

EFEITOS DA CERVEJA SOBRE O BIENSAIO *Allium cepa* L.Mylla F. O. Marsiglia^{1*}, Henrique R. Covali-Pontes¹, Albert Schiaveto de Souza², Danielle S. de Lima³

1. Graduandos de Ciências Biológicas-Bacharelado, Instituto de Biociências-UFMS

2. Professor Associado do Instituto de Biociências-UFMS, 3. Professora Associada do Instituto de Biociências-UFMS/Orientadora

Resumo

A cerveja é um produto bastante antigo e de amplo consumo no mundo, em especial no Brasil. O objetivo deste trabalho foi avaliar seus efeitos citotóxicos e genotóxicos em células meristemáticas de *Allium cepa*. Foram formados 4 grupos com 3 bulbos cada, sendo um para o controle negativo e 3 para os tratamentos com cerveja sem álcool, cervejas 5% álcool dos tipos Pilsen e Red Lager, respectivamente. As raízes foram coletadas e fixadas com 24h e 48h de tratamento. Os índices mitóticos (IM) e as frequências de aberrações cromossômicas (ACs) foram calculados em 1000 células por raiz e 3 raízes por bulbo. Os resultados foram comparados com o controle negativo, por meio do programa estatístico GraphPad Prism 7® utilizando o teste ANOVA de uma via, seguido de Tukey, ao nível de significância de 5%. Somente o tratamento 3 apresentou aumento significativo do IM após 24h, quando comparado ao controle negativo. Houve aumento significativo de ACs nas células expostas por 48h ao tratamento 2.

Palavras-chave: Citotoxicidade; Genotoxicidade; Aberrações Cromossômicas**Introdução**

O álcool é um fator de risco bastante conhecido para o desenvolvimento do câncer, sendo responsável por mais de 6% dentre todos os tipos de câncer no mundo inteiro (Guillén-Mancina et al., 2018). Há década, estudos epidemiológicos apontam que a situação de consumo de álcool no Brasil é grave, devido especialmente à associação do contato precoce de jovens e adolescentes com as bebidas alcoólicas e a influência exercida pelas propagandas sobre esses grupos (Vendrame et al., 2009).

A cerveja é uma bebida feita da fermentação do malte de cevada, de lúpulo e água, possuindo teor alcoólico de porcentagem em volume entre 3 a 8 (Siqueira et al., 2008). A sua inserção no Brasil foi feita pelos holandeses, no século XVII (De Paula Santos, 2003). Já a produção brasileira de cerveja surgiu por volta da metade do século XIX (Fonseca Filho, 2008).

Visando contribuir com informações sobre os efeitos da cerveja ao nível celular, o presente estudo teve como objetivo identificar seus potenciais citotóxicos e genotóxicos em células meristemáticas do bioensaio *Allium cepa*. O modelo experimental que utiliza células do meristema radical de *Allium cepa* é simples, de baixo custo e é considerado um sistema-teste confiável. Essas células completam seu ciclo celular em 17 horas e, caso haja dano ao material genético, a célula tentará repará-lo, aumentando o tempo de seu ciclo (Aiub & Felzenswalb, 2011). O Teste de *Allium* baseia-se na análise do índice mitótico por meio da contagem das células em cada fase do ciclo celular antes e após sua exposição aos tratamentos e sua comparação com ciclos não submetidos a tratamentos, assim determinando o nível de citotoxicidade. Também foi observado o número de aberrações cromossômicas, a fim de determinar o efeito genotóxico das bebidas em estudo.

