida Vilela Gomes** e **Paulo Modesto**, pela sua amizade e confiança. À secretária do INGEB **Maria Marlene Macedo** pelo auxílio e pela amizade.

Aos colegas do laboratório de **Citogenética** da Universidade Federal de Uberlândia desde o nível de graduação, mestrado e doutorado e à **Prof^a Dra Sandra Morelli**, pelo constante apoio e amizade.

Aos colegas do Programa Especial de Treinamento (**PET/Biologia-UFU**), os quais considero minha segunda família pelo convívio ao longo desses seis anos e pelo carinho e amizade. E à **Prof^a Dra. Ana Maria Bonetti**, pelos ensinamentos dentro e fora do **PET**.

O trabalho foi realizado no Laboratório de Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia – MG.

Recebemos o apoio financeiro dos seguintes órgãos

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–CAPES
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico–CNPq
- Universidade Federal de Uberlândia – UFU
- Fundação de Amparo ao Estudo e Pesquisa de Minas Gerais–FAPEMIG

Sumário

Capítulo Geral

	Página
1. Introdução Geral	01
1.1 Antioxidantes e Radicais livres.....	01
1.2 Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) e Licopeno	04
1.3 Doxorubicina	07
1.4 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>	08

Capítulo Único

	Página
1. Introdução	15
Abstract	18
Resumo	19
2. Material e Métodos	20
2.1 Agentes químicos.....	20
2.2 Preparação do Tomate Orgânico (TOR).....	20
2.3 Linhagens estoques e testadoras de <i>Drosophila melanogaster</i>	21
2.4 Procedimentos para coleta de ovos	21
2.5 Procedimento Experimental	22
2.6 Preparação e análise microscópica das asas	22
2.7 Análise estatística	23
3. Resultados e Discussão	23
4. Referências Bibliográficas	32

Lista de Tabelas

Página

Tabela 1. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *D. melanogaster*, dos cruzamentos padrão e alta bioativação metabólica, tratados com Tomate Orgânico (TOR) em três diferentes doses 28

Tabela 2. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos e heterozigotos balanceados de *D. melanogaster*, do cruzamento padrão, tratados com Tomate Orgânico (TOR) em três diferentes doses associadas com DXR (0,125mg/mL) 29

Tabela 3. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos e heterozigotos balanceados de *D. melanogaster*, do cruzamento de alta bioativação metabólica, tratadas com Tomate Orgânico (TOR) em três diferentes doses, e associadas com DXR (0,125mg/mL) 30

Lista de Figuras

Introdução Geral

	Página
Figura 1. Fórmula estrutural do quimioterápico Doxorrubicina	09
Figura 2. Tipos de manchas.....	12
Figura 3. Fenótipo das asas.....	12

Capítulo Único

	Página
Figura 1. Fórmula estrutural do quimioterápico Doxorrubicina	17
Figura 2. Distribuição de manchas nos descendentes trans-heterozigotos do cruzamento padrão (ST)	31
Figura 3. Distribuição de manchas nos descendentes trans-heterozigotos do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB)	31

Lista de Abreviaturas

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

RNA – Ácido Ribonucleico

BH – Heterozigoto balanceado

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DDT - *para-diclorodifeniltricloroetano*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DXR – Doxorrubicina

ERO (ROS) – Espécies Reativas de Oxigênio

FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais

flr – *Flare*

GR – Grama

HB – *High Bioactivation Cross*

MH – Marcador trans-Heterozigoto

mM – Milimolar

mwh – *multiple wing hairs*

O₂ – Oxigênio

OH – Radical Hidroxila

ORR – *Oregon R (R)*

RL – Radicais Livres

SMART – *Somatic Mutation And Recombination Test*

ST – Standard Cross

TM3 bd^s – *Third Multiple3 Beaded Serrate*

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

UI/d – Unidade Internacional / dia

PVM – Polivitamínico e polimineral

1 – Introdução Geral

1.1 Antioxidantes e Radicais livres

Um radical livre é uma espécie química (átomo ou molécula) que possui um elétron desemparelhado no seu orbital de valência (número ímpar de elétron). Esta situação confere ao radical uma alta reatividade química, especialmente como agente oxidante, pela tendência de adquirir o segundo elétron para estabilizar o seu orbital de valência (PICADA *et al.* 2003). Radicais livres e outras espécies derivadas do oxigênio são constantemente geradas *in vivo* (HALLIWELL, 1994). Os vários mecanismos pelos quais estes agentes podem ser produzidos *in vivo* incluem a radiação ionizante, os compostos mutagênicos e carcinogênicos presentes no meio e até mesmo o processo endógeno normal de oxidação, em um organismo (HALLIWELL e ARUOMA, 1991).

A reatividade dos diferentes radicais livres varia, mas alguns podem causar danos severos para as moléculas biológicas, especialmente para DNA, lipídios e proteínas (HALLIWELL, 1994). Os compostos oxidantes compreendem, entre outros, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$), sendo classificados como espécies reativas de oxigênio (ROS-*reactive oxygen specie*)(JI, 1995). As ROS, que incluem os radicais livres, são consideradas a maior causa de iniciação e promoção de câncer. Estas moléculas instáveis são produzidas pelo metabolismo normal. Sua incidência aumenta no corpo durante infecções, inflamações e exercícios físicos, seguidos de exposição a fontes exógenas como a poluição, fumo, certos

medicamentos (por exemplo, acetaminophen/ paracetamol) e radiação, incluindo a radiação ultra-violeta (BOREK, 1997; BOREK, 2004).

Em um organismo, a existência de um desequilíbrio, em favor da geração excessiva de radicais livres, ou em detrimento da velocidade de remoção destas espécies, é conhecido como estresse oxidativo e pode conduzir à oxidação elevada de substratos biológicos. Em situação crônica, o estresse oxidativo no ambiente celular, pode causar sérios danos metabólicos e estar envolvido na origem e no desenvolvimento de muitas doenças (LUCESOLI, 1995).

A geração de radicais livres constitui uma ação contínua e fisiológica, cumprindo funções biológicas essenciais. São formados em um cenário de reações de óxido-redução, surgidos como resultados dessas reações. Podem ceder o elétron solitário e serem oxidados; ou podem receber outro elétron e serem reduzidos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). A condição de estresse oxidativo, como por exemplo, a exposição das células a pesticidas, facilita a liberação do ferro da proteína ferritina e deste modo, estes agentes podem elevar a formação de ROS, não apenas por passar pelo ciclo redox (reação de óxido-redução), mas também por facilitar a liberação do ferro permitindo-o que catalise a formação das espécies reativas (STOHS e BAGCHI, 1995).

Está claro que a presença dos radicais livres no sistema biológico pode levar a mutagênese e carcinogênese (SIMIC, 1988). De acordo com Valko *et al.* (2006), o estresse oxidativo induz ao desequilíbrio redox celular que é encontrado em várias células tumorais, comparando-se com células normais. O desequilíbrio redox, portanto, pode estar relacionado com a estimulação oncogênica. A mutação no DNA é um passo crítico na carcinogênese, e níveis

elevados de lesões oxidativas no DNA (8-OH-G) são observados em vários tumores, tendo uma forte relação entre este dano e a etiologia do câncer.

Além do câncer, os efeitos tóxicos dos radicais livres estão relacionados com doenças como porfirias, cataratas, sobrecarga de ferro e cobre, doença de Alzheimer, diabetes, aterosclerose, inflamações crônicas, doenças auto-imunes e situações de injúria por isquemia. Outras causas da ação de radicais livres é a ocorrência da doença de Parkinson, da artrite reumatóide e de doenças intestinais inflamatórias (LUCESOLI, 1995; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Contrariamente, existem compostos capazes de neutralizar a produção excessiva de radicais livres, estes compostos são chamados de antioxidantes. Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que quando presente em baixa concentração, comparado com um substrato oxidável, é capaz de atrasar ou evitar a oxidação deste mesmo substrato (HALLIWELL, 1990). Uma grande parte das defesas antioxidantes do corpo serve para minimizar alguma produção adicional de $\text{OH}^\bullet$ (HALLIWELL, 1994).

O sistema de defesa antioxidante é formado por compostos enzimáticos e não enzimáticos, estando presentes no organismo (dentro das células ou na circulação sanguínea) como nos alimentos ingeridos (MONTERO, 1996). As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GSH-Px) são consideradas as principais defesas antioxidantes intracelulares (HALLIWELL, 1987). Entre os antioxidantes fisiológicos não enzimáticos estão o urato, a bilerrubina, a carnosina e o ubiquinol (FREI *et al.* 1990).

