

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E ANTIGENOTÓXICA

Da seiva *Hymenaea courbaril* L. EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*.

Camila Regina do VALE¹; Cecília Maria Alves de OLIVEIRA²; Lee CHEN-CHEN¹; ¹ Laboratório De Radiobiologia e Mutagênese, UFG; ² Instituto de Química, UFG.

e-mail: camilarvale@hotmail.com

Palavras-chave: *Hymenaea courbaril* L., efeito modulador, antioxidante; *Drosophila melanogaster*

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para prevenção, tratamento ou cura de doenças é uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade e atualmente seu uso pela população mundial continua muito significativo (JUNIOR *et al.*, 2005). Dentre as espécies medicinais encontra-se a *Hymenaea courbaril* L., conhecida popularmente como jatobá. Pertence à família Fabaceae e é nativa da mata semidecídua da bacia do Paraná, Centro Oeste e floresta tropical Amazônica. Sendo também encontrada no Cerrado brasileiro e no México (LORENZI & MATOS, 2002).

Na medicina popular *H. courbaril* L. é empregada para diversos fins, como o tratamento de enfermidades estomacais, inflamatórias, para doenças respiratórias, problemas na próstata e cistite crônica (AGUIAR, 2009; GUARIM-NETO E MORAIS, 2003; LORENZI & MATOS, 2002). No entanto, apesar do seu amplo uso, até o momento não foram encontrados na literatura estudos relacionados com a sua atividade genotóxica e/ou antígeno-tóxica, revelando assim a importância do presente estudo.

Para avaliação desses efeitos genotóxicos e antígeno-tóxicos um grande número de testes de curta-duração estão disponíveis. Dentre esses destaca-se o teste SMART/asa com *Drosophila melanogaster* que foi primeiramente descrito por Graf e colaboradores em 1984. Caracterizado por ser um teste rápido, barato, que produz resultados confiáveis e facilmente reproduzíveis (GRAF *et al.*, 1984).

Tendo em vista todas as atividades biológicas e o amplo uso da espécie *H. courbaril* L. já relatadas até o momento. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade citotóxica, genotóxica e antígeno-tóxica da seiva de *H. courbaril* L. pelo teste SMART/asa em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Seiva de *Hymenaea courbaril* L.

Foi utilizada a seiva exsudada do caule de *H. courbaril* L. coletada na cidade de Pirenópolis-Goiás. Após a obtenção do material o mesmo foi estocado a 4°C até o momento dos tratamentos.

2.2 Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

O teste SMART baseia-se na identificação de pêlos ou tricomas com fenótipos mutantes que representam a expressão fenotípica da ocorrência de lesões em nível de DNA, indicando eventos genéticos relacionados com mutações pontuais, aberrações cromossômicas e rearranjos estruturais devidos à recombinação mitótica (GRAF *et al.*, 1984).

Foram realizados dois tipos de cruzamentos: o Cruzamento Padrão (ST), onde fêmeas virgens da linhagem flr^3 foram cruzadas com machos da linhagem mwh e o Cruzamento Aprimorado (HB), onde fêmeas da linhagem ORR; flr^3 foram cruzadas com machos mwh. De ambos os cruzamentos foram obtidos dois tipos de descendentes: trans-heterozigoto marcados (MH) com asas arredondadas e heterozigotos balanceados (BH) que possuem asas serrilhadas devido a presença do balanceador Bd^{ϕ} (GRAF *et al.* 1984)

Larvas de terceiro estágio de ambos os cruzamentos foram coletadas e lavadas em água corrente com auxílio de peneiras de malha fina. Para a avaliação da citotoxicidade, essas foram submetidas a tratamento crônico por administração oral, sendo 100 larvas em tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura) contendo 0,9 g de meio de cultura purê de batata (Yoki Alimentos S.A.) hidratados com 3 mL de 13 diferentes diluições da SHyc (**Figura 1**) e também o controle negativo (água destilada estéril). Na avaliação da atividade genotóxica, seguindo os mesmos procedimentos adotados para a curva de sobrevivência, foram utilizados 3 mL de 3 diferentes diluições da SHyc selecionadas a partir dessa curva de sobrevivência (0,3 SHyc+2,7 H₂O; 1,5 SHyc+1,5 H₂O e 3 mL SHyc). Para avaliação da antigenotoxicidade também foram colocadas cerca de 100 larvas/tubo de ambos os cruzamentos, sendo adicionado em cada frasco 1,5 mL do controle positivo (solução de Doxorubicina a 0,125mg/mL) associadas com 1,5 mL das mesmas diluições da SHyc utilizadas para avaliação da genotoxicidade.