Metodologia

Foram utilizados 3 bulbos de *Allium cepa* para análise de cada um dos 3 tipos de cervejas, em temperatura ambiente, com teores alcoólicos de 0% álcool (tratamento 1), 5% do tipo Pilsen (tratamento 2) e 5% do tipo Lager (tratamento 3), e 3 bulbos para controle em água de torneira, totalizando 12 bulbos. Os bulbos foram mantidos, inicialmente, em água de torneira, à 25°C, em aeração constante na B.O.D., até suas raízes atingirem cerca de 2,5 cm de comprimento. Parte dessas raízes foram coletadas, fixadas em Carnoy (3 etanol:1 ácido acético) e identificadas como hora 0. Posteriormente, os grupos de bulbos enraizados foram transferidos para tubos de vidro individuais contendo os tipos de cerveja. O grupo controle foi transferido para tubos de vidro contendo água. Os grupos de tratamentos e controle permaneceram por 24 h, sob as mesmas condições iniciais, mas sem aeração. Nesse momento, foram realizadas novas coletas e fixação de algumas raízes. Considerando que, aproximadamente, 10-15% do álcool evapora nas primeiras seis horas de incubação e que em 24 e 48 horas há perda adicional de 5% (Ahluwalia et al., 1995), todas as amostras de cervejas e a água dos tubos de vidro foram renovadas após 24h e os bulbos entraram em contato com essas substâncias por mais 24 horas. Depois destas 48h, foram coletadas e fixadas todas as raízes.

Microscopicamente, foram observadas 3 raízes por bulbo tanto após as primeiras 24h como após as 48h de tratamentos com as diferentes substâncias-teste. Pelo menos 1000 células foram analisadas por raiz, em cada caso. Os parâmetros microscópicos analisados foram índices mitóticos, para avaliação dos potenciais citotóxicos; e aberrações mitóticas, como indicador de potencial genotóxico das amostras dos tratamentos em questão. Eles foram considerados da seguinte forma:

a) índice mitótico (IM) - número de células em divisão/número de células observadas X100.

b) aberrações cromossômicas (AC) – frequências de células aberrantes obtidas a partir do tratamento com águas ambientais foram comparadas com as frequências de aberrações obtidas após exposição das células ao controle negativo.

Após as análises microscópicas, os resultados obtidos a partir das exposições aos tratamentos foram comparados com o controle negativo, por meio do programa estatístico GraphPad Prism 7® utilizando o teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, considerando um nível de significância de 5%. Os experimentos e as análises foram realizados no Laboratório de Mutagênese, do Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Resultados e Discussão

Houve diferença entre os tratamentos quando as células foram expostas, por 24 h (teste ANOVA de uma via, $p=0,010$) ao tratamento 3, havendo redução significativa dos IMs quando comparados aos IMs do controle negativo (pós-teste de Tukey, $p<0,05$ - Figura 1A).

De acordo com Kotova et al. (2010) quando a concentração de álcool aumenta, há uma diminuição linear do tempo do ciclo mitótico. O etanol interfere na formação de microtúbulos, por meio de uma ação direta e competitiva com as proteínas que se associam a eles (Smith et al., 2013). Embora não tenha sido testada de forma específica neste experimento, o etanol também é responsável por induzir apoptose, sendo sua ocorrência frequente em níveis de estresse celular (He et al., 2018).

Não houve diferença entre os tratamentos, em relação aos IMs das células expostas aos tratamentos por 48 horas (teste ANOVA de uma via, $p=0,513$ - Figura 1B).