Ainda dos componentes não-enzimáticos da defesa antioxidante, destacam-se alguns minerais (cobre, manganês, zinco, selênio e ferro),

vitaminas (ácido ascórbico, vitamina E, vitamina A), carotenóides (beta-caroteno, licopeno e luteína), bioflavonóides (genisteína, quercetina) e taninos (catequinas) (PAPAS, 1999).

Frutas e vegetais, que são uma rica fonte de carotenóides, promovem benefícios à saúde por diminuir o risco de várias doenças, particularmente certos cânceres e doenças oftálmicas. Os carotenóides são uma família de compostos de mais de 600 pigmentos lipossolúveis, que fornecem as colorações que vimos na natureza. Por exemplo, carotenóides são responsáveis pela cor vermelha dos tomates e a cor laranja das cenouras, e são parcialmente responsáveis pela queda da coloração, após a clorofila das folhas ter sido destruída (KRINSKY e JOHSON, 2005).

1.2 Tomate (*Lycopersicon esculentum*) e Licopeno

Os vegetais nos suprem não apenas de componentes nutritivos como as proteínas, carboidratos e vitaminas, mas também contém muitos tipos diferentes de compostos químicos funcionais. Eles nos auxiliam mantendo nossos corpos em boas condições física e mental. Estudos epidemiológicos recentes têm demonstrado que hábitos alimentares têm uma relação estreita com doenças relacionadas ao estilo de vida e o fator mais importante para manter nossos corpos em boa condição é um plano alimentar bem balanceado (REN *et al.* 2001).

As frutas e os vegetais são as principais fontes de antioxidantes, sendo as vitaminas C, E e os carotenóides, as moléculas presentes na dieta responsáveis por esta função (AMES *et al.* 1993). O consumo diário de vegetais

e frutas são benéficos para o nosso organismo, diminuindo, inclusive, a incidência de câncer (REHMAN *et al.* 1999) e aquelas ricas em carotenóides, como o beta-caroteno e outros pigmentos, auxiliam, também, na prevenção contra as doenças cardiovasculares (HALLIWELL, 1994).

Os vegetais nos fornecem valiosos nutrientes semelhantes às vitaminas, mas em concentrações muito pequenas. Eles possuem atividades metabólicas, semelhantes aos antioxidativos, antimutagênicos, repressores de alergia, reguladores de pressão sangüínea, ou supressor das ações do colesterol em nosso organismo. Vegetais cultivados organicamente têm muitas vantagens em relação aos cultivados sob o uso de defensivos químicos. Possuem sabor agradável, e não se têm problemas com resíduos químicos, sendo bem aceitos pelos consumidores com problemas alérgicos (REN *et al.* 2001).

O Tomate (*Lycopersicon esculentum*) é um fruto muito consumido nos cinco continentes. Em termos de minerais, relevantes para a nutrição humana, destacam-se: fósforo, cálcio e ferro. Quanto à riqueza em vitaminas, destacam-se a pró-vitamina A, com 735 a 1270 UI (a cada 100 gramas), das quais uma unidade equivale a 0,6 microgramas de beta-caroteno. São relevantes, também, o teor de vitamina C ou ácido ascórbico (15-23mg), algumas vitaminas B1 e riboflavina ou vitamina B2. O teor em vitaminas e minerais depende muito da cultivar e das condições sob as quais a cultura se desenvolve (FILGUEIRA, 2003).

O Tomate é considerado um fruto importante, na nossa dieta, exatamente pela presença de ácidos orgânicos, carotenóides e, sobretudo, à vitamina C,

cujo teor atinge o máximo quando o fruto está completamente maduro. O tomate verde ou pouco corado contém um alcalóide, a solanina, que pode torná-lo tóxico, à semelhança das folhas e dos caules (FILGUEIRA, 2003).

De acordo com Weisburger *et. al.* (2002), pessoas que vivem no Mediterrâneo, e em volta, apresentam um baixo risco de importantes enfermidades crônicas, incluindo doença coronária do coração e um número de tipos de câncer (mama, colo, próstata). Este baixo risco parece estar relacionado com uma dieta tradicional, consistindo principalmente de frutas e vegetais em geral, e especialmente com o consumo de tomates cozidos, associados com uma considerável quantidade de óleo de oliva. Estes resultados têm levado para a saúde pública recomendações para consumir mais vegetais, especialmente tomates cozidos com óleo de oliva.

A coloração do fruto é determinada por dois pigmentos: licopeno (vermelho) e caroteno (amarelo), que dependem das condições termoclimáticas, sendo o primeiro favorecido por temperaturas amenas, e o segundo pelo calor (FILGUEIRA, 2003).

Alguns estudos indicam que o suco de tomate (*Lycopersicon esculentum*), contendo licopeno e outros agentes antioxidantes em combinação, reforça o efeito inibitório do desenvolvimento de tumores em bexiga urinária de ratos (OKAJIMA *et al.* 1998). O consumo de tomate (*Lycopersicon esculentum*) diminui a modulação oxidativa do DNA em humanos (REHMAN *et al.* 1999) diminuindo o risco de neoplasias no trato digestivo (LA VECCHIA, 2002). Estudos recentes mostram que o consumo alimentar de tomates e de produtos

do tomate estão associados não somente com a redução de risco de câncer, bem como, de doenças cardiovasculares (RAO *et al.* 2000).

O Licopeno, carotenóide com propriedades antioxidantes, presente em muitos frutos e vegetais, é encontrado em maior quantidade no tomate. O Licopeno atua como um antioxidante muito potente, e este é, claramente, um importante mecanismo de ação do Licopeno. Ele pode prender oxigênio simples e reduzir a alterações na molécula de DNA. Em concentrações fisiológicas, ele pode inibir o crescimento de células tumorais humanas, por interferir com a sinalização do receptor do fator de crescimento e progressão do ciclo celular, especificamente, em células de câncer de próstata, sem evidência de efeitos tóxicos ou apoptose celular. Estudos de células humanas e animal têm identificado um gene, connexina 43, cuja expressão é regulada pelo Licopeno e que permite direcionar a comunicação gap junctional intracelular (gap junctional communication-GJC). A GJC é deficiente em muitos tumores humanos, e sua restauração ou regulação está associada com a redução da proliferação (HEBER e LU, 2002).

1.3 Doxorrubicina

A doxorrubicina (Andriamicina) é um potente e eficaz agente quimioterápico no tratamento de várias formas de câncer, mas seu uso tem sido limitado pelo desenvolvimento de toxicidade cardíaca (TALLAJ *et al.* 2005). A doxorrubicina tem uma alta afinidade por ferro inorgânico, Fe (III), e tem potencial para formar complexos doxorrubicina-Fe (III) em sistemas biológicos.

O envolvimento indireto do ferro é considerado importante na mutagenicidade oxidativa da doxorubicina (KOSTORYZ e YOURTEE, 2001).

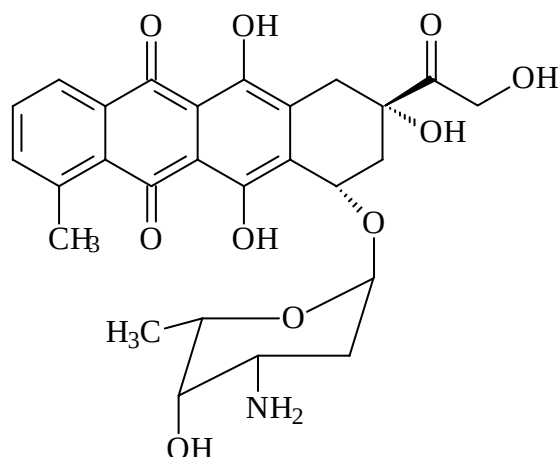


Figura 1 - Fórmula estrutural do quimioterápico doxorubicina.

1.4 Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em células da asa de *Drosophila melanogaster*

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, deleção ou não disjunção cromossômica, ocorridas no cromossomo nº 3 de *Drosophila melanogaster*.

