

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-GENOTÓXICO E DE EFEITOS  
GENÔMICOS DA MELATONINA EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila  
melanogaster* TRATADAS COM RAIOS- $\gamma$ .**

**ELOIZA PERES RODRIGUES**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso  
de Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas.

Uberlândia – M.G

1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-GENOTÓXICO E DE EFEITOS  
GENÔMICOS DA MELATONINA EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila*  
*melanogaster* TRATADAS COM RAIOS- $\gamma$ .**

**ELOIZA PERES RODRIGUES**

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Monografia apresentada à Coordenação do Curso  
de Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas.

Uberlândia – M.G

1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

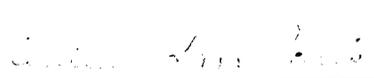
**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-GENOTÓXICO E DE EFEITOS  
GENÔMICOS DA MELATONINA EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila*  
*melanogaster* TRATADAS COM RAIOS- $\gamma$ .**

**ELOIZA PERES RODRIGUES**

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ Nota \_\_\_\_\_

---

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cecília Lomônaco de Paula

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Júlio César Nepomuceno

Uberlândia, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Eloiza Peres Rodrigues  
Bióloga, Mestre em Ciências Biológicas  
Graduação em Ciências Biológicas

*Dedico este trabalho Àquele que em todos os momentos, alegres ou tristes, senti sua presença e sua força, proporcionando-me perseverança e auto-confiança, para que eu pudesse realizar mais esta etapa de minha vida, Deus.*

## ***Agradecimentos especiais***

Ao Prof. Dr. Mário Antônio Spanó do Departamento de Genética e Bioquímica, por todo esse ano de trabalho e convívio, durante o qual pude contar com sua orientação, dedicação e amizade, e também por acreditar na minha capacidade e ter me proporcionado realizar este trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cecília Lomônaco de Paula, do Departamento de Biociências, Pela co-orientação deste trabalho, pelo estímulo, empenho, e valiosas sugestões.

Ao Prof. Júlio César Nepomuceno, do Departamento de Genética e Bioquímica, pelas valiosas sugestões na elaboração deste manuscrito, por sua amizade, e por essa convivência tão agradável.

## **Agradecimentos**

À minha mãe, pelo apoio e incentivo constantes.

Ao meu pai pelas oportunidades oferecidas para a minha formação acadêmica.

À minha irmã Iara, que sempre me ajudou.

À minha irmã Geovana por segurar as “pontas” nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos Hugo, Fábio, Jorge Filho e Danilo, que mesmo à distância me motivaram.

À todos os meus familiares, com os quais sempre pude contar com o carinho e compreensão.

À Prof<sup>a</sup> e amiga Ana Maria de Oliveira Cunha, do Departamento de Biociências, pelo carinho, apoio, credibilidade, e pelas dicas dadas nesta monografia e no decorrer de toda a minha vida acadêmica.

Ao Prof. Antônio Ariza Gonçalves Júnior, do Serviço de Oncologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, pela atenção e colaboração durante a irradiação das larvas de *D. melanogaster*.

Ao Senhor José dos Santos do Núcleo de Processamento de dados pela impressão gráfica e pela atenção.

Ao Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, do Departamento de Genética e Bioquímica, pela colaboração e empréstimo de material bibliográfico.

Ao Prof. Roberto Cardoso Lemos, do Departamento de Ciências Fisiológicas, que cedeu seu laboratório para a realização da medida micrométrica das asas, e ao técnico Hélio Elias Cardoso, pela colaboração.

A todos os professores do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, que ajudaram na minha formação.

Às secretárias e técnicos da Coordenação do Curso de Ciências Biológicas e do Departamento de Genética e Bioquímica.

À amiga Lucélia Nobre Carvalho, com quem compartilhei minhas expectativas durante todos estes anos de Faculdade; pelas dicas e palpites durante a realização desta monografia.

Às minhas amigas Flaviane Stroppa Moreira, por ouvir as minhas ansiedades, à Valeriana Cunha, por sanar algumas dúvidas no uso do computador, e à Raquel de Castro Salomão, Cátia Abrão Rangel, Andréa Faria Vilela, e Veridiana Cunha, que indiretamente me ajudaram no decorrer deste trabalho.

Aos colegas de laboratório e em particular à amiga Fabiana Rosa Tavares, com quem sempre pude contar.

Aos amigos de Curso, Érica Germanos, Cristiane Vilela de Freitas, Patrícia Cardoso Francalanci, Karla Saba, Fúlvia Arantes Zardini e Waldesse Piragé de Oliveira Júnior.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO .....	1
1.1- Melatonina.....	1
1.2 – "Somatic Mutation And Recombination Test" (SMART) .....	5
1.3 – Plasticidade Fenotípica .....	5
2 - OBJETIVOS .....	7
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1 - Agente Químico .....	8
3.2 - Agente Físico .....	8
3.3 - Linhagens.....	9
3.4 - Cruzamentos.....	10
3.5 - Procedimentos .....	10
3.6 - Tratamentos .....	11
3.7 - Montagem de lâminas.....	12
3.8 - Análise de asas.....	12
3.8.1 - Manchas mutantes .....	12
3.8.2 - Plasticidade Fenotípica .....	13
3.9 - Análise Estatística.....	14
3.9.1 - Manchas mutantes .....	14
3.9.2 - Plasticidade Fenotípica .....	14
4 - RESULTADOS.....	15
4.1 - Manchas mutantes.....	15
4.2 - Plasticidade fenotípica.....	25
5 - DISCUSSÃO .....	30
6 - CONCLUSÕES.....	36
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
RESUMO.....	42

## 1 - INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o desenvolvimento industrial tem contribuído para que haja um maior contato do Homem, e os demais organismos vivos, com agentes químicos e físicos. É cada vez maior o emprego de agrotóxicos (fertilizantes e defensivos agrícolas), agentes químio- e radioterápicos, aditivos alimentares (corantes e conservantes), solventes e cosméticos, assim como é cada vez maior a quantidade de poluentes atmosféricos provenientes de rejeitos industriais, incineradores e de veículos automotores. Muitos desses agentes podem induzir alterações na molécula de DNA (efeitos genotóxicos), ou simplesmente alterar o fenótipo dos indivíduos.

Os danos sobre a molécula de DNA podem ainda ser causados por agentes de origem endógena, oriundos de processos de oxidação, metilação, desaminação e de purinação (Ames e Schigenaga, 1992 *apud* Cecchi, 1996).

Os organismos possuem meios naturais de defesa, como as enzimas anti-oxidantes, e os mecanismos de reparo de DNA, mas diante da freqüente exposição aos agentes mutagênicos físicos e químicos, faz-se necessária a verificação de quais substâncias possuem efeitos protetores contra alterações fenotípicas, assim como efeitos anti-genotóxicos.

### 1.1- Melatonina

A melatonina é um hormônio sintetizado pela glândula pineal. Vijaylaxmi *et al.* (1995, 1996) verificaram que a melatonina possui meios efetivos de proteção contra danos genéticos induzidos por radiações  $\gamma$  em linfócitos humanos testados *in vitro* e *in vivo*, respectivamente.

