

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC/UFS

RELATÓRIO FINAL

**AVALIAÇÃO MUTAGÊNICA DE ESTRADIOL EM CÉLULAS DE
Drosophila melanogaster COM METABOLISMO PADRÃO**

Bolsista: SALOMÃO DEIVID DOS SANTOS MENEZES
Código do projeto: PIA11929-2022

Orientador: Prof. Dr. BRUNO LASSMAR BUENO VALADARES

AGOSTO DE 2023

RESUMO

Estradiol (17-beta-estradiol ou E2), um esteróide derivado do colesterol, é o hormônio sexual predominante presente nas fêmeas. A síntese do estradiol normalmente diminui após a menopausa e a terapia de reposição de estrogênio pode indiretamente melhorar a sexualidade feminina. Estudos têm relacionado maiores níveis de estradiol com aumento do desenvolvimento de alguns tipos de cânceres. Este estudo avaliou os efeitos genotóxicos de estradiol por meio do Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART). Larvas provenientes do cruzamento padrão (ST) foram tratadas com diferentes concentrações (0,5; 0,25; 0,125 mg/mL) de estradiol. Os resultados não apresentaram efeito de alteração estatisticamente significativa no número de manchas mutantes, permitindo concluir que, nas condições experimentais utilizadas, o estradiol não apresentou atividade mutagênica.

Palavras-Chave: estradiol; mutagênese; SMART.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	4
OBJETIVOS.....	5
MÉTODOS.....	5
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	6
CONCLUSÕES.....	8
PERSPECTIVAS.....	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9

INTRODUÇÃO

Os estrogênios são uma família de hormônios esteróides que promovem o crescimento e a diferenciação de tecidos e órgãos sexuais secundários no sistema reprodutor feminino (PARODI, 2017). O estrogênio mais potente e dominante em humanos é o 17-beta-estradiol (E2) (SILVA, 2011). Na menopausa a síntese desse hormônio é comprometida, sendo necessária a sua reposição (PARDINI, 2014; NASHAS e NASHAS-NETO, 2019). Além disso, drogas hormonais como essas ocupam um lugar importante no tratamento quimioterápico de uma série de distúrbios metabólicos, homeostáticos e sexual (RUBIN, 1990) e uma série de modificações endócrinas que estão atreladas a diversas queixas sintomáticas e patológicas. A fim de tentar conter esses sintomas e doenças, muitas mulheres fazem uso da terapia de reposição hormonal (TRH), que inclui vários tipos de produtos hormonais (CARVALHO et al, 2022), sendo, também, um componente importante presente nos contraceptivos orais (DHILLON e DHILLON, 1995). Porém alguns estudos alertam para o potencial genotóxico e carcinogênico desta droga (LANG; REDMANN, 1979; BLUMBERG, 1980; LIEHR, 1990).

Uso de estrogênios já foi associado com o desenvolvimento de vários tipos de câncer em seres humanos e induziu vários tipos de tumores em roedores (LIEHR, 1990) a terapia hormonal, os maus hábitos alimentares e a predisposição genética aumentam o risco para o câncer de mama em mulheres na menopausa. Evidenciando que quanto maior a exposição ao estrogênio durante a vida da mulher, maiores suas probabilidades (BIENQUINI et al, 2023). O estradiol, especificamente, mostrou-se potencialmente clastogênico a partir de aberrações cromossômicas e recombinações, induzidas em culturas de linfócitos humanos, sem e com ativação metabólica. Em outro bioensaio, utilizando camundongos, também observou-se um aumento das frequências de formação de micronúcleos e trocas de cromátides irmãs. No entanto, por meio do Teste de Ames, o estradiol não foi capaz de causar um aumento significativo de mutações, independente da ativação metabólica (DHILLON e DHILLON, 1995).