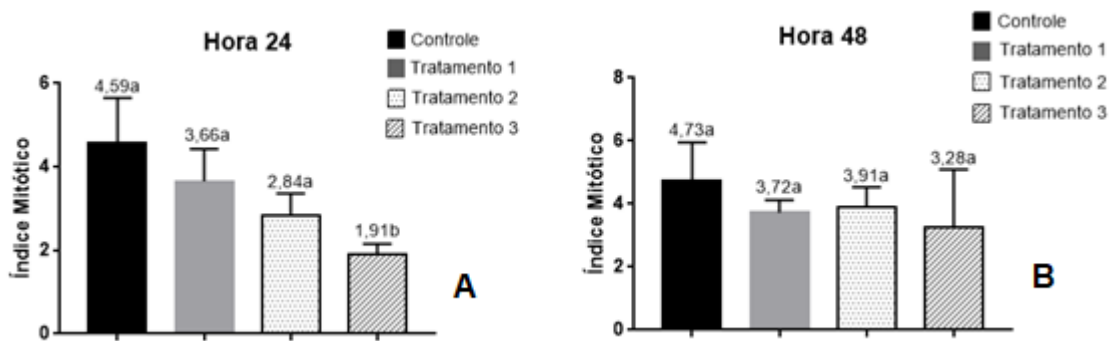


Figura 1: Comparação dos IM de cada tratamento: 1 - 0% álcool, 2 - 5% álcool tipo Pilsen e 3 - 5% álcool tipo Lager, com os IM do controle negativo, (A) após 24 h de exposição e (B) após 48 h de exposição. Cada coluna representa a média e a barra, o erro padrão da média.

Quanto às ACs, não houve diferença significativa entre os tratamentos após 24h de exposição (teste ANOVA de uma via, $p=0,170$ - Figura 2A). Entretanto, houve diferença entre os tratamentos das células expostas por 48h (teste ANOVA de uma via, $p=0,020$), quando submetidas ao tratamento 2 e comparadas aos resultados do controle negativo (pós-teste de Tukey, $p<0,05$ - Figura 2B). De forma semelhante, pequenas doses de etanol também foram suficientes para induzir o aumento de ACs do tipo micronúcleo em células-troncos (Garaycochea et al., 2018).

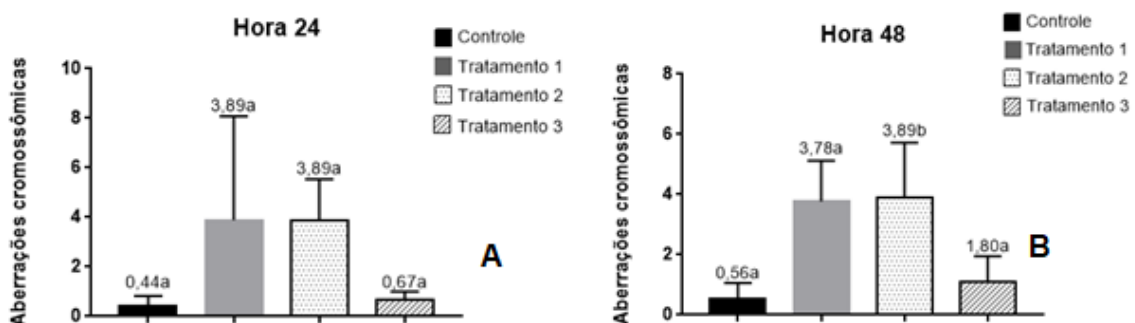


Figura 2: Comparação das frequências de ACs após exposição, (A) por 24h e (B) por 48h, das raízes de *Allium cepa* a cada tratamento: 1 - 0% álcool, 2 - 5% álcool tipo Pilsen e 3 - 5% álcool tipo Lager, com as frequências de ACs das células de raízes expostas ao controle negativo. Cada coluna representa a média e a barra, o erro padrão da média.

Embora o efeito citotóxico do etanol tenha caráter concentração dependente (López-Lázaro, 2016; Guillén-Mancina et al., 2018), a composição de cada tipo de cerveja é fator importante na determinação dos seus efeitos sobre a célula, o que foi verificado no presente estudo, por meio dos diferentes resultados provenientes das análises de cervejas com mesmo teor alcoólico (tratamentos 2 e 3). Acredita-se que o etanol por si só pode causar efeitos mutagênicos, exceto quando combinado aos componentes da cerveja. O efeito

antimutagênico provém dos componentes não voláteis da cerveja e, provavelmente, das substâncias derivadas da fermentação ou que são matérias-primas da fabricação da cerveja (Arimoto-Kobayashi et al., 1999).