A glândula pineal está localizada no cérebro entre os corpos quadrigeminais posteriores (Vacas *et al.*, 1983 *apud* Ronco e Halberg, 1996), sendo que o desenvolvimento e a transformação desse órgão neuroendócrino ocorre no 3º mês de vida (Weissbluth e Weissbluth, 1994)

A similaridade entre pinealócitos fetais e neonatais, e as células fotossensoriais da retina, sugere que a glândula pineal é capaz de detectar

mudanças de luz *apud utero*, e durante os primeiros períodos pós-parto (Altar, 1982 *apud* Weissbluth e Weissbluth, 1994), enquanto que animais cegos mostraram, pela supressão da atividade enzimática pineal, a presença de fotossensibilidade extrarretinal para a luz noturna (Torres e Lytle, 1989 *apud* Weissbluth e Weissbluth, 1994).

A retina dos mamíferos apresenta um oscilador circadiano geneticamente programado que regula a síntese da melatonina (Tosini e Menaker, 1996). A produção cíclica deste hormônio é gerada por uma atividade neuronal no núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo, (Klein e Moore, 1979 *apud* Reiter, 1992; Reiter, 1985 *apud* Reiter, 1992). Os olhos, via NSQ, são anatomicamente e funcionalmente ligados à glândula pineal por meio de conexões neurais em ambos os sistemas nervoso central e periférico (Reiter, 1981 *apud* Reiter, 1992), sendo a noradrenalina, o neurotransmissor responsável pela síntese do hormônio (Ronco e Halberg, 1996).

A luz é considerada o principal fator externo que controla os níveis de melatonina no organismo (Wurtman e Cardinali, 1974 *apud* Ronco e Halberg, 1996). Deste modo, a secreção deste hormônio obedece a um ritmo circadiano, com produção máxima durante a noite, alcançando uma concentração plasmática dez vezes maior que os valores encontrados durante o dia (Ronco e Halberg, 1996).

A formação noturna desta indolamina é, primariamente, o resultado da liberação de norepinefrina (NE), de neurônios simpáticos pós-ganglionares da glândula. Durante o dia, a atividade de NSQ inibe a liberação de NE de neurônios intrapineais, e à noite essa mensagem inibitória do NSQ da glândula pineal é suprimida, procedendo assim a liberação de NE. Quando liberada, interage com receptores  $\beta$ - e  $\alpha$ -adrenérgicos nas membranas dos pinealócitos, desencadeando a produção do hormônio (Pangerl *et al.*, 1990 *apud* Reiter, 1992). Qualquer extensão ou exposição aguda de luz no período da noite inibe ou interrompe, respectivamente a produção noturna da melatonina. Do mesmo modo, qualquer interrupção nas conexões neurais entre o NSQ e a glândula pineal, compromete a habilidade da glândula em secretar o produto hormonal (Reiter, 1985 *apud* Reiter, 1992).

A produção deste hormônio é feita a partir da síntese do triptofano, o qual é convertido em serotonina antes de originar o hormônio propriamente dito (Ronco e Halberg, 1996). As enzimas responsáveis pela produção são N-acetiltransferase (NAT) e Hidroxindole-O-metiltransferase (HIOMT). Em algumas linhagens de camundongos, as enzimas NAT e HIOMT são geneticamente ausentes, causando assim uma falha na produção da melatonina (Ebinhara *et al.*, 1986 *apud* Weissbluth e Weissbluth, 1994).

Falhas no desenvolvimento normal da glândula pineal e subsequente falhas na secreção da melatonina provocam um desequilíbrio nas interações químicas entre serotonina, progesterona e catecolaminas, e este desequilíbrio é o responsável pela síndrome da morte repentina na infância (Weissbluth e Weissbluth, 1994).

Variações sazonais propiciam alterações do ritmo circadiano, provocando um aumento do pico da melatonina durante a noite, nos meses do inverno, pois estes apresentam uma pequena duração da luz solar (Beck-Friis *et al.*, 1984 *apud* Ronco e Halberg, 1996). Este ritmo pode também ser alterado em pacientes com câncer, como consequência de certas terapias, pois é significativamente alta a correlação entre a concentração de melatonina e o estágio do crescimento tumoral (Leone e Skene, 1994; Ronco e Halberg, 1996). A produção deste hormônio é também controlada por outros fatores externos como a dieta alimentar, duração do sono, postura e atividade do corpo (Lincoln *et al.*, 1985 *apud* Ronco e Halberg, 1996). O consumo de drogas como álcool, propranolol e clonidina, consideradas depressores da síntese de melatonina, reduz o pico do hormônio durante a noite (Shtzkin *et al.*, 1987 *apud* Ronco e Halberg, 1996; Willett *et al.*, 1984 *apud* Ronco e Halberg, 1996; Leung *et al.*, 1992 *apud* Ronco e Halberg, 1996).

Alguns estudos demonstram que existe uma correlação indireta entre a idade e os níveis de melatonina no plasma (Sharma *et al.*, 1989 *apud* Ronco e Halberg, 1996), devido a uma progressiva calcificação da glândula pineal, contradizendo os autores que acreditavam que este processo não comprometia a funcionalidade da glândula (Wurtman e Cardinali, 1974 *apud* Ronco e Halberg, 1996). Essa diminuição na produção de melatonina pode ser devido à uma

diminuição gradual da viabilidade de receptores  $\beta$ -adrenérgicos nas membranas dos pinealócitos (Mikuni *et al.*, 1981 *apud* Reiter, 1992; Chik e Ho, 1989 *apud* Reiter, 1992).

Relatos da distribuição do hormônio pineal indicam que as concentrações são maiores no núcleo do que em outros compartimentos celulares (Mennenga *et al.*, 1990, 1991 *apud* Vijayalaxmi *et al.*, 1995), e que a alta lipossolubilidade, e o tamanho pequeno da molécula, facilitam a difusão através das membranas (Reiter, 1991c *apud* Vijayalaxmi *et al.*, 1995)

A melatonina também vem sendo empregada em estudos experimentais como terapia alternativa em tratamentos de tumores avançados, e tem surtido efeitos citotóxicos em linhagens de células tumorais (Shellard *et al.*, 1989; Neri *et al.*, 1994). Possui também a capacidade de destruir radicais livres, tornando-se um agente anti-envelhecimento (Reiter, 1992). Segundo Voordouw *et al.*, (1992), a melatonina, e a combinação de melatonina com progestina noretisterona sintética, inibem a ovulação, e podem, futuramente, serem usadas como contraceptivos orais. Outra relevância clínica deste hormônio é a sua utilização em tratamentos de insônia, pois possui efeito similar às drogas com efeitos sedativos (Lieberman *et al.*, 1984). A melatonina tem sido utilizada também por viajantes internacionais, que sofrem do "jet lag" provocado por mudanças bruscas do fuso horário (Arendt *et al.*, 1986 *apud* Vijajalaxmi 1996).

De acordo com Shellard (1989) os metabólitos primários da melatonina, como a 6-hidroximelatonina, são mais citotóxicos em linhagens de células tumorais do que a própria melatonina, mas não apresentam nenhum potencial anti-tumoral, pois são instáveis em soluções aquosas e possuem baixa solubilidade.

Este estudo visou verificar se a melatonina possui efeitos anti-mutagênicos em larvas de *Drosophila melanogaster*, tratadas com raios- $\gamma$ , por meio do teste SMART, Efeitos genômicos da ação de raio-  $\gamma$  e atuação reparadora da melatonina também serão investigados por análise de plasticidade fenotípica morfológica em adultos de *D. melanogaster*.