CHOI et al (2011) caracterizou os efeitos do estradiol na expressão das enzimas do citocromo P450 (CYPs) in vivo, mostrando que ocorre uma modulação da expressão hepática dos CYPs, inibindo CYP3A1 e potencializando CYP1A2, CYP2C6, CYP2C7, CYP2C12 e CYP3A9.

De acordo com Ribeiro e Marques (2003), vários cânceres são originados a partir de processos mutagênicos. Uma vez que um gene responsável pelo controle da divisão celular é acometido por alguma mutação significativa, isso pode acarretar no surgimento de neoplasias. Além disso, já foi observado que o câncer também é desencadeado a partir de doenças genéticas motivadas por altas taxas de recombinações homólogas (RIBEIRO; MARQUES, 2003). Essas mutações, que se acumulam, geram alterações na proliferação e sobrevivência celular, além de contribuir na capacidade de invadir tecidos e de produzir metástases. Considerando que o processo de carcinogênese é iniciado por uma modificação irreversível do DNA, com sua replicação e a proliferação celular, geralmente os processos de mutagênese e carcinogênese estão relacionados (BENEVENUTO et al, 2022).

O Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) em células de asas de *Drosophila melanogaster* foi desenvolvido por GRAF et al (1984), e é conhecido por produzir uma gama ampla de

informações, detectando mutações gênicas, cromossômicas e/ou recombinações genéticas provocadas por mutágenos, tanto de ação direta, quanto os que necessitem de ativação metabólica (RESENDE et al., 2013; VALADARES et al., 2008; VILLELA et al., 2003).

Graf et al (1984), Spanó et al (2001) e Valadares (2007), afirmam que este é considerado um teste rápido, barato e que fornece resultados confiáveis, além das vantagens em utilizar um organismo-teste como a *D. melanogaster* que tem um curto período de geração, um pequeno número de cromossomos, linhagens muito bem caracterizadas geneticamente e um sistema enzimático similar ao dos mamíferos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial genotóxico do estradiol por meio do teste de mutação e recombinação somática em células de asa de *Drosophila melanogaster* sob metabolismo padrão.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico do estradiol em células somáticas de *Drosophila melanogaster* e, em caso de resultados positivos, o percentual recombinogênico das alterações genéticas.

MÉTODOS

Para este experimento foram utilizados comprimidos de estradiol de 1 mg (nome comercial Natifa®, fabricante Libbs), os quais foram macerados, pesados e diluídos em água destilada nas concentrações 0,5; 0,25; e 0,125 mg/mL. Como controle negativo foi utilizado água destilada estéril e controle positivo, uretano (URE) 0,891 mg/mL.

As linhagens de *D. melanogaster* foram mantidas em frascos de 250 mL contendo na base meio de cultura para larvas, preparado com 820 mL de água destilada, 25 g de fermento biológico fresco, 11 g de Agar, 156 g de banana e 1 g de Nipagin®. Os frascos foram armazenados em estufa B.O.D (Biological Oxygen Demand) à temperatura controlada de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Foi realizado o cruzamento padrão (Standard cross - ST) entre fêmeas virgens da linhagem flr3 com machos mhw, obtendo os descendentes trans-heterozigotos marcados - MH (mwh+ /+ flr3) que apresentam asas de borda lisas e podem expressar por mutação pêlos múltiplos (mwh) e pêlos com a base alargada (flr3); e os heterozigotos balanceados - BH (mwh+ / +TM3, BdS) que apresentam asas com bordas serrilhadas causada pela presença do cromossomo balanceador TM3 que impede a ocorrência da recombinação somática nesses indivíduos (NAVES et al., 2021; REZENDE et al., 2013; RIBEIRO et al., 2003; SPANÓ et al., 2001; GRAF et al., 1996).