O teste SMART de asa em *Drosophila melanogaster*, fundamenta-se na premissa de que, durante o desenvolvimento embrionário, grupos de células (os discos imaginais das asas) proliferam mitoticamente até o ponto em que se diferenciam, durante a metamorfose, em estruturas que originam as asas das moscas adultas. Este bioensaio faz uso de dois genes marcadores para a forma dos pêlos das asas: pêlos múltiplos (*mwh*, 3-0.3) e pêlos cujo formato lembra uma “chama de vela”, do inglês *flare* (*flr*³, 3-38.8) – baseando-se na indução de alterações genéticas que originam a perda de heterozigose em células larvais, que são heterozigotas para estes dois genes recessivos (GRAF *et al.* 1984).

Quando ocorre uma alteração genética em uma das células que estão se dividindo por mitose, é formado um clone de células mutantes, que pode ser detectado fenotipicamente como uma mancha mutante na superfície das asas dos adultos. Embora o número total de manchas forneça dados quantitativos sobre a atividade genotóxica do composto, o tipo de mancha pode revelar quais foram as diferentes lesões envolvidas na origem dos clones. Manchas mutantes simples (pequenas ou grandes) – expressando o fenótipo mutante *flr*³ ou *mwh* – indicam a ocorrência de mutações pontuais, alterações cromossômicas, assim como recombinação mitótica. Manchas gêmeas – formadas por células adjacentes *flr*³ e *mwh* – são originadas exclusivamente por recombinação, o que significa que este tipo de mancha pode fornecer indicações preliminares sobre a ação recombinogênica do composto (**Figura 2**)(GRAF *et al.* 1984).

É importante distinguir entre manchas simples pequenas (1-2 células mutantes) e manchas simples grandes (3 ou mais células mutantes) – especialmente porque as primeiras são formadas durante o último e/ou

penúltimo ciclos de divisão mitótica – que estão ocorrendo na pupa – e as grandes produzidas mais cedo, durante o desenvolvimento larval (GRAF *et al.* 1984).

Para a realização do teste para detecção de mutação e recombinação somática são utilizadas três linhagens:

1) Linhagem *multiple wing hairs (mwh)*: esta linhagem possui no cromossomo-3, um alelo mutante que altera o fenótipo dos pêlos da asa de *D. melanogaster*. Esse alelo está presente em homozigose na linhagem *mwh*. As células da asa da *D. melanogaster* são caracterizadas por possuir um único pêlo por célula, porém, quando esta possui o alelo mutante *mwh*, o fenótipo apresentado será de três ou mais pêlos por células.

2) Linhagem *flare-3 (flr³)*: esta linhagem possui também no cromossomo-3, porém, em uma posição mais próxima ao centrômero, um alelo mutante que altera o fenótipo dos pêlos da asa. O fenótipo provocado por este alelo mutante é um pêlo “deformado” que se assemelha a uma chama. Contudo, a linhagem não possui este alelo em homozigose nas células do seu corpo, pois seria letal para o indivíduo. Com isso, a linhagem estoque é mantida em um cromossomo o gene *flr³* e no mesmo *locus*, no outro cromossomo, um balanceador que possui múltiplas inversões, e recebe o nome de *TM3 bd^s*. Portanto, a mutação *flr³* será viável apenas quando algumas células do disco imaginal carregar a mutação.

3) Linhagem *ORR*: esta linhagem de *Drosophila melanogaster* foi construída com o objetivo de aumentar a capacidade metabólica na ativação promutágenos. Na linhagem resistente ao DDT, Oregon R (R), o gene RI na

posição 65,0 do cromossomo-2, é responsável para os altos níveis de expressão da citocromo P-450, típicas para esta linhagem. Por conseguinte, os cromossomos 1 e 2 das linhagens *mwh* e *flr*³ foram substituídos pelos cromossomos 1 e 2 da linhagem Oregon R (R) (FROLICH; WURGLER, 1989).

Para a realização dos experimentos são feitos dois tipos de cruzamentos:

1) Cruzamento padrão (ST – *Standard Cross*): fêmeas virgens *flr*³ cruzadas com machos *mwh*. (GRAF et al., 1989).

2) Cruzamento de alta bioativação (HB - *High Bioactivation Cross*): fêmeas virgens *ORR/ORR; flr*³ cruzadas com machos *mwh* (GRAF; VAN SCHAİK, 1992).

O cruzamento de alta bioativação metabólica (HB), permite a detecção de promutágenos devidos aos altos níveis de citocromo P-450 da linhagem Oregon R (R), enquanto o cruzamento padrão permite a detecção de mutágenos diretos.

Desses cruzamentos são obtidos dois tipos de descendentes: com marcador trans-heterozigoto (MH: *mwh* + */+ flr*³) que possuem asas fenotipicamente do tipo selvagem; e com balanceador heterozigoto (BH: *mwh* + */+ TM3, Bd^s*) asas fenotipicamente serrilhadas (**Figura 3**).

A mosca da fruta, *Drosophila 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).

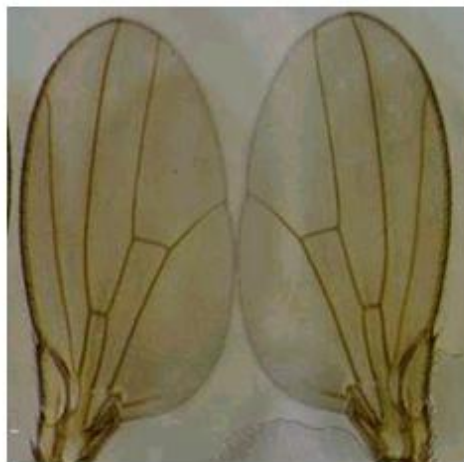


A



B

Figura 2: Tipo de Manchas: A-Mancha simples: pêlos *mwh* B-Mancha Gêmea: pêlos *flare* e *mwh*



A



B

Figura 3: Fenótipo da borda da asa A-Asa de borda lisa B-Asa de borda serrilhada

Capítulo Único



**Efeito protetor do tomate (*Licopersicon
esculentum*) orgânico contra a ação genotóxica da
doxorrubicina, pelo teste SMART de asa, em
*Drosophila melanogaster***

**Protector effect from organic Tomato (*Licopersicon esculentum*) against the
genotoxic action of the doxorrubicin on somatic cells of *Drosophila
melanogaster***

Sumário

Capítulo Único

	Página
1. Introdução	15
Resumo	18
Abstract	19
2. Material e Métodos	20
2.1 Agentes químicos.....	20
2.2 Preparação do Tomate Orgânico (TOR).....	20
2.3 Linhagens estoques e testadoras de <i>Drosophila melanogaster</i>	21
2.4 Procedimentos para coleta de ovos	21
2.5 Procedimento Experimental	22
2.6 Preparação e análise microscópica das asas	22
2.7 Análise estatística	23
3. Resultados e Discussão	23
4. Referências Bibliográficas	32

1.Introdução

O tomate (*Licopersicon esculentum*) tem, indubitavelmente, assumido a posição de alimento funcional, considerando a evidência epidemiológica da sua redução ao risco de certos tipos de câncer (NGUYEN e SCHWARTZ, 1999). Ele é um reservatório de diversas moléculas antioxidantes, como o ácido ascórbico, vitamina E, carotenóides, flavonóides e ácidos fenólicos (GEORGE et. al., 2004). Tomates também contêm uma moderada quantidade de α e β -caroteno e luteína. O β -caroteno é conhecido pela sua atividade de pró-vitamina A e a luteína por reduzir o risco de câncer do pulmão (SIES, 1991). O licopeno, um carotenóide sem atividade de pró-vitamina A, está presente em muitos frutos, vegetais e, ainda, em tomates e produtos processados do tomate, que constitui a maior fonte de licopeno na dieta Norte Americana (RAO e AGARWAL, 2000).

O consumo alimentar de licopeno está epidemiologicamente correlacionado com a minimização do risco de câncer de próstata e é considerado superior ao α e β -caroteno na inibição da proliferação celular de várias linhagens celular de câncer epitelial humano (GIOVANNUCCI,1999). O consumo de tomate e produtos do tomate é considerado como um indicador nutricional de bons hábitos alimentares e estilo de vida saudável (GEORGE et. al. 2004).

Nos últimos anos o uso de pesticidas na agricultura é crescente. Atualmente há mais de 1000 químicos classificados como pesticidas. Devido à grande quantidade destes químicos serem liberados diariamente no ambiente e muitos deles afetar organismos “não-alvo”, eles podem representar um risco potencial para a saúde humana (ZELJEZIC e GARAJ-VRHOVAC, 2001). A exposição ocupacional a pesticidas está associada a várias doenças neoplásicas. Em particular, um aumento significativo foi encontrado na incidência de mieloma múltiplo (LA VECCHIA et. al. 1989 apud ZELJEZIC e GARAJ-VRHOVAC, 2001).