## 1.2 – “Somatic Mutation And Recombination Test” - (SMART)

O SMART de asa, desenvolvido por Graf *et al.* (1984), utiliza a *Drosophila melanogaster* como organismo teste, pois esta possui um tempo curto de geração e apresenta linhagens caracterizadas geneticamente, com pequeno número de cromossomos. De acordo com Barrs (1980) e Hällström *et al.* (1984), a *Drosophila melanogaster* possui também um sistema enzimático semelhante ao dos mamíferos, que permite o metabolismo de agentes xenobióticos. É considerado um teste rápido, barato e que produz resultados inequívocos. Consiste na análise de indivíduos trans-heterozigotos que apresentam marcadores genéticos que, diante de eventos mutagênicos e/ou recombinogênicos, perdem o alelo selvagem dominante, provocando a perda da heterozigose e, conseqüentemente, acarretam a expressão do alelo recessivo, (Graf *et al.*, 1984).

Os eventos mutagênicos podem ser do tipo: deleção, mutação de ponto e não disjunção. E os eventos recombinogênicos podem ser recombinações distais e proximais (Graf *et al.*, 1984; Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

## 1.3 – Plasticidade Fenotípica

Plasticidade fenotípica é a capacidade do indivíduo de alterar sua fisiologia e/ou morfologia, frente às mudanças ambientais. É a mudança no fenótipo em função do ambiente, sem que modificações no genótipo sejam necessárias (Sheiner, 1993). A plasticidade fenotípica pode ser adaptativa ou não, e reflete aumento no grau da flutuação da simetria de caracteres bilaterais (simetria flutuante), ou por alteração no tamanho do organismo (Schlichting, 1986).

A assimetria flutuante (fluctuating asymmetry – FA) descreve desvios ao acaso da simetria perfeita de um organismo que apresenta simetria bilateral (Eggert e Sakaluk, 1994).

FA é considerada como um reflexo de perturbações ocorridas durante o processo de desenvolvimento. Contudo, a assimetria flutuante pode ser utilizada como ferramenta para a Biologia Conservativa, ou seja, pode ser útil na indicação de organismos submetidos ao stress. (Leary e Allendor, 1989).

Vários estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de verificar se fatores ambientais influenciam a plasticidade de um caráter de um indivíduo (Palmer e Strobeck, 1986; Leary e Allendor, 1989; Parsons, 1990; Sheiner *et al.*, 1991; Clarke *et al.*, 1992; Parsons, 1992; Moller e Pomiankowski, 1993; Sheiner, 1993; Eggert e Sakaluk, 1994; Swaddle *et al.*, 1994; Ueno, 1994; Clarcke, 1995; Delpuech *et al.*, 1995; Markow, 1995; Moller, 1995;).

## 2 - OBJETIVOS

No presente trabalho, larvas de *Drosophila melanogaster* foram pré-tratadas por 2 h com melatonina (2,5 mg / 5,0 ml de água) e irradiadas com 10 Gy de raios- $\gamma$ , com o objetivo de verificar se:

1. a melatonina possui efeitos mutagênicos e recombinogênicos.
2. a melatonina possui efeitos antimutagênicos quando associada com raios- $\gamma$ .
3. os raios- $\gamma$  induzem alterações morfológicas nas asas.
4. a melatonina protege o organismo contra tais alterações.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Agente Químico

Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptomina) (Fig.1), fabricada pelo Laboratório Horizon Natural Products (P.O Box 1806, Santa Cruz, CA 95061, USA), conhecida comercialmente como Melatonin (orange flavored sublingual), dissolvida em água destilada estéril.

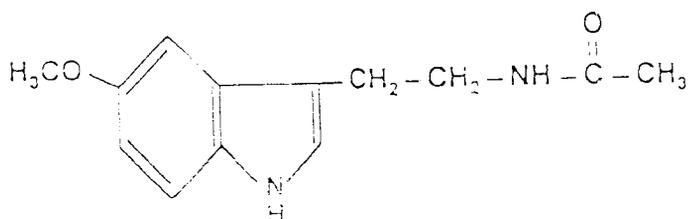


Figura 1: Fórmula estrutural da melatonina.

#### 3.2 - Agente Físico

Radiação Gamma ( $\gamma$ ):

10 Gy de raios- $\gamma$  (2,55 Gy / min.), emitidos por uma bomba de cobalto 60 (Theration Phenix, Canadá),  $\epsilon$ . máx. = 1,25 MeV.

A irradiação foi realizada no Setor de Oncologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, sob a supervisão técnica do Prof. Antônio Ariza Gonçalves Júnior.

### 3.3 - Linhagens

- “*mwh*” (multiple wing hairs): Possui o marcador *mwh* que se localiza no cromossomo 3 (3-0,3), e que na presença de eventos genotóxicos manifesta três ou mais pêlos por célula.
- “*flr<sup>3</sup>*” (*flare<sup>3</sup>*): Possui o marcador *flr<sup>3</sup>*, o qual está localizado no braço esquerdo no cromossomo 3, numa posição mais proximal (3-38,8). A mutação desta linhagem se manifesta por um pelo modificado na célula, a qual se assemelha a uma chama. Mas, o marcador *flr<sup>3</sup>* em homozigose é letal, ou seja, zigotos homozigotos para o gene *flr<sup>3</sup>* não conseguem se desenvolver até a fase adulta (Graf *et al.*, 1984; Guzmán-Rincón e Graf, 1995). Por isto, foi desenvolvido um cromossomo balanceador *TM3, Bd<sup>S</sup>* (Third Multiple 3, beaded-serrate) que mantém a heterozigose da linhagem. É característico deste balanceador, impedir a recombinação, ou seja, a troca de genes entre os cromossomos homólogos (Lindsley e Zimm, 1992).
- “*ORR; flr<sup>3</sup>*” (Oregon R; *flare<sup>3</sup>*): O marcador *flr<sup>3</sup>* também está presente nesta constituição genotípica, mas difere por apresentar uma alta atividade das enzimas citocromo P-450 (Hällström e Blanck, 1985, *apud* Graf e van Shaik, 1992), as quais são responsáveis pela metabolização e ativação de pró-mutágenos e carcinógenos (Dapkus e Merell, 1977). Os cromossomos 1 e 2 são provenientes da linhagem Oregon R, resistente ao DDT, construída por Frölich e Würigler (1989).

### 3.4 - Cruzamentos

- *Cruzamento padrão* (ST - "Standard Cross")

Fêmeas virgens *flr<sup>3</sup>/ln(3LR)TM3, ri p<sup>p</sup> sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>* foram cruzadas com machos *mwh/mwh* (Graf e van Schaik, 1989).

- *Cruzamento aprimorado de alta capacidade de bioativação* (IHB - "Improved High Bioactivation cross")

Fêmeas virgens *ORR; flr<sup>3</sup>/ln(3LR)TM3, ri p<sup>p</sup> sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>* foram cruzadas com machos *mwh/mwh* (Graf e van Schaick, 1992).

### 3.5 - Procedimentos

Os estoques de *D. melanogaster* foram mantidos em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura (820 ml de água, 11 g de ágar, 156 g de banana, 25 g de fermento fresco (*Sacharomyces cerevisiae*) e 1 g de nipagin), suplementados com fermento biológico fresco.

A ovoposição foi realizada em frascos de ¼ de litro contendo uma base de ágar (4,25 g de ágar / 250 ml de água), sobre a qual é colocado meio de fermento (250 g de fermento biológico fresco e aproximadamente duas colheres de chá de açúcar).