As moscas foram transferidas para frascos contendo meio de oviposição (fermento fresco suplementado com sacarose) onde permaneceram por 8 horas. Após 72 ± 4 horas, as larvas no terceiro estágio foram coletadas com auxílio de peneira fina e água destilada corrente. Logo após a coleta, as larvas foram transferidas para frascos contendo meio de de tratamento alternativo (1,5 g de purê de batata Yoki) e 5 mL da solução de estradiol nas diferentes concentrações, onde permaneceram até a formação de pupas e eclosão.

Os adultos emergentes foram coletados e armazenados em álcool 70%. Em seguida, as lâminas foram preparadas com auxílio de uma lupa. Em cada uma das lâminas foram colocados cinco pares de asas, de cada sexo, as quais, foram destacadas com

pinças entomológicas e distendidas sobre a superfície da lâmina contendo solução de FAURE (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 g de hidrato de cloral e 50 mL de 14 água). Após secagem por 24 horas em temperatura ambiente, as lâminas foram cobertas com lamínula contendo uma gota de solução de FAURE e finalmente foram aquecidas em chapa quente para melhor fixação da lamínula (Graf et al., 1984).

A análise das lâminas foi feita utilizando um microscópio óptico. Tomou-se nota do número de manchas mutantes, bem como do tipo (flr3 ou mwh) e do número de células que originaram os pelos mutantes. Em seguida análise estatística foi feita de acordo com o teste do qui-quadrado (X²) proposto por Frei e Würigler (1989), para proporções, bicaudal, com nível de significância: $\alpha=\beta=0,05$, de forma a comparar as freqüências obtidas com os grupos tratados e controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão representados na Tabela 1. A análise foi feita em descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) do cruzamento padrão (ST) tratados com diferentes concentrações de estradiol (0,5; 0,25; e 0,125 mg/mL) e seus respectivos controles positivo (uretano 0,891 mg/mL) e negativo (água). Os controles positivo e negativo foram realizados simultaneamente em cada experimento e os resultados obtidos nos tratamentos isolados foram comparados ao controle negativo.

Tabela 1 - Frequência de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST), após tratamento crônico (~48h) com diferentes concentrações (0,5; 0,25; 0,125 mg/mL) de estradiol (EST) e seus respectivos controles negativo (ÁGUA) e positivo (URE 0,891 mg/mL).

Genótipos e Conc. (mg/mL)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (n° de manchas) diag. estatístico ^a										Total manchas mwh ^c (n)		
		MSP		MSG		MG		TM						
		(1-2 céls) ^b		(>2 céls) ^b										
		m = 2		m = 5		m = 5		m = 2						
ST														
mwh/flr ³														
Contr. Neg.	30	0,90	(27)		0,00	(00)		0,00	(00)		0,90	(27)		27
EST 0,125	30	0,20	(06)	-	0,00	(00)	i	0,00	(00)	i	0,20	(06)	-	6
EST 0,25	30	1,00	(30)	-	0,10	(03)	i	0,00	(00)	i	1,10	(33)	-	27
EST 0,5	30	1,10	(33)	-	0,10	(03)	i	0,00	(00)	i	1,20	(36)	i	33
URE 0,891	30	4,10	(123)	+	0,10	(03)	i	0,00	(00)	i	4,20	(126)	+	120

a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=\beta=0,05$.

b Incluindo manchas simples flr3 raras.

c Considerando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

Os dados apresentados mostram que o controle positivo (uretano) exerceu seu efeito genotóxico aumentando significativamente o número de manchas mutantes, em relação ao controle negativo (água).

O tratamento com estradiol (EST) nas diferentes concentrações (0,5; 0,25; 0,125 mg/mL) não apresentou alteração na frequência de manchas simples pequenas, simples grandes e gêmeas, estatisticamente significativas quando comparadas com o controle

negativo. O mesmo resultado foi observado no total de manchas mutantes que também não apresentou diferença significativa em nenhuma das três concentrações quando comparada com o controle negativo (água).