Conclusões

Nas condições experimentais utilizadas nesta pesquisa somente a cerveja 5% álcool tipo Lager apresentou efeito citotóxico sobre células meristemáticas do bioensaio *Allium cepa* tratadas por 24h, o que foi constatado por meio da redução dos seus índices mitóticos quando comparados aos resultados obtidos a partir do controle negativo. O efeito genotóxico foi verificado somente após 48h de tratamento das raízes com a cerveja 5% álcool do tipo Pilsen, cujas células apresentaram frequências mais elevadas de aberrações cromossômicas, quando comparadas aos resultados analisados nas células do controle negativo. Estes resultados sugerem que os efeitos deletérios provocados às células pelo etanol podem estar relacionados à sua combinação com outros constituintes da cerveja.

Os resultados obtidos nesta avaliação indicaram a necessidade da condução de novos experimentos envolvendo cada componente da cerveja de forma isolada, a fim de detectar seus possíveis efeitos danosos ou protetores às células.

Referências bibliográficas

- AHLUWALIA, B. S., WESTNEY, L. S., & RAJGURU, S. U. Alcohol inhibits cell mitosis in G2-M phase in cell cycle in a human lymphocytes in vitro study. **Alcohol**, 12(6), 589-592, 1995.
- AIUB, C. A. F., FELZENSWALBE, I. O uso de *Allium cepa* como modelo experimental para investigar genotoxicidade de substâncias usadas em conservantes alimentares. **Revista Genética na Escola**, v. 6, n. 1, p. 12-15, 2011.
- ARIMOTO-KOBAYASHI, S., SUGIYAMA, C., HARADA, N., TAKEUCHI, M., TAKEMURA, M., & HAYATSU, H. Inhibitory effects of beer and other alcoholic beverages on mutagenesis and DNA adduct formation induced by several carcinogens. **Journal of agricultural and food chemistry**, 47(1), 221-230, 1999.
- DE PAULA SANTOS, S. Os primórdios da cerveja no Brasil. **AtelieEditorial**, 2003.
- FONSECA FILHO, L. R. C. da. História, política e cerveja: a trajetória do lobby da indústria da cerveja. 2008. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.
- GARAYCOECHEA, J. I., CROSSAN, G. P., LANGEVIN, F., MULDERRIG, L., LOUZADA, S., YANG, F., GUILBAUD, G., PARK, N., ROERINK, S., NIK-ZAINAL, S., STRATTON, M. R., PATEL, K. J. et al. Alcohol and endogenous aldehydes damage chromosomes and mutate stem cells. **Nature**, v. 553, n. 7687, p. 171, 2018.
- GUILLÉN-MANCINA E., CALDERÓN-MONTAÑO J. M., LÓPEZ-LÁZARO M. Avoiding the ingestion of cytotoxic concentrations of ethanol may reduce the risk of cancer associated with alcohol consumption. **Drug and Alcohol Dependence**, 183, p. 201–204, 2018.
- HE, R., CUI, M., LIN, H., ZHAO, L., WANG, J., CHEN, S., & SHAO, Z. Melatonin resists oxidative stress-induced apoptosis in nucleus pulposus cells. **Lifesciences**, 199, 122-130, 2018.
- KOTOVA, N., VARE, D., SCHULTZ, N., GRADECKA, M. D., STEPNIK, M., GRAWE, J., HELLEDAY, T., & JENSSEN, D. Genotoxicity of alcohol is linked to DNA replication-associated damage and homologous recombination repair. **Carcinogenesis**, 34(2), 325-330, 2012.
- LOPEZ-LÁZARO, M. A local mechanism by which alcohol consumption causes cancer. **Oraloncology**, v. 62, p. 149-152, 2016.
- SMITH, K. J.; BUTLER, T. R.; PRENDERGAST, M. A. Ethanol impairs microtubule formation via interactions at a microtubule associated protein-sensitive site. **Alcohol**, v. 47, n. 7, p. 539-543, 2013.
- SIQUEIRA, P. B., BOLINI, H. M. A., MACEDO, G. A. O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 4, p. 491-498, 2009.
- VENDRAME, A., PINSKY, I., FARIA, R., SILVA, R. D. S. Apreciação de propagandas de cerveja por adolescentes: relações com a exposição prévia às mesmas e o consumo de álcool. **Cadernos de Saúde Pública**, 2009.