

EFEITO LETAL DA FOTOADIÇÃO DE UMA GERANILCUMARINA (*Zanthoxylum chiloperone*) EM CULTURAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

DIEHL, E.E.*; BENFATO, M.**; HENRIQUES, J.P.**; HENRIQUES, A.T.*

*FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, PORTO ALEGRE, RS, BRASIL.

**DEPARTAMENTO DE FISILOGIA, FARMACOLOGIA E BIOFÍSICA DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.

INTRODUÇÃO: O efeito mutagênico causado pela fotoadição de furocumarinas (fig.1) aos ácidos nucleicos em presença de radiação ultravioleta, tem sido descrito nas últimas décadas(1). Os primeiros estudos de reações fotoquímicas das furocumarinas com o DNA utilizaram o 8-metoxipsoraleno(8-MOP, fig.1). Outras furocumarinas naturais e sintéticas têm sido estudadas, assim como a 5,7-dimetoxicumarina(fig.1)(2). A fotorreacção ocorre em duas etapas, sendo que na primeira há a intercalação da furocumarina entre os pares de bases do DNA e na segunda, a molécula de furocumarina absorve um fóton de 365nm, permitindo assim sua fixação às bases pirimídicas do DNA através de ligações covalentes. As reações de adição ao DNA envolvem as insaturações C3-C4 do anel cumarínico e/ou C4'-C5' do anel furano(fig.1). No caso do 8-MOP, as duplas ligações C3-C4 e C4'-C5' reagem na presença de luz UV 365nm(UVA) com a dupla ligação C5-C6 da timina, levando a produtos do tipo C4-cicloadição(monoadições). Se a dupla ligação C4'-C5' estiver envolvida, o complexo formado pode absorver energia de 365nm adicional, reagindo com outra ligação pirimídica na cadeia oposta de DNA, levando à formação de pontes(biadições)(3). Assim, compostos como o 8-MOP, 5-MOP e 4,5',8-trimetilpsoraleno(TMP) são ditos bifuncionais, enquanto que angelicina, 3-carbetoxipsoraleno(3-CPs) e 5,7-dimetoxicumarina são monofuncionais. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos sistemas celulares clássicos na análise genética. A determinação da natureza dos sistemas de reparação do DNA e seus mecanismos de ação em tal organismo eucarioto consistiu no isolamento de mutantes sensíveis a agentes mutagênicos físicos e/ou químicos, como por exemplo, mutantes rad(sensíveis à luz UV e raios X) e pso(sensíveis a furocumarinas). As furocumarinas têm sido isoladas principalmente de cinco famílias de plantas: Rutaceae, Umbelliferae, Moraceae, Leguminosae e Orchidaceae. As folhas de *Zanthoxylum chiloperone* foram submetidas à extração com éter de petróleo em Soxhlet, por 16 horas. Desse procedimento, obteve-se um precipitado cuja estrutura foi determinada por métodos espectroscópicos. Este composto, uma geranilcumarina(fig. 1), foi descrito por NGADJUI e colaboradores(4), isolado de *Clausena anisata*(Rutaceae). Em vista do que foi exposto, e considerando que esta geranilcumarina tem a dupla ligação C3-C4 disponível, pretende-se determinar a possível fotoadição ao DNA, após tratamento com UVA, pela letalidade em cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

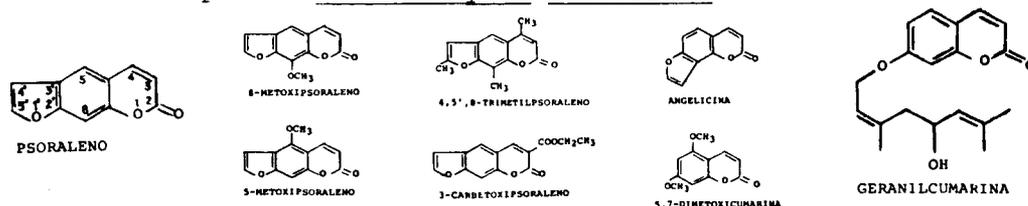


Fig. 1: Estruturas moleculares de cumarinas.

MATERIAL E MÉTODO: 1. Linhagens - foram utilizadas as linhagens de S. cerevisiae selvagem haplóide N123 (Mat a his 1), e as linhagens mutantes LP2646-1a (Mat α rad 3-2, leu 2-3, leu 2-112, ura 3-52, can^r) e XS-95-6C (Mat α rad 52-1, his 3-1, leu 2-3, leu 2-112, ura 3-52, trp 1-289, cir⁰ can^r), defectivas nas vias de reparação por excisão-ressíntese e recombogênica, respectivamente. 2. Condições de crescimento e tratamento - as culturas em fases estacionária e exponencial foram obtidas segundo metodologia preconizada por HENRIQUES E MOUSTACHI (5). As suspensões celulares da cepa N123, em fases estacionária e exponencial, e das mutantes rad 3-2 e rad 52-1, em fases exponenciais, foram incubadas (3×10^6 cél. ml⁻¹) com a geranilcumarina (5×10^{-5} M, dissolvida em solução hidroetanólica 40%), por 30 minutos a 4°C. 3. Tratamento com UVA - a fonte de radiação 365nm e a sua dosimetria foram descritas por HENRIQUES E MOUSTACHI (5). 4. Viabilidade celular - após os tratamentos, diluições apropriadas foram efetuadas, as células semeadas em meio YEPD sólido e incubadas por 4-5 dias a 30°C. A seguir, o número de colônias viáveis foram contadas (5).