A ovoposição foi realizada 48 horas após o início dos cruzamentos, por um período total de 8 horas.

### 3.6 – Tratamentos

Larvas de  $72 \pm 4$ h, provenientes de ambos cruzamentos, foram coletadas por flotação em água corrente e colocadas em placas de Petri, onde foram pré-tratadas por duas horas (tratamento agudo) com melatonina (2,5 mg melatonina / 5,0 ml de água destilada estéril), à qual foi acrescido 0.5 mg de celulose em pó. Em seguida, parte das larvas pré-tratadas com melatonina, e larvas não pré-tratadas, foram irradiadas com 10 Gy de raios  $\gamma$ , de acordo com o protocolo apresentado no Quadro 1. Posteriormente, as larvas foram transferidas para frascos do 100 ml contendo 1.0 g de meio de cultura alternativo (purê de batata instantâneo, Knorr®) / 5 ml água destilada).

Quadro 1 – Protocolo de tratamento de larvas de *D. melanogaster* provenientes dos cruzamentos ST e IHB.

Tratamentos
Água destilada estéril (controle negativo)
2,5 mg de melatonina
10 Gy de raios- $\gamma$
2,5 mg de melatonina + 10 Gy de raios- $\gamma$

Após 9 dias da postura dos ovos, os adultos emergentes foram coletados e preservados em etanol 70 %. Esses adultos, de ambos os cruzamentos, são:

50 %  $\Rightarrow$  Marcadores Trans-heterozigotos ( MH  $\Rightarrow mwh +/+ flr^3$  )

50 %  $\Rightarrow$  Balanceador heterozigoto (BH  $\Rightarrow mwh + ITM3, Bd^S$ )

Os adultos podem ser diferenciados fenotipicamente, pois o marcador  $Bd^S$  provoca, na fase larval, um recorte na borda das asas, deixando-a com aspecto serrilhado, enquanto que os adultos trans-heterozigotos apresentam a borda da

asa normal (sem aspecto serrilhado) (Graf *et al.*, 1984).

Foram analisadas apenas as asas de borda normal, pois descendentes MH sofrem eventos genéticos, possíveis de induzir manchas mutantes, mais do que os descendentes de asa serrilhada (descendentes BH).

Foram montados 20 pares de asas, provenientes de 10 machos e de 10 fêmeas, para cada tratamento, perfazendo um total de 320 asas.

### 3.7 - Montagem de lâminas

As moscas foram transferidas do etanol 70%, para recipientes contendo água destilada. As asas foram destacadas do corpo da mosca e estendidas, aos pares, em lâminas codificadas. Para fixar as asas, foi utilizado a solução de Faure (30g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato de cloral e 50 ml de água). Deixou-se secar por 24 horas em placa aquecida (40° C). As lâminas foram montadas com lamínulas, e solução de Faure. Para que as asas ficassem com a superfície bastante plana, foram colocados, sobre a lamínula, pesos de metal de aproximadamente 400 g, e deixado secar por mais 48 horas em placa aquecida (40° C).

### 3.8 - Análise de asas

#### **3.8.1 - Manchas mutantes**

A análise das manchas mutantes foi feita em microscópio óptico com aumento de 400X. As manchas classificam-se em :

- **Manchas simples**

Quando apresentam somente um dos marcadores genéticos (*mwh* ou *flr<sup>3</sup>*). Estas manchas são provocadas por deleção, mutação de ponto, não-disjunção, e recombinação entre os loci *flare* e *mwh*.

- **Manchas gêmeas**

Quando apresentam os dois marcadores genéticos (*mwh* e *flr<sup>3</sup>*). Estas manchas são provenientes apenas de recombinação proximal entre o locus *flr<sup>3</sup>* e o centrômero (Graf *et al.*, 1984).

### 3.8.2 - Plasticidade Fenotípica

- **Tamanho e assimetria flutuante**

A análise foi realizada com o auxílio de uma ocular para medida micrométrica (Filar micrometric eyepiece), Fabr. American optical Instrument Division. Foram feitas três medidas, formando um triângulo no corpo da asa, de acordo com o mostrado na Figura 2.

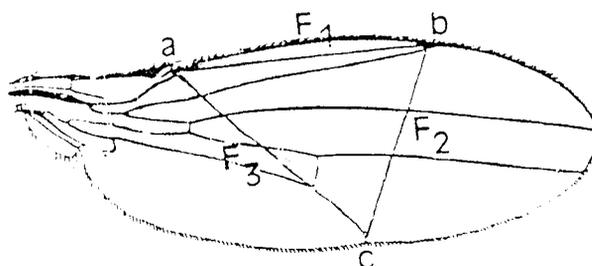


Figura 2: Esquema de asa de *Drosophila melanogaster* mostrando os pontos utilizados para os cálculos do tamanho, e da flutuação na simetria bilateral, da asa.

### **3.9 - Análise Estatística**

#### **3.9.1 - Manchas mutantes**

A análise estatística foi feita de acordo com o teste do  $X^2$  para proporções (Frei e Würigler, 1988)

#### **3.9.2 - Plasticidade Fenotípica**

O tamanho dos indivíduos foi determinado por análise de componente principal (ACP) para obtenção de um índice multivariado de tamanho, (Manly, 1994), utilizando para isto medidas de asas de cada organismo.

Valores individuais absolutos de FA foram obtidos diminuindo as medidas de uma asa pela outra. ( $|M1 - M2| = FA$ ), segundo Palmer e Strobeck (1986).

Diferenças no tamanho e no grau de FA dos indivíduos por tratamentos foram testados por ANOVA. O teste de Tukey foi utilizado para verificar diferenças entre os tratamentos tanto para a análise do tamanho quanto para a de FA. (Zar, 1984).

Correlações entre a plasticidade no tamanho e o grau de FA com a média do tamanho do número de manchas por asa foram feitas por meio do teste de correlação de Pearson (Zar, 1984).

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 - Manchas mutantes

Os descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) provenientes dos cruzamentos padrão (ST) e aprimorado de alta capacidade de bioativação (IHB), pré-tratados com melatonina, e/ou irradiados com raios  $\gamma$ , apresentaram diferentes freqüências de manchas mutantes, as quais são mostradas nas tabelas 1 e 2, e nas Figuras 3 e 6, respectivamente.

As distribuições dos tamanhos de manchas mutantes (simples e gêmeas), observadas nos indivíduos trans-heterozigotos do cruzamento ST, são apresentadas nas Figuras 4 e 5, enquanto que as distribuições observadas nos descendentes do cruzamento IHB são apresentadas nas Figuras 7 e 8.

O controle negativo (água) apresentou uma freqüência de mutações espontâneas de 0,150 para o cruzamento ST, e de 0,325 para o cruzamento IHB, sendo a maioria de manchas pequenas simples (ST= 0,125; IHB= 0,200).

Foi verificado, em ambos os cruzamentos, que a melatonina (2,5 mg / 5 ml de água) não induziu aumento estatisticamente significativo na freqüência de manchas mutantes, quando comparado com os controles negativos (ST= 0,10; IHB= 0,475).

A radiação- $\gamma$  (10 Gy) induziu, nos indivíduos emergentes dos dois cruzamentos, aumento estatisticamente significativo na freqüência de manchas mutantes (ST= 6,950; IHB= 5,575). Foi verificado, nesses descendentes, uma maior freqüência de manchas grandes simples (ST= 2,875; IHB= 2,675) e de manchas gêmeas (ST= 2,475; IHB= 2,075).