Os adultos emergentes de cada tubo foram fixados em etanol 70% e armazenados até o momento de montagem das asas e posterior análise

microscópica. A análise dos tricomas, presentes nas superfícies dorsal e ventral das asas, permitiu a identificação de manchas de pêlos mutantes que podem ser classificadas como: (1) simples *mwh* ou *flr*³, quando somente um dos marcadores se expressar, ou (2) gêmeas, quando ambos os fenótipos mutantes estiverem presentes.

Para análise estatística foi feita uma comparação entre as séries tratadas e o controle negativo (água destilada), para os experimentos de genotoxicidade, ou o controle positivo (DXR), para avaliação antigenotóxica, observando-se, mas diferentes diluições da seiva, a diferença de ocorrência de pêlos mutantes. Aplicou-se o teste do χ^2 para proporções com nível de significância 5% (FREI & WÜRGLER, 1988).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para análise citotóxica da SHyc foi determinada a taxa de sobrevivência dos indivíduos provenientes dos cruzamentos ST e HB tratados com 13 diferentes concentrações e o controle negativo (água destilada estéril). Os resultados são apresentados na **Figura 1**. A análise dos dados demonstram que a SHyc não apresentou efeito citotóxico significativo sobre as moscas para ambos os cruzamentos (ST e HB) quando comparados ao controle negativo.

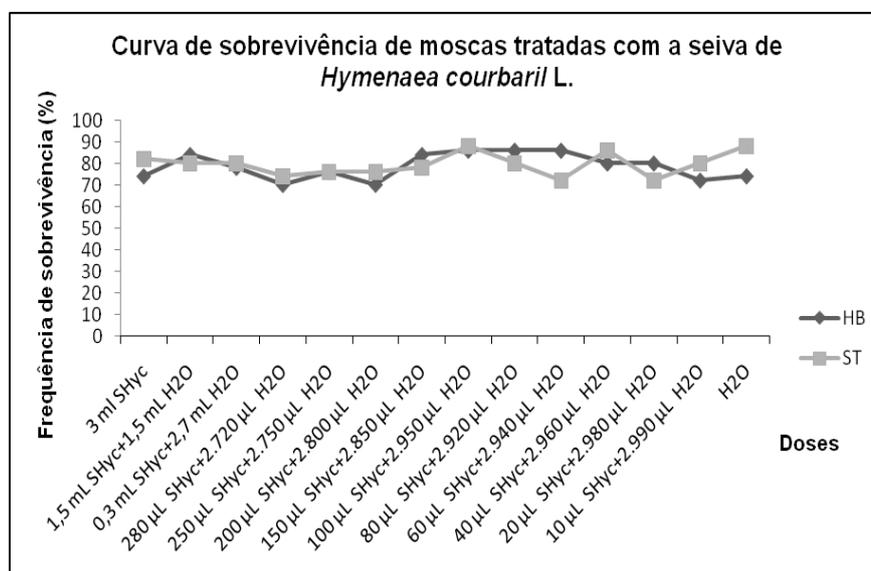


Figura 1. Porcentagem relativa da sobrevivência das larvas de *Drosophila melanogaster* detectada após tratamento com diferentes diluições da SHyc.

Na avaliação da atividade genotóxica dos indivíduos trans-heterozigotos marcados (MH) de ambos os cruzamentos, não foi observado um aumento significativo na frequência de manchas simples pequenas, grandes e gêmeas

induzidas pela SHyc em relação ao controle negativo, demonstrando que a mesma não foi capaz de induzir eventos mutagênicos e/ou recombinogênicos. Foi observado um aumento significativo em todas as categorias de manchas nos indivíduos tratados com DXR (controle positivo) quando comparada ao controle negativo (**Tabela 1**).

Os resultados de avaliação da atividade antígeno-tóxica da SHyc estão apresentados na **tabela 2**. Pode-se observar em todas as concentrações uma redução significativa na frequência de manchas simples pequenas, grandes e gêmeas induzidas por DXR em comparação ao controle positivo. Foi possível observar também uma relação de dose-dependência na redução da frequência de eventos mutagênicos.

Segundo Guzmán-Rincón e Graf (1995) nos descendentes MH de ambos os cruzamentos de *Drosophila melanogaster* é possível detectar a ocorrência de diferentes eventos genéticos, tais como mutações de ponto, aberrações cromossômicas e recombinação mitótica. Portanto no presente estudo a SHyc pode ter atuado como um agente modulador contra danos mutagênicos e eventos de recombinação mitótica causados pela DXR.