A observação da distribuição da frequência de manchas pelo tamanho (Figura 1) corroboram com os resultados da ausência de efeitos mutagênicos, onde, mesmo com resultados não significativos, as manchas observadas foram de 1 ou 2 células, indicando mutações tardias no estágio de desenvolvimento larval, que podem ser relacionadas a mutações espontâneas, não induzidas pela substância avaliada (CARDOSO et al, 2015).

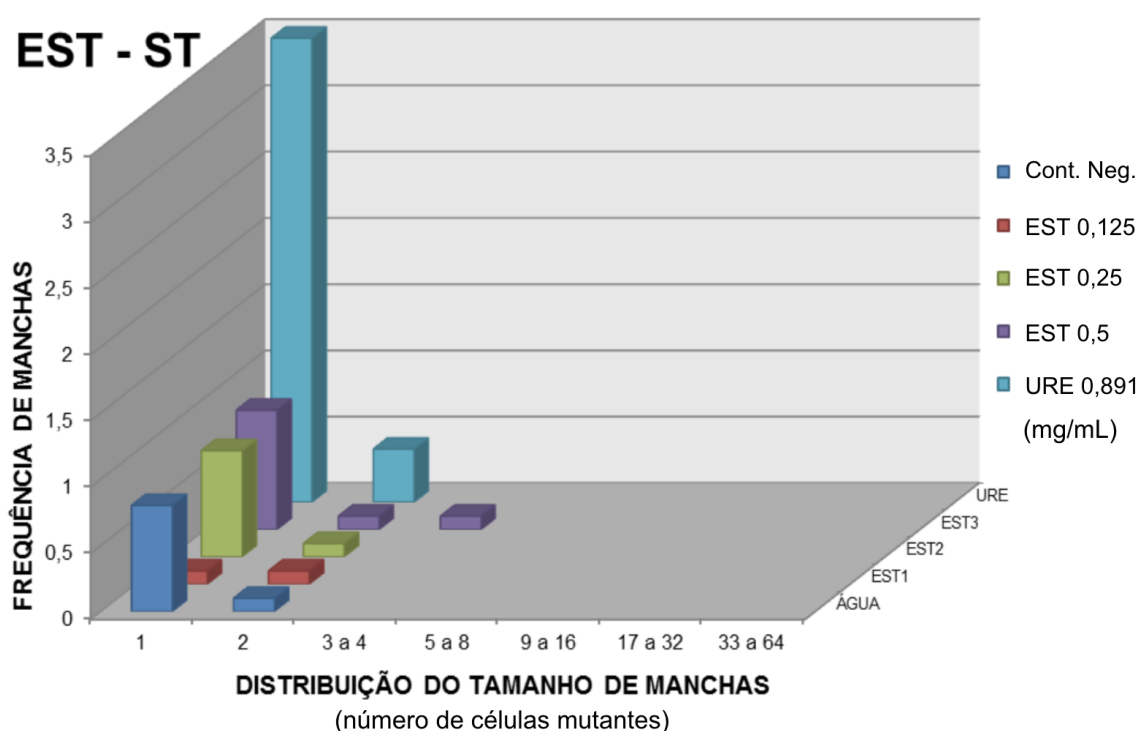


Figura 1 – Distribuição de frequências pelo tamanho de manchas mutantes (número de células/mancha) observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) obtidos por meio do Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática, tratadas com as diferentes concentrações de estradiol (0,5; 0,25; 0,125 mg/mL) e seus respectivos controles

Os resultados negativos obtidos com estradiol nessas condições experimentais são validados pelo efeito mutagênico obtido com o controle positivo (URE 0,891 mg/mL), comprovando a eficácia do teste para a avaliação de agentes genotóxicos (NAVES et al., 2021; CARDOSO et al, 2015; REZENDE et al., 2013). Diante dos resultados negativos não se justifica a análise dos indivíduos descendentes BH para cálculo de percentual recombinogênico (CARDOSO et al, 2015).