REN et. al. (2001), em seus experimentos com vegetais orgânicos, demonstraram que algumas variedades de vegetais cultivados livres de pesticidas e com fertilizante orgânico teve uma antimutagenicidade muito alta

contra alguns compostos mutagênicos, em relação aos vegetais cultivados de modo geral. De acordo com Abreu Jr. e Stoltenborg, (1998) a agricultura orgânica é um sistema de produção comprometido com a saúde, a ética e que contribui para preservar a natureza. Aproveita com inteligência os recursos naturais, métodos tradicionais e as mais recentes tecnologias ecológicas.

O teste SMART (Somatic Mutation And Recombination Test) de asa em *Drosophila melanogaster*, fundamenta-se na premissa de que, durante o desenvolvimento embrionário, grupos de células (os discos imaginais das asas) proliferam mitoticamente até o ponto em que se diferenciam, durante a metamorfose, em estruturas que originam as asas das moscas adultas. Quando ocorre uma alteração genética, em uma das células que estão se dividindo por mitose, é formado um clone de células mutantes, que pode ser detectado fenotipicamente como uma mancha mutante na superfície das asas dos adultos. A análise das lesões induzidas é feita pela observação de grupos de células (clones mutantes), que expressam fenotipicamente os genes marcadores *flr*³ ou *mwh*, responsáveis por mudanças na forma dos pêlos ou tricomas (GRAF *et al.* 1984).

O cloridrato de doxorrubicina (DXR) é um potente agente antitumoral usado mundialmente, em diferentes formas, contra cânceres humanos. Estudos mostram que este agente tem um potencial de indução a danos genéticos em células tumorais em sistemas animais e humanos (GENTILE *et al.* 1998). Ele é capaz de gerar uma variedade de espécies de radicais livres no sistema celular e esta capacidade é considerada crítica para a sua ação antitumoral (KEIZER *et al.* 1990). Costa e Nepomuceno (2006) encontraram efeitos protetores de vitaminas antioxidantes (vitaminas C, E e β -caroteno) e poliminerais (cobre, selênio e zinco), contra a ação genotóxica do quimioterápico DXR, quando utilizaram a *Drosophila melanogaster* como organismo teste.

A terapia nutricional com antioxidantes, concomitante à administração de drogas antineoplásicas, apresenta vários benefícios ao tratamento de pacientes oncológicos. A oferta de vitaminas antioxidantes, como as vitaminas A, E e C, associada às drogas antitumorais, resulta em menores efeitos colaterais e permite que a continuidade do tratamento empregado não seja prejudicada, pois

a toxicidade causada pelas drogas antineoplásicas é fator limitante desta terapia. Desta forma, a terapêutica nutricional, baseada na utilização de antioxidantes, pode ampliar os conceitos da terapia oncológica atual e permitir melhores resultados quanto ao controle do câncer (SANTOS *et al.* 2001).

Deste modo, o objetivo deste estudo experimental foi avaliar possíveis efeitos genotóxicos do extrato tomate orgânico, livre de defensivos químicos, nas concentrações de 25%, 50% e 100% e seus possíveis efeitos antígeno-tóxicos contra a ação genotóxica do fármaco antineoplásico Doxorubicina (0,125mg), gerador de radicais livres.

1.1 Resumo

Alimentos ricos em carotenóides são utilizados na dieta habitual da população, sendo encontrados em frutos e em outros vegetais de pigmentação avermelhada como o tomate, a melancia e a cenoura. Esses carotenóides são agentes antioxidantes que seqüestram os radicais livres, substâncias altamente reativas produzidas no organismo, e que em excesso causa envelhecimento precoce e câncer. O licopeno é o carotenóide que está presente em alta concentração no tomate. O teste SMART de asa foi utilizado para verificar os possíveis efeitos antígeno-tóxicos e/ou genotóxicos do tomate orgânico em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Na avaliação da genotoxicidade foram utilizadas larvas de 48 horas, descendentes do cruzamento padrão (ST) e alta capacidade de bioativação (HB), que foram tratadas com extrato aquoso de tomate orgânico TOR (100%, 50% e 25%). O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos genotóxicos do tomate orgânico contra a ação genotóxica da DXR (0,125mg/ml), geradora de radicais livres. Os resultados obtidos demonstraram que nos descendentes de ambos os cruzamentos (ST e HB), tratados com TOR, não foram verificados aumentos, estatisticamente significativos, nas freqüências de manchas mutantes. Contudo, na associação do tomate orgânico, nas diferentes concentrações, com a DXR, ocorreu um aumento, estatisticamente significativo, de manchas mutantes em ambos os descendentes (ST e HB). Este aumento nas freqüências de manchas pode sugerir, a primeira vista, um efeito potencializador da DXR. No entanto, verifica-se que o aumento na freqüência total de manchas é devido a um aumento significativo na freqüência de manchas pequenas. O que leva a acreditar que este efeito, na realidade, não é potencializador, e sim, protetor. Concluimos, portanto, que o extrato aquoso de tomate orgânico não é genotóxico e pode ter papel importante como agente antígeno-tóxico.

UNITERMOS: *Lycopersicon esculentum*, *Drosophila melanogaster*, SMART, doxorubicina, radicais livres.

1.2 Abstract

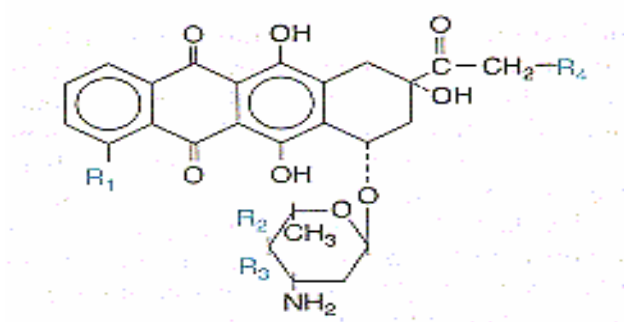
Food that is rich in carotenoids is used in the population's common diet, and is found in fruits and other vegetables of red pigmentation, such as tomatoes, water-melons and carrots. These carotenoids are anti-oxidizing agents that capture free radicals, which are highly reactive substances produced in the organism, and if in excess, provoke precocious old age and cancer. Licopeno is the carotenoid that is present in high concentration in tomatoes. The SMART wing test was used to verify the possible anti-genotoxic or genotoxic effects of the organic tomato in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. In the verification of genotoxicity, 48-hour larvae were used, and they are descendant from pattern cross (ST) and from high bioactivation capacity, and were treated with aqueous extract of TOR organic tomato (100%, 50% and 20%). The present study aimed at verifying the organic tomato genotoxic effects against the DXR genotoxic action (0,125 mg/ml), which generate free radicals. The results obtained showed that in the descendants of both crosses (ST and HB), treated as TOR, it was not possible to verify statistically significant increases in the frequencies of mutant spots in both descendants (ST and HB). This increase of frequencies of spots may suggest, at first sight, an enhancement effect of DXR. However, we can see that the increase in total frequency of spots is due to a significant increase in frequency of small spots, which leads us to believe that this effect is in reality not enhancement, but protector. This way, we can conclude that the aqueous extract of organic tomato is not genotoxic and may have an important role as anti-genotoxic agent.

Keywords: *Licopersicon esculentum*, *Drosophila melanogaster*, SMART, doxorubicin, free radicals.

2. Material e Métodos

2.1 Agentes Químicos

O Cloridrato de Doxorubicina (DXR) [(8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6,-trideoxi-alfa-1lixohexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-etóxi5, 12 naftacenodiona (CAS 23214-92-8), Eurofarma Laboratório Ltda., São Paulo, SP, Brasil], apresenta-se em frascos contendo 10mg de DRX liofilizado. Possui peso molecular 580,0 e fórmula molecular $C_{27}H_{29}NO_{11}.HCL$.



Sendo R1 - **OCH3**

R2 - **H**

R3 - **OH**

R4 - **OH**

Figura 1- Fórmula estrutural da doxorubicina.