Os pré-tratamentos com a melatonina reduziram, de forma estatisticamente significativa, as freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes

de ambos cruzamentos (ST = 4,55; IHB = 4,60), quando comparado com as frequências observadas nos controles positivos (tratados com raios- $\gamma$ ) (ST = 6,95; IHB = 5,57).

Tabela 1: Frequências de manchas observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) de *D. melanogaster* do cruzamento padrão, pré-tratados com 2,5 mg de melatonina e irradiados com 10 Gy de raios- $\gamma$ .

Tratamento	Manchas por asa (n° de manchas) Diag. Estatíst. *					Total
	Número De Asas	Pequenas simples	Grandes simples	Gêmeas	m=2	
		(1-2 células) m=2	(> 2 células) m=5	m=5		
Água	40	0,125 (005)	0,025 (001)	0,00 (000)	0,15 (006)	
Mel (2,5 mg)	40	0,075 (003)	0,025 (001)	0,00(000)	0,10 (004)	
Raios- $\gamma$ (10 Gy)	40	1,600 (064)*	2,875 (115)*	2,475 (099)*	6,95 (278)*	
Raios- $\gamma$ (10 Gy) + Mel (2,5 mg)	40	1,325 (053)	2,000 (080)*	1,225 (049)*	4,550 (182)*	

\* Estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ), de acordo com Frei & Würigler (1988); m = fator de multiplicação.

Tabela 2: Frequências de manchas observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de ativação metabólica, pré-tratados com 2,5 mg de melatonina e irradiados com 10 Gy de raios- $\gamma$ .

Tratamento	Manchas por asa (n° de manchas) Diag. estatíst. *					Total
	Número De Asas	Pequenas simples	Grandes simples	Gêmeas	M=2	
		(1-2 células) m=2	(> 2 células) m=5	m=5		
Água	40	0,200 (008)	0,100 (004)	0,025 (001)		0,325 (013)
Mel (2,5 mg)	40	0,275 (011)	0,150 (006)	0,050 (002)		0,475 (019)
Raios- $\gamma$ (10 Gy)	40	0,825(033)*	2,675 (107)*	2,075 (083)*		5,575 (223)*
Raios- $\gamma$ (10 gy) + Mel (2,5 mg)	40	1,025 (041)	2,050 (082)	1,525 (061)		4,60 (184)

\* Estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ), de acordo com Frei & Würigler (1988); m = fator de multiplicação.

Figura 3. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) de *D. melanogaster*, do cruzamento padrão, pré-tratadas com melatonina e irradiadas com raios gamma.

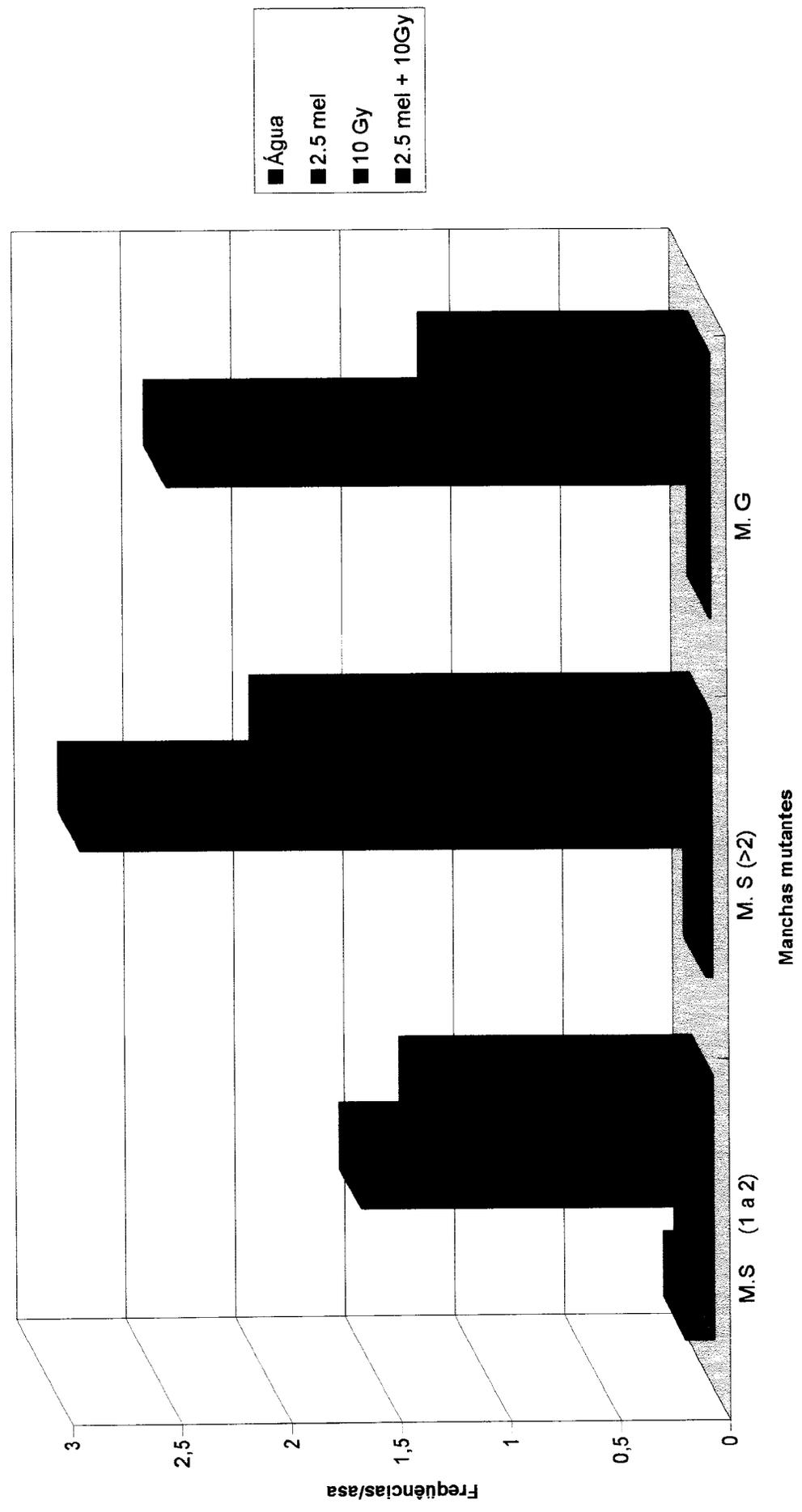


Figura 4. Distribuição do tamanho de manchas simples observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) de *D. melanogaster*, do cruzamento padrão, pré-tratadas com melatonina e irradiadas com raios gamma.