Tabela 1: Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *Drosophila melanogaster* do cruzamento HB e ST, tratados com diferentes concentrações da SHyc.

Genótipos e Conc. (mL)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico*				Total manchas mwh ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2	MSG (>2 céls) ^b m = 5	MG m = 5	TM m = 2	
HB						
Contr. Neg.	40	0,33 (13)	0,20 (08)	0,00 (00)	0,53 (21)	21
DXR	40	4,60 (184) +	2,08 (83) +	1,70 (68) +	8,38 (335) +	267
0,3 mL SHyc+2.700 H ₂ O	40	0,10 (04) -	0,00 (00) -	0,00 (00)	0,10 (04) -	4
1,5 mL SHyc+1,5 H ₂ O	40	0,13 (05) -	0,00 (00) -	0,00 (00)	0,13 (05) -	5
3,0 mL SHyc	40	0,08 (03) -	0,03 (01) -	0,00 (00)	0,10 (04) -	4
ST						
Contr. Neg.	40	0,40 (17)	0,30 (09)	0,00 (00)	0,60 (28)	28
DXR	40	8,40 (336) +	3,80 (152) +	1,30 (52) +	0,60 (28) +	488
0,3 mL SHyc+2.700 H ₂ O	40	0,15 (06) -	0,05 (02) -	0,00 (00)	13,50 (540) +	8
1,5 mL SHyc+ 1,5 H ₂ O	40	0,08 (03) -	0,25 (10)	0,00 (00)	0,20 (08) -	13
3,0 mL SHyc	40	0,13 (05) -	0,05 (02) -	0,00 (00)	0,33 (13) -	7

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

^bIncluindo manchas simples *tr*⁺ raras.

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

^dApenas manchas simples mwh podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos m wh/TM3.

Tabela 2. Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* do cruzamento ST e HB tratados com diferentes concentrações da SHyc associadas a DXR.

Genótipos e Conc. (mL)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico*				Total manchas mwh ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2	MSG (>2 céls) ^b m = 5	MG m = 5	TM m = 2	
HB						
0,3 mL SHyc+2.700 H ₂ O + DXR	40	4,80 (184) +	2,08 (83) +	1,70 (68) +	8,38 (335) +	267
1,5 mL SHyc+1,5 H ₂ O + DXR	40	1,25 (50) -	0,45 (18) -	0,43 (17) -	2,13 (85) -	68
3,0 SHyc+ DXR	40	0,85 (34) -	0,45 (18) -	0,48 (19) -	1,78 (71) -	52
	40	1,10 (44) -	0,53 (21) -	0,30 (12) -	1,93 (77) -	66
ST						
0,3 mL SHyc+2.700 H ₂ O + DXR	40	8,40 (336) +	3,80 (152) +	1,30 (52) +	13,50 (540) +	488
1,5 mL SHyc+1,5 H ₂ O + DXR	40	1,88 (75) -	0,85 (34) -	0,45 (18) -	3,18 (127) -	109
3,0 SHyc+ DXR	40	1,63 (65) -	0,90 (36) -	0,53 (21) -	3,05 (122) -	101
	40	1,48 (59) -	0,55 (22) -	0,30 (12) -	2,33 (93) -	81

*Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; -, redução significativa de manchas mutantes; -, negativo; I inconclusivo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância: 0,05.

^bIncluindo manchas simples mwh raras.

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

4. CONCLUSÃO

A seiva de *Hymenaea courbaril* não foi citotóxica e genotóxica nas condições experimentais testadas, mas apresentou atividade antígenotóxica modulando danos causados pelo quimioterápico DXR.

5. REFERÊNCIAS,

- AGUIAR, J.C.D. **Etudo fitoquímico e biologic de Hymenaea courbaril L.** Tese de mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2009.
- FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide wheter mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. **Mutation Research**, v. 203: p. 297-308, 1988.
- GRAF, U., WURGLER, F. E.; KATZ, A.J., FREI, H.; JUON,H., HALL, C.B., KALE, P.G. Somatic Mutation And Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mutagen**. V.6 p.347-377, 1984
- GUARIM NETO, G.; DE MORAIS, R.G.; Recursos Medicinais de espécies do Cerrado de Mato-Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Bot. Bras.**, v.17, n.4, p. 561 - 584, 2003.
- GUSMÁN-RINCÓN, J. & GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. **Biomonitoring and Biomarkers as indicators of environmental change**. New York, Plenum Press, p. 169-181, 1995.
- JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química nova**, vol. 28, n. 3, 2005.
- LORENZI,H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil**. Nova Odessa, São Paulo. Ed.Plantarum, 2002.