2.2 Preparação do Tomate Orgânico

O tomate orgânico foi gentilmente cedido pela Fazenda Santa Teresa do Alto, situada em Itupeva-SP. Os frutos frescos foram lavados, pesados e usados para a preparação dos sucos. Os extratos aquosos foram preparados de acordo com Ito *et al* (1986). Os frutos foram triturados usando um mixer doméstico (Black & Decker SB30T) O suco obtido foi então filtrado utilizando-se uma gaze, no qual foi chamado de extrato de tomate orgânico puro (100%). O volume do extrato de tomate orgânico puro (100%), obtido de 100g do fruto, foi diluído em água nas concentrações de 25% e 50%.

2.3 Linhagens estoques de *Drosophila melanogaster*

O teste para detecção de mutação e recombinação somática em células de asas de *Drosophila melanogaster* (SMART) foi utilizado neste experimento para análise dos efeitos do tomate orgânico puro e em associação a DXR. Foram utilizadas linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*, que foram fornecidas pelo Dr. Ulrich Graf, do Instituto de Toxicologia da Universidade de Zurich, Schwerzenbach, Suíça.

Estas linhagens são mantidas em frascos de ¼ de litro, contendo meio de cultura para *Drosophila* (820mL de água, 25g de fermento biológico – *Saccharomyces cerevisiae*, 11g de ágar, 150g de banana e 1g de Nipagin).

Foram realizados cruzamentos de fêmeas virgens *flr³ /ln(3LR)TM3, rip sep I (3)89 Aa bx^{34e} e Bd^s*, com machos *mwh/mwh* – Cruzamento padrão (ST), e fêmeas virgens *ORR: flr³ /ln(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s* são cruzadas com machos *mwh/mwh* – Cruzamento de alta bioativação (HB) (GRAF *et al*, 1996). Destes cruzamentos foram obtidos descendentes heterozigotos marcados (MH: *mhw + / + flr³*), e heterozigotos balanceados (BH: *mhw + / + TM3, Bd^s*).

2.4 Procedimento para a coleta de ovos

A coleta dos ovos dos descendentes dos cruzamentos padrão e de alta bioativação ocorreu durante um período de 8 horas, em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% de ágar em água) e uma camada de fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*) suplementado com sacarose. Após 72±4 horas as larvas foram lavadas com água destilada e coletadas com o auxílio de uma peneira de malha fina.

2.5 Procedimento Experimental

As larvas de 3º estágio, provenientes dos dois cruzamentos (ST e HB) foram colocadas em frascos de vidro (2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura) contendo 1,5g de meio de purê de batatas instantâneo (marca HIKARI®) e 5ml de extrato aquoso de tomate orgânico associados ou não com DXR (0,125 mg/mL). Para o controle positivo foi utilizada a DXR e para o controle negativo água destilada estéril.

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.

2.6 Preparação e Análise Microscópica das asas

A análise do material foi realizada coletando-se adultos emergentes portadores dos dois tipos de genótipos: *mwh* + / + *flr*³ ou *mwh* + / + *TM3, Bd*⁶, e conservando-os em etanol 70%. Retiraram-se as asas das moscas sob microscópio estereoscópico, marca Olympus, utilizando-se um par de pinças entomológicas. As asas são 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. avaliou-se ambos os lados, dorsal e ventral, das asas, procurando identificar a presença de clones simples (fenótipo *flr*³ ou *mwh*) ou clones gêmeos (fenótipo *flr*³ e *mwh*).

Durante a análise microscópica, foram anotados o tamanho dos clones ou manchas (o número de células afetadas), assim como o tipo de clones (simples *mwh* ou *flr*³ e clones gêmeos) – devido à uma correlação existente entre o tempo de indução das lesões genéticas e o tamanho final dos clones.

O marcador *Bd*⁶ 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).

2.7 Análise Estatística

A análise estatística utilizada para a verificação da possível ação genotóxica do tomate orgânico foi realizada por meio do teste descrito por Frei e Würgler (1988). Para a análise estatística de antigenotoxicidade, as frequências de cada tipo de mancha por mosca, foram comparadas aos pares [ex: controle negativo *versus* DXR, DXR (agente genotóxico) isoladamente *versus* tomate orgânico + DXR], usando o teste *U* de Mann, Whitney e Wilcoxon (FREI; WÜRLER, 1995). As porcentagens de inibição do tomate orgânico foram calculadas, utilizando-se as frequências de clones 10^5 células, corrigidas pelo controle, como se segue: $(DXR - DXR \text{ associada ao tomate orgânico} / DXR) \times 100$ (Abraham, 1994).

3. Resultados e Discussão

A Tabela 1 mostra as frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH), do cruzamento padrão (ST) e alta bioativação metabólica (HB). Nos descendentes trans-heterozigotos a tabela nos informa que não houve aumento estatisticamente significativo ($\alpha = 0,05$) do extrato aquoso de tomate orgânico (TOR), nas três doses, quando comparado com o controle negativo, em todas as classes de manchas (simples pequenas, simples grandes, gêmeas e o total de manchas), assim como em ambos os cruzamentos. Portanto, o extrato do tomate orgânico, nas diferentes doses (25, 50 e 100%) não apresenta efeito genotóxico, pois é cultivado sem o uso de defensivos químicos.

Os dados da Tabela 1, observados nos descendentes trans-heterozigotos, do cruzamento padrão, demonstram que o quimioterápico doxorrubicina (DXR) está exercendo seu efeito genotóxico, aumentando o número de manchas mutantes, quando comparado ao controle negativo. Esse aumento é estatisticamente significativo ($\alpha = 0,05$) em todas as classes de manchas. A alta frequência de manchas, no cruzamento padrão, evidencia que a DXR é uma droga com ação genotóxica direta. O aparecimento de manchas

gêmeas indica uma atividade recombinogênica da DXR. Resultados da ação recombinogênica da DXR em células somáticas de *D. melanogaster* foi encontrado em Lehmann *et al.* (2003), Rodriguez-Arnaiz *et al.* (2004) e Costa e Nepomuceno (2006).

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos na análise dos descendentes MH do cruzamento ST tratados com a associação de DXR e diferentes concentrações dos extratos aquosos de tomate orgânico (TOR). Estes resultados mostraram que ocorreu um aumento, estatisticamente significativo, de manchas pequenas simples, manchas grandes simples, manchas gêmeas, bem como, para o total de manchas, nas as associações do TOR nas doses 50 e 100%. Na dose de TOR 25% estes aumentos, também, ocorreram, porém, os aumentos foram não significativos.

Os resultados da associação das diferentes doses de TOR (25, 50 e 100%), com a DXR, nos descendentes MH do cruzamento HB, podem ser verificados na Tabela 3. Nesta tabela verifica-se um aumento, estatisticamente significativo, nas freqüências de manchas mutantes, pequena simples, grandes simples, gêmeas e total de manchas, na associação de DXR e TOR 25%. Na associação DXR e TOR 50% estes aumentos ocorreram apenas para manchas grandes simples e total de manchas. Para a classe de manchas pequenas simples estes aumentos ocorreram, porém, não foram estatisticamente significativos. Na associação DXR e TOR 100% estes aumentos ocorreram, estatisticamente significativos, para manchas pequenas simples, grandes simples e total de manchas.

O aumento nas freqüências de manchas pode sugerir à primeira vista, um efeito potencializador entre TOR e DXR. No entanto, verifica-se que o aumento na freqüência total de manchas é devido a um aumento significativo na freqüência de manchas pequenas (Figuras 2 e 3). Nestas figuras verifica-se um aumento mais evidente nas classes de 1, 2, e de 3 a 4 células. Esta avaliação nos leva a acreditar que este efeito, na realidade, não é potencializador e sim protetor.

Esta idéia fica mais clara quando se analisa a relação da formação de clones (*mwh* e *flr*³) e a idade da mosca. Os discos imaginais são tecidos que

crecem, continuamente, por divisão mitótica, em todo período do desenvolvimento larval. Os discos que compõem as asas consistem de aproximadamente 50 a 100 células, que atingem aproximadamente 25.000 células no início do estágio de pupa, quando se inicia a diferenciação das asas (Ransom, 1982) (in Graf, 1995). A contínua proliferação celular, durante o desenvolvimento da larva, leva a um aumento no número de células alvo, presentes no disco imaginal. Em contraste, espera-se que o tamanho do clone induzido, diminua com a idade da larva.