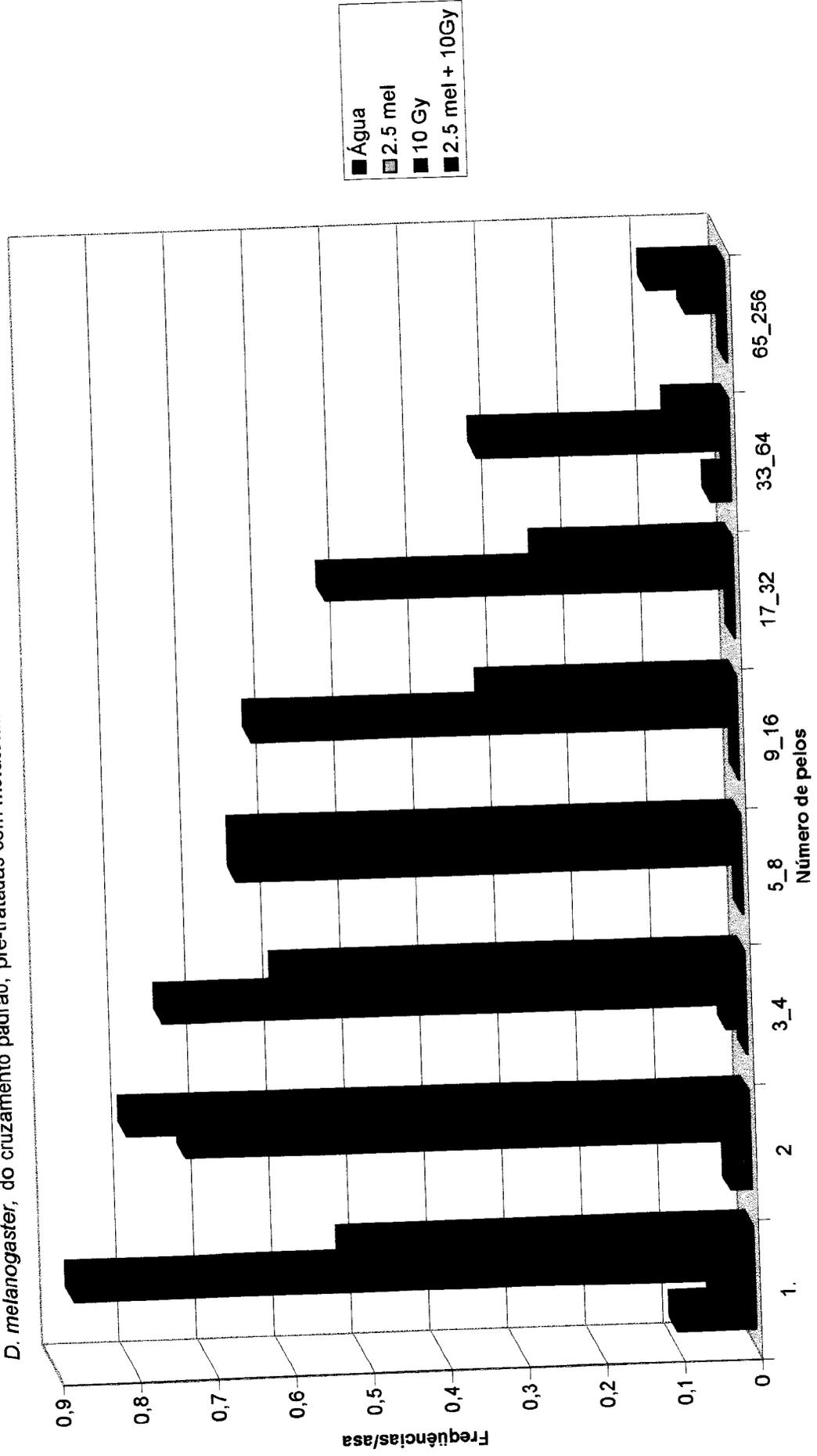


Figura 5. Distribuição do tamanho de manchas gêmeas observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) de *D. melanogaster*, do cruzamento padrão, pré-tratadas com melatonina e irradiadas com raios gamma.

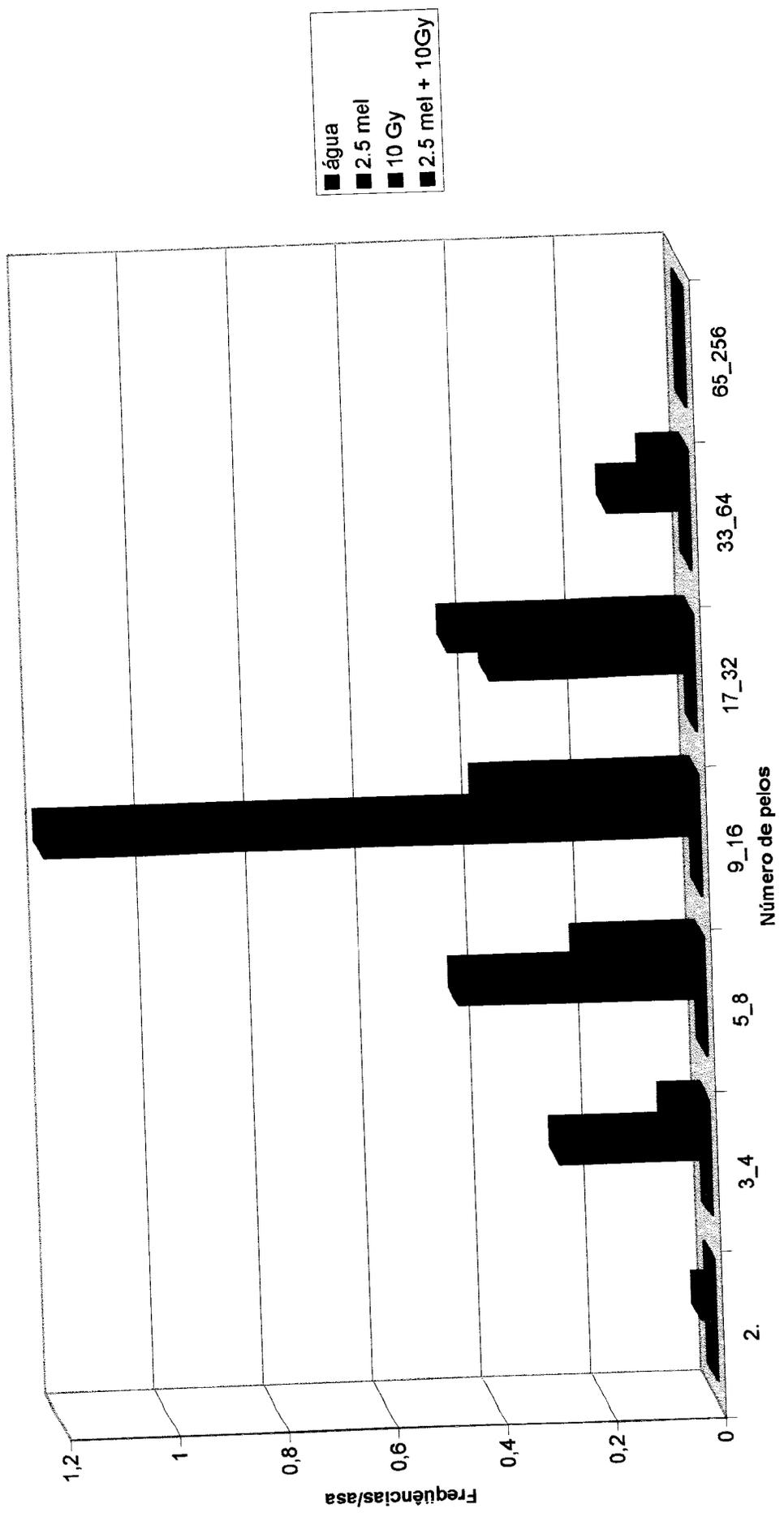


Figura 6. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) de *D. melanogaster*, do cruzamento aprimorado de alta capacidade de ativação, pré-tratadas com melatonina e irradiadas com raios gamma.