Resultados positivos foram encontrados utilizando estradiol em testes de clastogenicidade *in vitro* com cultura de linfócitos humanos (AHMAD et al., 2000) e de células de camundongo (TSUTSUI et al., 2000) e também para carcinogênese (BIENQUINI et al, 2023), no entanto, os modelos e condições experimentais devem ser considerados, especialmente em função de ação metabólica sobre o estradiol (CHOI et al., 2011).

O teste de mutações e recombinação somática (SMART) em asas de *D. melanogaster* é capaz de avaliar eventuais interferências do metabolismo pelo sistema enzimático P450 (SPANÓ et al., 2001; GRAF et al., 1996), no entanto, tal objetivo é contemplado em outro plano de trabalho relacionado ao mesmo projeto.

CONCLUSÕES

Os resultados observados no presente estudo permitem concluir que, nas condições experimentais utilizadas, o estradiol não provoca efeitos genotóxicos. Novos estudos podem ser realizados, ampliando a amostragem, avaliando outros níveis de concentração da droga e diferentes condições experimentais para ativação metabólica, como ainda, outros modelos experimentais.

PERSPECTIVAS

A pesquisa explorando os efeitos do estradiol nas células de *Drosophila melanogaster* com metabolismo padrão está preenchendo uma lacuna na compreensão dos efeitos mutagênicos dos hormônios esteróides, mostrando a importância da pesquisa básica experimental para somar informações sobre mecanismos de ação genotóxica e carcinogênica de drogas com importância na saúde e bem estar humano como o estradiol.

Seja como método contraceptivo ou terapêutico, seu uso é expressivo pelo público feminino e merece atenção do meio científico para avaliar possíveis efeitos indesejados e esses resultados vêm enriquecer o conhecimento sobre a influência de compostos endógenos e exógenos no material genético.

Este trabalho é uma etapa que compõe um projeto maior de avaliação genotóxica do estradiol em processo de desenvolvimento, com o qual, pretende-se avaliar outras condições experimentais no intuito de alcançar conhecimentos expressivos nessa área acadêmica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, V.S. Toxicidade genética associada a região hidrográfica do Guaíba através de bioensaios de curta duração. 2005. 123 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005. BLUMBERG, P. M. In vitro studies on the mode of action of phorbol esters: potent tumor promoters. *Rev. Toxicol.*, n. 8, p. 153-198, 1980.

AHMAD, M. E.; SHADAB, G. G. H. A.; HODA, A.; AFZAL, M. Genotoxic effects of estradiol-17 β on human lymphocyte chromosomes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, n. 466, v. 1, p. 109-15, 2000.

BENEVENUTO, B. R; ABREU, G. P; NASCIMENTO, J. F; VIEIRA, G; VIEIRA, P. C. Agentes infecciosos mais comuns relacionados à carcinogênese. *Revista de Ciências Biológicas e da Saúde*. Agosto/2022.

BIENQUINI, A. C.; FONSECA, J. K.; LEITE, P. G. M.; LATORRACA, E. A influência da terapia hormonal no desenvolvimento de câncer de mama em mulheres que fizeram a menopausa. *Revista dos Seminários de Iniciação Científica*, n. 5, v. 1, 2023.

CARDOSO, M. N. ; SANTOS, A. L. P. ; ALVES, M. V. ; VALADARES, B. L. B. . Avaliação de amostras de própolis vermelha do estado de Sergipe (Brasil) pelo Teste de Mutação e Recombinação Somática em *Drosophila melanogaster*. *Scientia Plena*, v. 11, p. 1-8, 2015.

CARVALHO, L. B. C.; MIZUNO, B. F.; PRATES, G. C.; ALMEIDA, G. F.; BORGES, M. L. S.; SILVA, W. G. Riscos e benefícios da terapia de reposição hormonal na menopausa. *Brazilian Journal of Development*, n. 8, v. 3, p. 20415-20427, 2022.