Sendo assim, existe uma clara correlação entre o tempo de indução e a frequência de manchas, bem como o tamanho das mesmas. Nas larvas jovens são formadas poucas manchas, mas de tamanhos grandes, enquanto que nas larvas mais velhas as frequências são consideravelmente maiores, mas os tamanhos das manchas são menores (GRAF, 1995). Dessa maneira, é possível que o tratamento do TOR, nas diferentes doses, tenha atuado inibindo ou retardando a ação da DXR sobre a larva. Esta provável inibição ou retardo fez com que as larvas atingissem um estágio mais adiantado, sem a ação da DXR e, com isso, o surgimento de manchas menores em maior quantidade, conforme explica Graf (1995).

No entanto, Frei e Würzler (1996) afirmam que clones grandes, induzidos pela camptothecin (um inibidor de DNA topoisomerase) podem ser devido a um retardo no desenvolvimento larval, combinado com a instabilidade do agente químico, e não descartam a possibilidade de que alguns dos clones grandes serem constituídos pela soma de pequenos clones contíguos. Esta mesma possibilidade é também discutida por Torres et al. (1998), Nepomuceno (1999) e Valadares (2002).

Contraditoriamente, verifica-se, nas Figuras 2 e 3, um aparecimento de manchas grandes (33-64; 65-128) em ambos dos descendentes (ST e HB) tratados com diferentes doses de TOR (25, 50 e 100%) em associação com DXR. Esta distribuição de manchas grandes não foi verificada nos descendentes tratados somente com DXR. Contudo, é importante entender que o tamanho de uma mancha reflete o número de divisões celulares que ocorreram depois de induzida a alteração genética na linhagem celular. Com isso, após n divisões

celulares seriam esperadas 2n células mutantes (GRAF *et al.* 1989). De acordo com essas observações, verificam-se, nos tratamentos com TOR associados com DXR, o aparecimento de manchas mutantes grandes, mostrando uma ação precoce durante o desenvolvimento larval, como propõe Frei e Würgler (1996) na formação de clones grandes. No entanto, acreditamos que este aumento se deve ao fato de que na presença do TOR (25, 50 e 100%) a ação citotóxica da DXR foi inibida de alguma forma. Sendo assim, aquelas células do início do desenvolvimento, que seriam eliminadas, são preservadas, na presença do TOR, surgindo posteriormente como clones de células mutantes. Este efeito protetor, envolvendo a inibição da ação citotóxica de agentes químicos, foi, também, proposto por Costa e Nepomuceno (2003), em *Drosophila melanogaster*, na avaliação do chá do cogumelo do sol contra a genotoxicidade do uretano.

Os mecanismos usados pelo TOR para inibir a genotoxicidade da DXR não foram analisados diretamente neste trabalho. Contudo, devido à ação geradora de radicais livres pela DXR e sua intercalação com a molécula de DNA (KEIZER *et al.*, 1990), é possível propor os mecanismos de proteção do TOR contra a ação genotóxica da DXR. É possível, que nestas condições experimentais propostas, que tenha ocorrido uma ação desmutagênica do TOR. A ação desmutagênica é caracterizada pela inativação química ou enzimática do agente genotóxico (KADA *et al.*, 1982). Neste caso, é possível que o TOR tenha inativado a DXR, ou seus produtos metabólitos, que são os radicais livres gerados na transformação deste agente genotóxico. Esta inativação ocorreu, provavelmente, pela presença de carotenóides (licopeno) no tomate. O Licopeno, carotenóide com propriedades antioxidantes, presente em muitos frutos e vegetais, é encontrado em maior quantidade no tomate. O Licopeno atua como um antioxidante muito potente, e este é, claramente, um importante mecanismo de ação do Licopeno (HEBER e LU, 2002).

O Tomate é um fruto rico em vitaminas, destacando-se a pró-vitamina A, com 735 a 1270 UI (a cada 100 gramas). São relevantes, também, o teor de vitamina C ou ácido ascórbico (15-23mg), algumas vitaminas B1 e riboflavina ou vitamina B2 (FILGUEIRA, 2003). É possível que estas vitaminas, encontradas

no tomate, tenham, também, induzido uma ação desmutagênica contra ação da DXR. Resultados similares da ação desmutagênica de vitaminas (vitamina C) foram observados em linfócitos humanos *in vitro* (AMARA-MOKRANE *et al.* 1996). Esta ação desmutagênica da vitamina C, envolvendo a inativação química ou metabólica do mutágeno, foi proposta, também por KURODA *et al.* (2001). A atividade protetora de vitaminas antioxidantes, especialmente a vitamina C, tendo como mecanismo de ação o seqüestro de radicais livres gerados pela DXR, foi proposto, também, por ANTUNES *et al.* (1999) e Costa e Nepomuceno (2006). Os Carotenóides, de acordo com Picada *et al.* (2003), têm uma atividade estabilizadora principalmente do oxigênio singlete, que transfere sua energia de excitação à molécula antioxidante.

Sendo assim, a administração simultânea da DXR com o TOR possibilitou, provavelmente, uma interação direta entre os constituintes do TOR e a DXR, ou seus metabólitos, levando a redução da atividade genotóxica e citotóxica.

Podemos concluir, portanto, que nas condições experimentais e nas doses testadas no presente estudo, o extrato tomate orgânico não é genotóxico e foi protetor contra os efeitos genotóxicos do quimioterápico DXR, gerador de radicais livres, em *Drosophila melanogaster*.

Tabela 1. Frequência de manchas mutantes, observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) e alta bioativação metabólica (HB), tratados com tomate orgânico (TOR) em três diferentes doses

Manchas por indivíduo (No. de manchas) diag. Estatístico ^a													
Tratamento			Pequenas simples		Grandes simples		Gêmeas		Total		manchas		
DXR (mg/mL)	TOR (%)	Nº de Moscas	(1-2 cels) ^b <i>m</i> = 2		(>2 cels) ^b <i>m</i> = 5					<i>m</i> = 2		mwh ^c	
Cruzamento ST													
0	0	40	0,45 (18)		0,13 (05)		0,05 (02)		0,63 (25)			23	
0	25	40	0,30 (12)	-	0,13 (05)	i	0,05 (02)	i	0,48 (19)	-		19	
0	50	40	0,48 (19)	-	0,05 (02)	-	0,05 (02)	i	0,58 (23)	-		23	
0	100	40	0,45 (18)	-	0,10 (04)	i	0,03 (01)	i	0,58 (23)	-		23	
0,125	0	40	2,40 (96)	+	1,73 (69)	+	1,43 (57)	+	5,55 (222)	+		200	
Cruzamento HB													
0	0	40	0,68 (27)		0,20 (08)		0,05 (02)		0,93 (37)			36	
0	25	40	0,50 (20)	-	0,03 (01)	-	0,03 (01)	i	0,55 (22)	-		22	
0	50	40	0,68 (27)	-	0,13 (05)	-	0,08 (03)	i	0,88 (35)	-		36	
0	100	40	0,78 (31)	-	0,05 (02)	-	0,08 (03)	i	0,90 (36)	-		36	
0,125	0	40	4,48 (179)	+	3,25 (130)	+	3,45 (138)	+	11,18 (447)	+		427	

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo em relação ao controle negativo; -, negativo; i, inconclusivo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.
DXR, Doxorubicina; TOR, Tomate orgânico

Tabela 2. Frequência de manchas mutantes, observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento padrão (ST), tratados com tomate orgânico (TOR), em três diferentes doses, e doxorubicina (0,125 mg/mL)

Manchas por indivíduo (No. de manchas) diag. Estatístico ^a									
Tratamento			Pequenas simples	Grandes simples	Gêmeas		Total	manchas mwh ^c	
DXR (mg/mL)	TOR (%)	Nº de Moscas	(1-2 cels)b	(>2 cels)b					
0	0	40	0,18 (07)	0,03 (01)	0,03 (01)		0,23 (09)		9
0,125	0	40	2,40 (96)	+ 1,73 (69)	+ 1,43 (57)	+	5,55 (222)	+	200
0,125	25	40	2,78 (111)	- 2,00 (80)	- 1,63 (65)	-	6,40 (256)	-	243
0,125	50	40	4,40 (176)	* 4,23 (169)	* 3,05 (122)	*	11,68 (467)	*	418
0,125	100	40	5,10 (204)	* 3,15 (126)	* 3,00 (120)	*	11,25 (450)	*	425

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1995): Teste U - Mann, Whitney: * = redução estatisticamente Significativa (comparado com o controle doxorubicina 0,22mM). Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

DXR, Doxorubicina; TOR, Tomate orgânico.