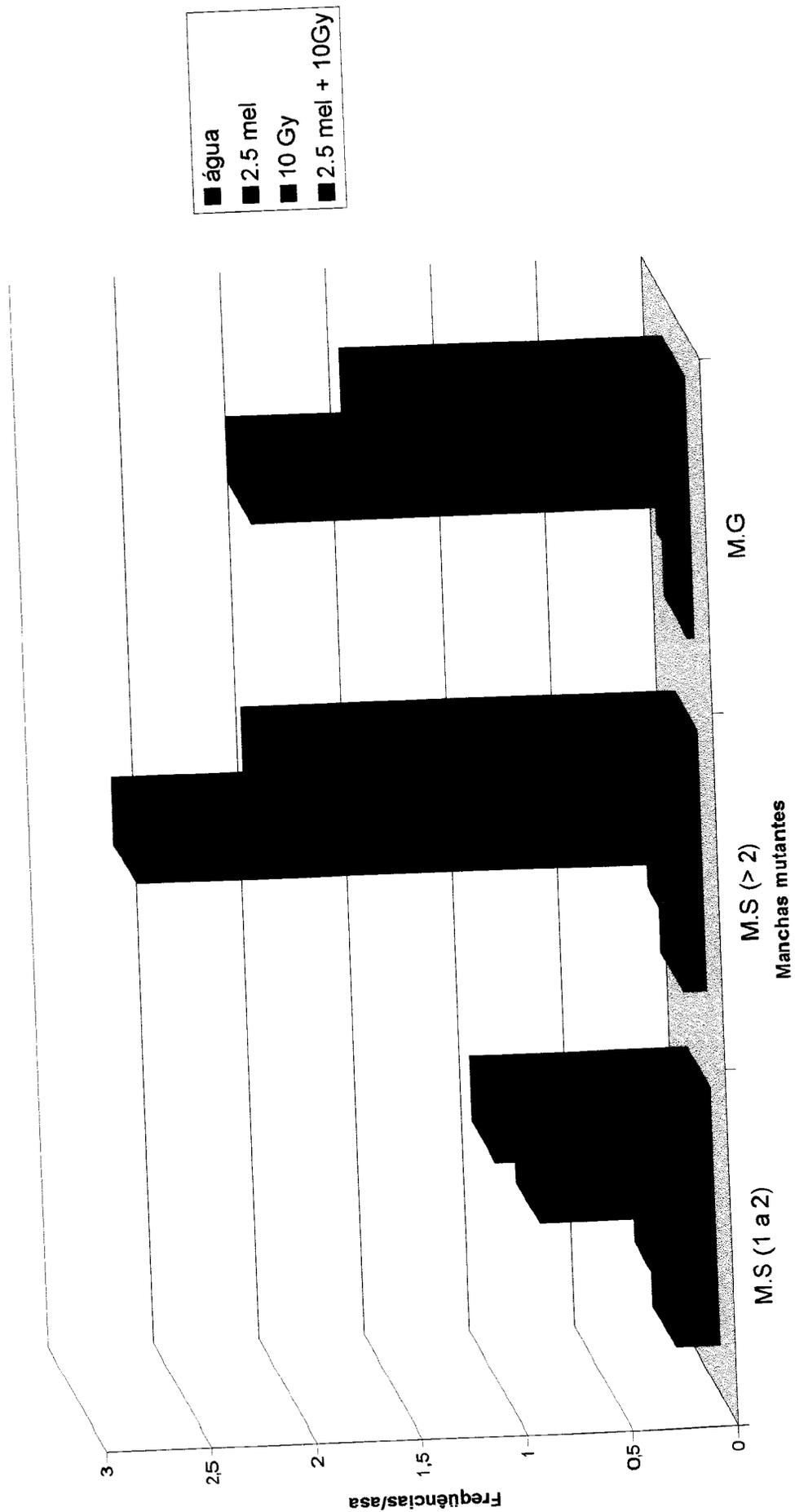


Figura 7. Distribuição do tamanho de manchas simples observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) de *D. melanogaster*, do cruzamento aprimorado de alta capacidade de bioativação, pré-tratadas com melatonina e irradiadas com raios gamma.