CHOI, S. Y. et al. Isoform-specific regulation of cytochrome P450 expression and activity by estradiol in female rats. *Biochemical Pharmacology*. n. 81, p. 777–782, 2011.

DHILLON, V. S; DHILLON, I. K. Genotoxicity evaluation of estradiol, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, v. 345, n. 1–2, p. 87-95, 1995. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)90073-X](https://doi.org/10.1016/0165-1218(95)90073-X).

ERDTMANN, B. A Genotoxicidade Nossa de Todos os Dias. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance p. 21-48, 2003.

FRÖLICH, A., WÜRGLER, F.E. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, n. 216, p. 179-187, 1989.

GRAF, U.; SPANÓ, M. A.; GUSMÁN-RINCÓN S. K.; ANDRADE, H. H. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *African Newsletter on Occupational Health and Safety*, v. 6, p. 9-13, 1996.

GRAF, U.WÜRLER, F.E.; KATZ, A.J.; FREI, H; JOUN, H. HALL, C.B., KALE, P.G. Somatic Mutation and Recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen*, v. 6, p. 153-188, 1984.

LANG, R.; U. REDMANN. Non-mutagenicity of some sex hormones in the Ames Salmonella/microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, n 67, p. 361-365, 1979. LIEHR, J.G. Genotoxic effects of estrogens. *Mutation Res.*, n. 238, p. 269-276, 1990.

NAVES, M. P. C.; DE MORAIS, C. R.; DE FREITAS, V.; RIBEIRO, D. L.; LOPES, D. S.; ANTUNES, L. M. G. ; DE MELO-RODRIGUES, V.; DE REZENDE, A. A. A ; SPANÓ, M. A. Mutagenic and genotoxic activities of Phospholipase A2 Bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu* in *Drosophila melanogaster* and human cell lines. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 182, p. 1602-1610, 2021.

PARODI, D.A. et al. Alteration of Mammary Gland Development and Gene Expression by In Utero Exposure to Cadmium. *International Journal of Molecular Sciences*, v.18, n.9, 2017.

REZENDE, A. A. A.; MUNARI, C. C.; OLIVEIRA, P. F.; FERREIRA, N. H.; TAVARES, D. C.; ANDRADE E SILVA, M. L.; REZENDE, K. C. S.; SPANÓ, M. A. A comparative study of the modulatory effects of (–)-cubebin on the mutagenicity/recombinogenicity induced by different chemical agents. *Food and Chemical Toxicology*, v. 55, p. 645-652, 2013.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F; MARQUES, E. K. *Mutagênese ambiental*. Canoas: ULBRA, p. 21-27, 2003.

RUBIN, R.P. Adrenocortical hormones and drugs affecting the adrenal cortex. In: CRAIG. C.R.; STITZEL. R.E. *Modern Pharmacology*, Little Brown & Co.. Boston, p. 856-872, 1990.

SILVA, J.; FONSECA, M. B. Estudos toxicológicos no ambiente e na saúde humana. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcançe p.71-84, 2003.

SILVA, N.et al. Cadmium a metalloestrogen: are we convinced? *Journal of Applied Toxicology*, v. 32, n.5 p. 318-332, 2011.

SPANÓ, M.A.; FREI, H.; WURGLER, F.E.; GRAF, U. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis*, v. 16, p. 385-394, 2001.

VALADARES, B. L. B. Avaliação de derivados sintéticos da testosterona pelo teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. 2007. 113p. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2007.

VALADARES, B. L. B.; GRAF, U. ; SPANO, M. A. . Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. Food and Chemical Toxicology, v. 46, p. 1103-1110, 2008.

VALADARES, B. L. B. et al. Teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*: Uma importante ferramenta na avaliação de genotoxicidade ambiental e na avaliação de agentes mutagênicos e antimutagênicos naturais e sintéticos. Tópicos em ciências naturais e da saúde, Caratinga, MG: UNEC. 22.ed. 507: 233-250, 2010.

VILLELA, B. et al. Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 145-163.