Tabela 3. Frequência de manchas mutantes, observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com tomate orgânico (TOR), em três diferentes doses, e doxorubicina (0,125 mg/mL)

Manchas por indivíduo (No. de manchas) diag. Estatístico ^a											
Tratamento			Pequenas simples		Grandes simples		Gêmeas		Total		manchas mwh ^c
DXR (mg/mL)	TOR (%)	Nº de Moscas	(1-2 cels)b	(1-2 cels)b	(>2 cels)b	(>2 cels)b					
0	0	40	0,68 (27)	0,20 (08)	0,05 (02)	0,90 (36)					
0,125	0	40	4,48 (179)	+	3,25 (130)	+	3,45 (138)	+	11,18 (447)	+	427
0,125	25	40	9,08 (363)	*	6,88 (275)	*	5,53 (221)	*	21,48 (859)	*	812
0,125	50	40	5,08 (203)	-	4,38 (175)	*	3,08 (123)	-	12,53 (501)	*	476
0,125	100	40	9,63 (385)	*	4,90 (196)	*	3,93 (157)	-	18,45 (738)	*	698

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1995): Teste *U* - Mann, Whitney: * = aumento estatisticamente significativo (comparado com o controle doxorubicina 0,125 mg/mL). Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

DXR, Doxorubicina; TOR, Tomate orgânico.

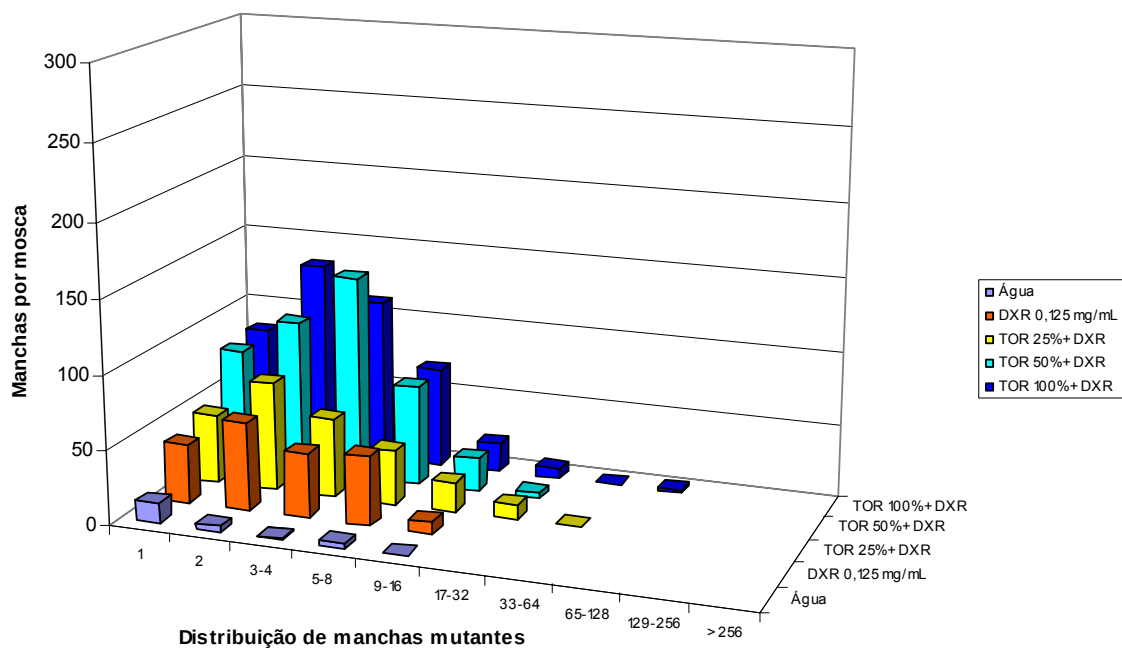


Figura 2. Distribuição de manchas mutantes observadas em asas de *Drosophila melanogaster*, dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH), provenientes do cruzamento padrão (ST)

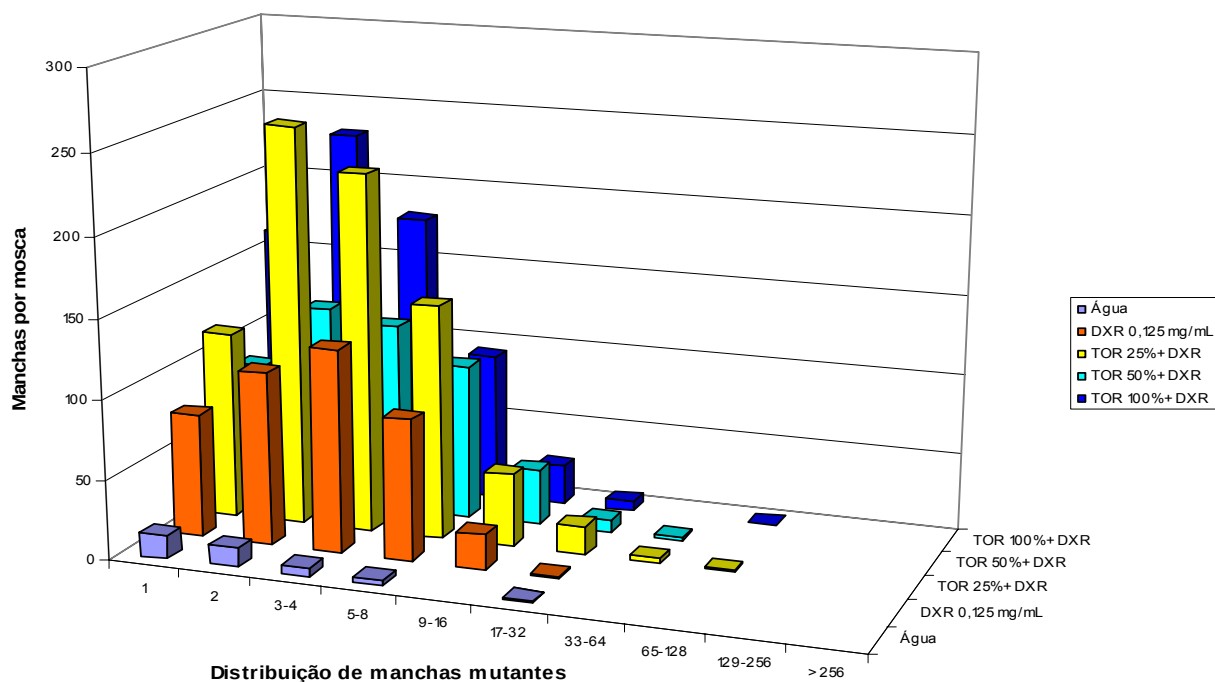


Figura 3. Distribuição de manchas mutantes observadas em asas de *Drosophila melanogaster*, dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH), provenientes do cruzamento de alta bioativação (HB)

5 - Referências Bibliográficas

ABRAHAM SK. 1994. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. **Mutagenesis**, **9**:383-386.

ABREU JR, H., STOLTENBORG, J. 1998. A agricultura orgânica e o mercado de frutas e hortaliças orgânicas: Panorama mundial e situação no estado de São Paulo. **Agricultura Biodinâmica**. Ano 15, nº 80, p.9-14.

AMARA-MOKRANE, Y. A.; LEHUCHER-MICHEL, M. P.; BALASARD, G.; DUMENIL, G.; BOTTA, 1996. A. Protective effects of alpha-hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. **Mutagenesis** **11**: 161-167.

AMES, B.N., SHIGENAGA, M.K., HAGEN, T.M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. **90**: 7915-7922

ANTUNES, L, M. G.; DARIN, J. D. C.; BIANCHI, M. L. P. 1999. Anticlastogenic Effect of Vitamin C on Cisplatin in vivo. **Genetics and Molecular Biology** **22**: 415-417.

BOREK, C. 1997. Antioxidants and Cancer. **Science and Medicine** **4**:51-62.

BOREK, C. 2004. Dietary Antioxidants and Human Cancer. **Integrative Cancer Therapies**. **3**:333-341.

COSTA, W.F.; NEPOMUCENO, J.C. 2006. Protective Effects of a Mixture of Antioxidant Vitamins and Mineral on the Genotoxicity of Doxorubicin in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mol. Mutagen.**, **47** (1): 18-24.