RESULTADOS E DISCUSSÃO: A tabela 1 mostra que o efeito letal após os tempos de 60 e 120 minutos de incubação com a geranilcumarina, é praticamente o mesmo que por 30 minutos de incubação. A concentração da geranilcumarina (5×10^{-5} M) foi escolhida, porque em teste preliminar foi observado que em concentrações muito acima deste valor, a droga suspende. Convém salientar que a maioria dos estudos com furocumarinas utilizam esta concentração como a dose ativa (6). Na fig. 2, observa-se que não há um efeito letal destacado nas cepas selvagem e mutantes, sendo que na cepa N123 a sobrevivência celular mantém-se em doses superiores a 8 kJ. m⁻² de radiação UVA. A estrutura da cumarina, com a dupla ligação C3-C4 disponível, permitiria a formação de monoadições à base pirimídica timina, semelhante às furocumarinas monofuncionais já descritas (1). Pode-se sugerir que há uma baixa fotoadição da geranilcumarina ao DNA sob luz UV 365nm, o que explicaria a pouca perda da viabilidade celular na cepa selvagem, sendo que os mecanismos de reparação estariam funcionando eficientemente. Nas cepas deficientes nas vias de reparação de excisão-ressíntese (rad 3-2) ou recombogênica (rad 52-1), a alta viabilidade observada sugere que tanto o mecanismo de excisão como o de recombinação podem corrigir, independentemente, as poucas lesões fotoinduzidas pela geranilcumarina no DNA. Em adição, as monoadições fotoinduzidas pelas furocumarinas são reparadas por vias independentes (1), enquanto que as pontes entre cadeias de DNA dependem dos sistemas de excisão-ressíntese (tipo RAD 3) e de recombinação (tipo RAD 52) (7). Estas observações permitem sugerir que as reações fotoinduzidas pela geranilcumarina ao DNA sejam monoadições. Considerando que é provável que sob radiação UV 365nm são poucas as fotoadições ao DNA, ocasionando baixa letalidade celular, experimentos sob outros comprimentos de onda serão realizados.

Tempo de incubação (min.)	Geranilcumarina mais UVA (8kJ.m ⁻²)
0	100
30	42,71
60	42,84
120	38,36

Tabela 1: Percentual de sobrevivência da linhagem selvagem N123 de *S. cerevisiae*, em fase estacionária, após diferentes tempos de incubação com a geranilcumarina ($5 \times 10^{-5}M$), sob radiação UVA.

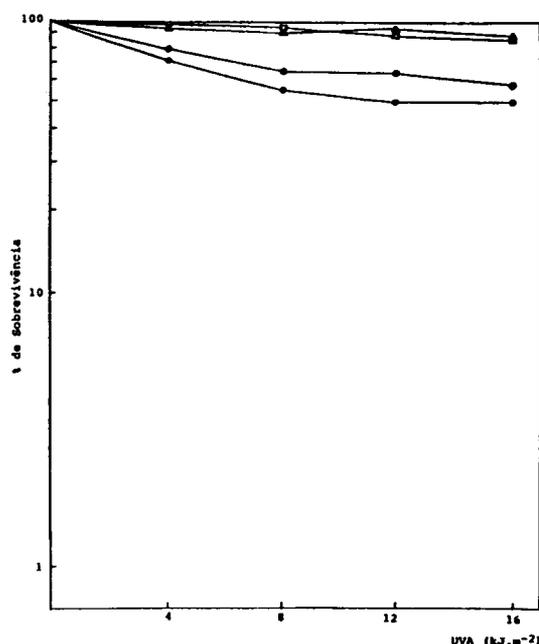


Fig.2: Curvas de % de sobrevivência das linhagens selvagem N123 de *S. cerevisiae* em fase estacionária (●); em fase exponencial (○) e das mutantes, em fases exponenciais, rad 3-2 (▲) e rad 52-1 (■), após tratamento com a geranilcumarina e radiação UV 365nm.

REFERENCIAIS BIBLIOGRÁFICOS:

1. AVERBECK, D. (1989) *Photochem. Photobio.* **50**, 859-882.
2. HARTER, M.L.; FELKNER, I.C. e SONG, P.S. (1976) *Photochem. Photobio.* **24**, 491-493.
3. CASSIER, C.; CHANET, R. e MOUSTACCHI, E. (1984) *Photochem. Photobio.* **39**, 799-803.
4. NGADJUI, B.T.; AYAFOR, J.F.; SONDEGAM, B.L. e CONNOLLY, J.D. (1989) *J. Nat. Prod.* **52**, 243-247.
5. HENRIQUES, J.P. e MOUSTACCHI, E. (1980) *Genetics* **95**, 273-288.
6. AVERBECK, D. e MOUSTACCHI, E. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **395**, 393-404.
7. HENRIQUES, J.P.; DA SILVA, K.V.C.L. e MOUSTACCHI, E. (1985) *Mol. Gen. Genet.* **201**, 415-420.

(FAPERGS, FINEP, CNPq)