FERREIRA, A.A.L., MATSUBARA, L.S. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Rev.Assoc.Med.Bras.** 43 (1): 61-68.

FILGUEIRA, F.A.R. Parte 1: Tomaticultura /N: **Solanáceas: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, pimenta, berinjela e jiló.** Lavras: UFLA. p.6-7.2003.

FREI, H.; WÜRGLER, F.E. 1988. Statistical Methods to decide wether mutagenicity test data from Drosophila assays indicate a positive, negative or inconclusive result. **Mutat Res** 203: 297-308.

FREI H, WÜRGLER FE.1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in Drosophila. **Mutat Res**, **334**: 247-258.

FREI, H.; WÜRGLER, F.E. 1996. Induction of somatic and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Mutagenesis**, 11: 315-325.

FREI, B.,KIM, MC.,AMES, B.N. 1990. Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. **Proc. Natl. Acad.Sci.USA.**87: 4879-4883.

GENTILE, J. M., RAHIMI, S., ZWIESLER, J., GENTILE, G. J., FERGUSON, L. 1998. Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents. **Mutation Research**. V. 402. 289-298.

GEORGE, B., KAUR, C., KHURDIYA, D. S., KAPOOR, H. C. 2004. Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype. **Food Chemistry**. 84, 45-51.

GIOVANNUCCI, E. 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: review of epidemiologic literature. **Journal of National Cancer Institute**. 91, p.317-331.

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

GRAF, U.; FREI, H., KÄGI, A., KATZ, A. J., WÜRGLER, F. E. 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutat. Res** 222: 359-373.

GRAF, U. 1995. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Experientia**, 51: 168-173.

GRAF U, Spanó MA, Rincón JG, ABRAHAM SK, ANDRADE HH.1996. The wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: Na efficient tool for detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxic. **Afr Newslett on Occup Health and safety** 6: 9-13.

HALLIWELL, B. 1987. Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEB**. 1: 358-364.

HALLIWELL, B. 1990. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radic. Res. Commum**. 9: 1-32.

HALLIWELL, B., ARUOMA, O.I. 1991. DNA damage by oxygen-derived species: Its mechanism and measurement in mammalian systems. **FEBS**.281 (1,2): 9-19.

HALLIWELL, B. 1994. Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. **Lead Review Article**. I: 253-265.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, JMC. 1999. Free radical, other reactive species and disease.In: **Free radicals in biology and medicine**.3rd Oxford:Clarenton Press. p.617-783.

HEBER, D.; LU, Q.Y. 2002. Overview of mechanisms of action of lycopene. **Exp. Biol. Med**. 227 (10): 920-923.

ITO Y, MAEDA S, SUGYAMA T. 1986. Suppression of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced chromosome aberrations in rat bone marrow cells by vegetable juices. **Mutat Res** 172: 55–60.

Jl, L.L. 1995. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. **Free Radic. Biol. Med**. 18 (6): 1079-1086.

KADA, T., INOUE, T., NAMIKI, M. 1982. Environmental desmutagens and antimutagens, in: E. J. Krekowsk (Ed.), **Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Plant Biology**, Praeger, New York, pp. 133-152.

KEIZER, H. G., PINEDO, H. M., SCHUURHUIS, G.J., JOENJE, H. 1990. Doxorubicin (adriamycin): A critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. **Pharmacology & Therapeutics**. 47: 219-231.

KOSTORYZ, E. L., YOURTEE, D. M. 2001. Oxidative mutagenesis of doxorubicin-Fe(III) complex. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Vol. 490(2), p. 131-139.

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

KURODA, Y.; SHIMA, N.; YAZAWA, K.; KAJI, K. 2001. Desmutagenic and bio-antimutagenic activity of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in cultured Chinese hamster V79 cells. **Mutat. Res** 497: 123-130.

LA VECCHIA, C. 2002. Tomatoes, lycopene intake, and digestive tract and female hormone-related neoplasms. **Exp. Biol. Med.** 227 (10): 860-863.

LEHMANN, M.; FRANCO, A.; VILAR, K. S. P.; LUKZA REGULY, M.; ANDRADE, H. H. 2003. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutat Res** 539: 167-75.

LUCESOLI, F.,FRAGA, C. 1995. Evaluación del estres oxidativo. **Antioxid. Calid. Vida**. 1 (4): 8-13.

MONTERO, M. 1996. Los radicales libres y las defensas antioxidantes: revisión. **Ann. Fac. Med.** 57 (4): 278-281.

NEPOMUCENO, J.C. 1999. Efeito protetor da *Moringa oleífera* contra mutações e recombinações somáticas, induzidas pelo uretano e mitomicina C em *D. melanogaster*. **Tese de Doutorado**, Universidade de Brasília, Brasília, DF. 109p.

NGUYEN, M.L., SCHWARTZ, S.J. 1999. Lycopene: chemical and biological properties. **Food Technology**. 53(2), p.38-45.

OKAJIMA, E., TSUTSUMI, M., OZONO, S., AKAI, H., DENDA, A., NISHINO, H., OSHIMA, S., SAKAMOTO, H., KONISHI, Y. 1998. Inhibitory effect of

tomato juice on rat urinary bladder carcinogenesis after N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine initiation. **Jap.-J.-Cancer-Res.** 89: 22-26.

PAPAS, A.M. 1999. Diet and antioxidant status. **Food Chem. Toxicol.** 37: 999-1007.

PICADA, J. N.; KERN, A. L.; RAMOS, L. L. P.; SAFFI, J. 2003. O estresse oxidativo e as defesas antioxidantes. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance,. p. 251-264.

RAO, A.V., AGARWAL, S. 2000. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. **J. Am. Coll. Nutr.** 19 (5): 563-569.

RAUSCHER, R., EDENHARDER, R., PLATT, K.L. 1998. In vitro antimutagenic na in vivo anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetable rich in carotenoids. **Mutat Res** 413: 129-142.

REHMAN, A., BOURNE, L., HALLIWELL, B., RICE, C. A. E. 1999. Tomato consumption modulates oxidative DNA damage in humans. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 262 (3): 828.

REN, H., ENDO., H., HAYASHI, T. 2001. The superiority of organically cultivated vegetables to general ones regarding antimutagenic activities. **Mutat Res** 496: 83-88.

RODRIGUEZ-ARNAIZ, R.; SORTIBRAN, A. C.; TELLEZ, G. O. 2004. Detection of mitotic recombination and sex chromosome loss induced by adriamycin, chlorambucil, demecolcine, paclitaxel and vinblastine in somatic cells of *Drosophila melanogaster* in vivo. **Mutagenesis**. 19: 121-127.

SANTOS, H.S.; CRUZ, W.M.S. 2001. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Rev. Bras. Onc.**, v.47, n.3, p.303-308.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. London: **Academic Press**. 1991.

SIMIC, M.G. 1988. .Mechanism of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. **Mutat Res**. 202: 377-386.

SPANÓ, M.; GRAF, U. 1998. Second Workshop at the federal University of Uberlandia – Uberlandia(MG)-(Brazil): SMART: A Method for the detection of mutagenic and recombinogenic activity in somatic cells of *Drosophila*. **Rev. Int. Contam. Ambient**. 14 (12): 111-114.

STOHS, S.J.; BAGCHI, D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. **Free Radic. Biol.Med**. 18(2):321-336.

TALLAJ, J.A., FRANCO, V., RAYBURN, B. K., PINDERSKI, L., BENZA, R.L., PAMBOUKIAN, S., FOLEY, B. and BOURGE. R. C. 2005. Response of Doxorubicin-induced Cardiomyopathy to the Current Management Strategy of Heart Failure. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**. Vol.24(12), p. 2196-2201.

TORRES, C., CREUS, A. and MARCOS, R. 1998. Genotoxic activity of four inhibitors of DNA topoisomerases in larval cells of *Drosophila melanogaster* as measured in the wing spot assay. **Mutation Res.**, 413: 191-203.

VALADARES, B. L. B. 2002. Ação anti-recombinogênica da própolis contra efeitos genotóxicos da doxorubicina em *Drosophila melanogaster*.

Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 83p.

VALKO,M., RHODES, C.J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**. 160(1-40).

ZELJEZIC, D., GARAJ-VRHOVAC, V. 2001. Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. **Mutagenesis**. Vol.16 (4).p 359-363.

WEISBURGER, J. H. 2002. Lycopene and tomato products in health promotion. **Exp. Biol. Med**. 227(10): 924-927.