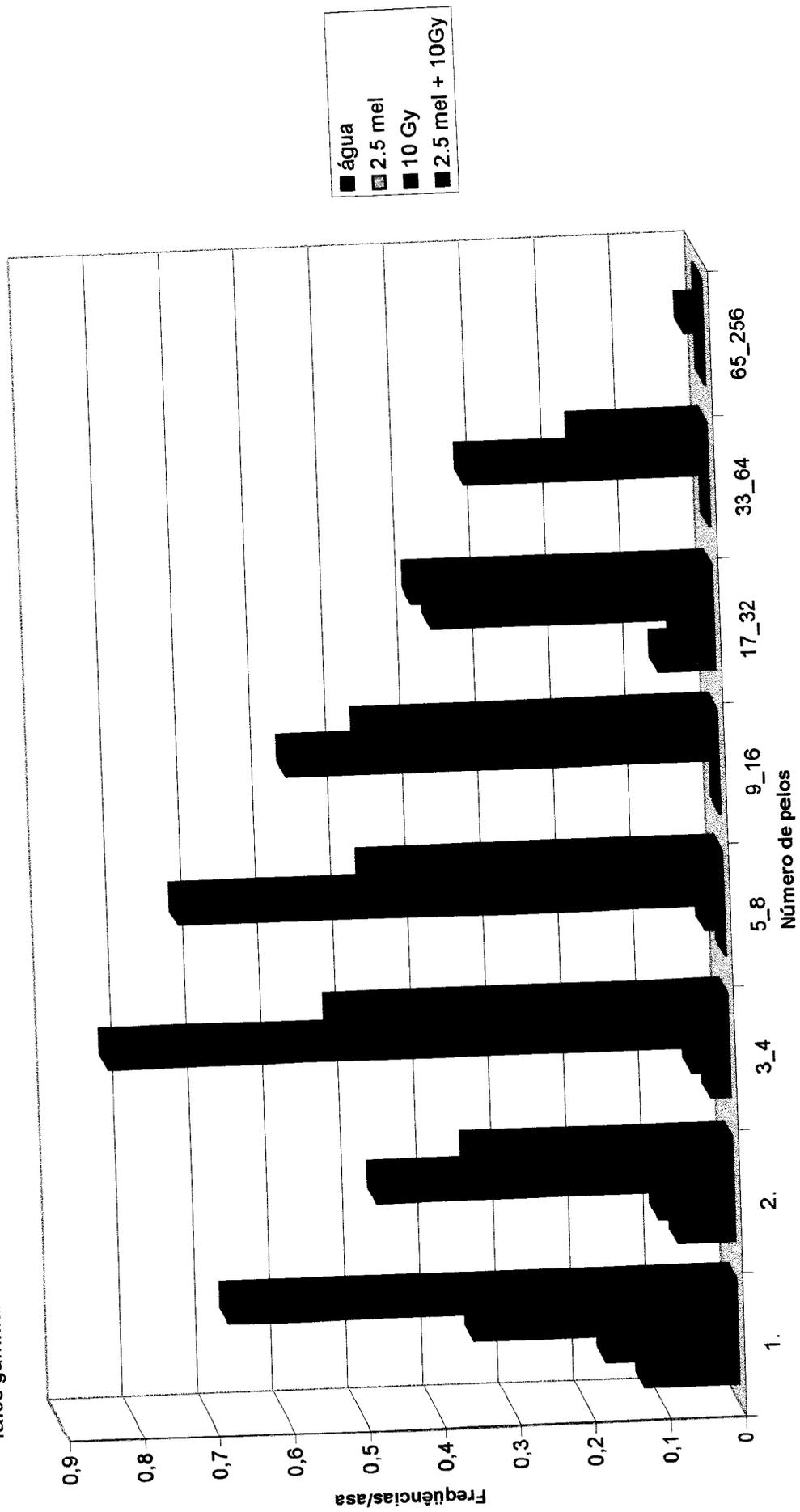
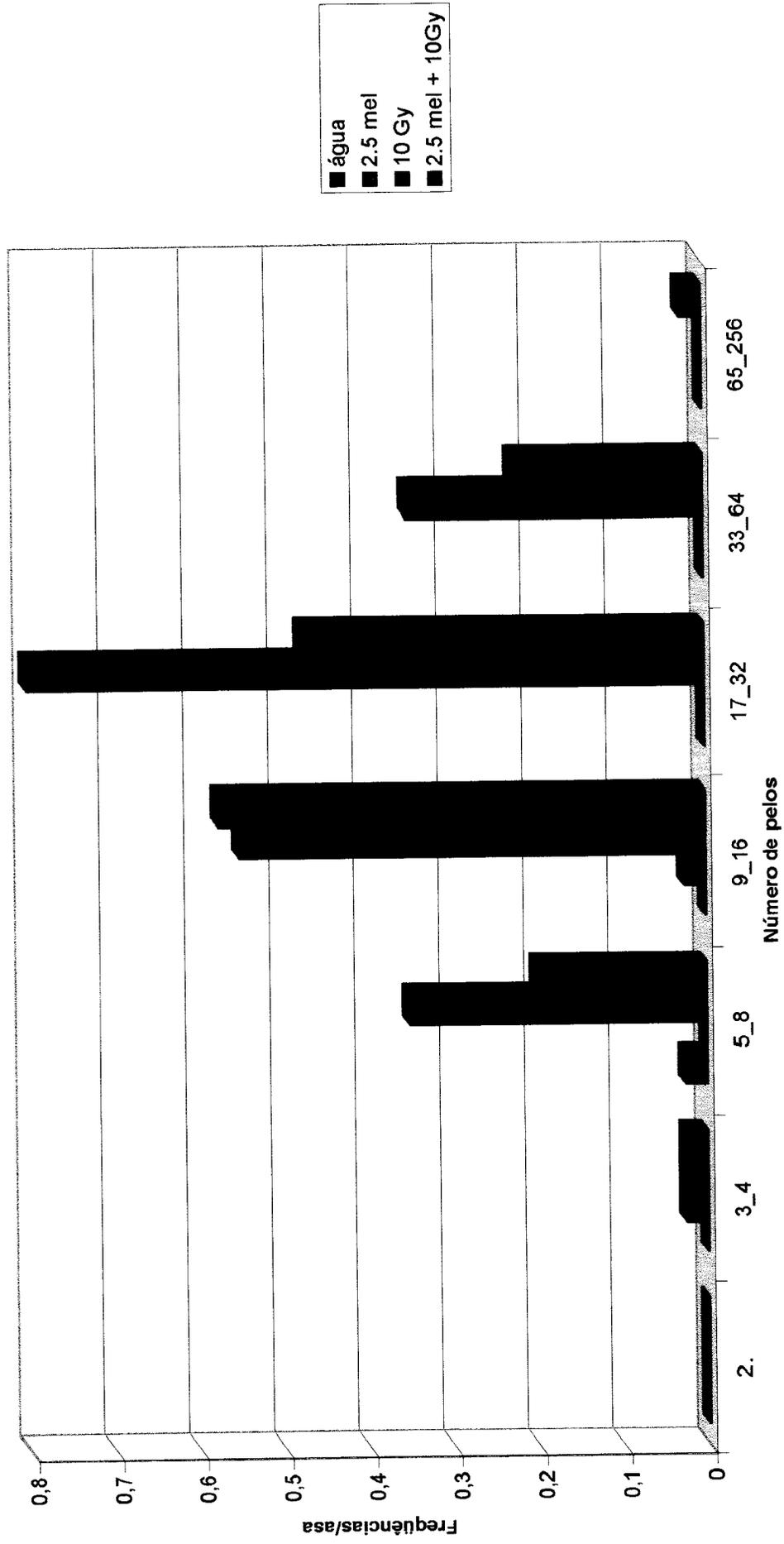


Figura 8. Distribuição do tamanho de manchas gêmeas observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) de *D. melanogaster*, do cruzamento aprimorado de alta capacidade de bioativação, pré-tratadas com melatonina e irradiadas com raios gamma.



## 4.2 – Plasticidade fenotípica

Os índices de tamanho dos indivíduos por tratamento estão representados na figura 9.

O tamanho dos indivíduos variou significativamente para ambos os cruzamentos ( $F = 5,061$ ;  $P = 0,03$  e  $F = 6,445$ ;  $P = 0,001$ ), respectivamente para os cruzamentos ST e IHB.

Para os dois cruzamentos e em todos os tratamentos, o tamanho médio de machos foi significativamente maior que o das fêmeas (Tabelas 3 e 4).

A análise das médias dos tamanhos das asas dos descendentes do cruzamento padrão, utilizando o teste de Tukey, mostrou que houve uma redução estatisticamente não significativa ( $P = 0,805$ ) para os indivíduos tratados com melatonina ( $X = 0,062$ ); e uma redução significativa ( $P = 0,003$ ) para os indivíduos tratados com raios- $\gamma$  ( $X = -0,312$ ), quando comparadas com a média observada no controle negativo (água) ( $X = 0,184$ ). No entanto, o pré-tratamento com 2,5 mg de melatonina / 5 ml de água anulou, de forma estatisticamente significativa ( $P = 0,035$ ), os efeitos provocados pelos raios- $\gamma$  ( $X = 0,062$ ).

A análise das médias dos tamanhos das asas dos descendentes do cruzamento aprimorado de alta bioativação, mostrou que houve um aumento estatisticamente significativo ( $P = 0,033$ ) para os indivíduos tratados com melatonina ( $X = 0,197$ ); e uma redução não significativa ( $P = 0,565$ ) para os indivíduos tratados com raios- $\gamma$  ( $X = -0,115$ ), quando comparadas com a média observada no controle negativo (água) ( $X = -0,016$ ). No entanto, o pré-tratamento com 2,5 mg de melatonina / 5 ml de água protegeu, de forma estatisticamente não significativa ( $P = 0,902$ ), os efeitos provocados pelos raios- $\gamma$  ( $X = -0,063$ ).

Os valores FA2 e FA3 não foram significativamente diferentes entre os tratamentos, ao contrário de FA1 que apresentou diferenças significativas (Tabela 5).

Entretanto, a análise de Tukey para FA1 entre os tratamentos, mostrou que

as diferenças não são estatisticamente significativas (Tabela 6).

Nenhum teste de correlação foi significativo a nível de 5% tanto para FA quanto para o tamanho (Tabela 7). Entretanto, a correlação entre as médias de manchas mutantes e o tamanho dos indivíduos para os diferentes tratamentos de ambos os cruzamentos, foram negativos e quase significativos ( $0,05 < p < 0,1$ ).

Figura 9: Distribuição das médias dos tamanhos das asas de indivíduos provenientes dos cruzamentos ST e IHB.

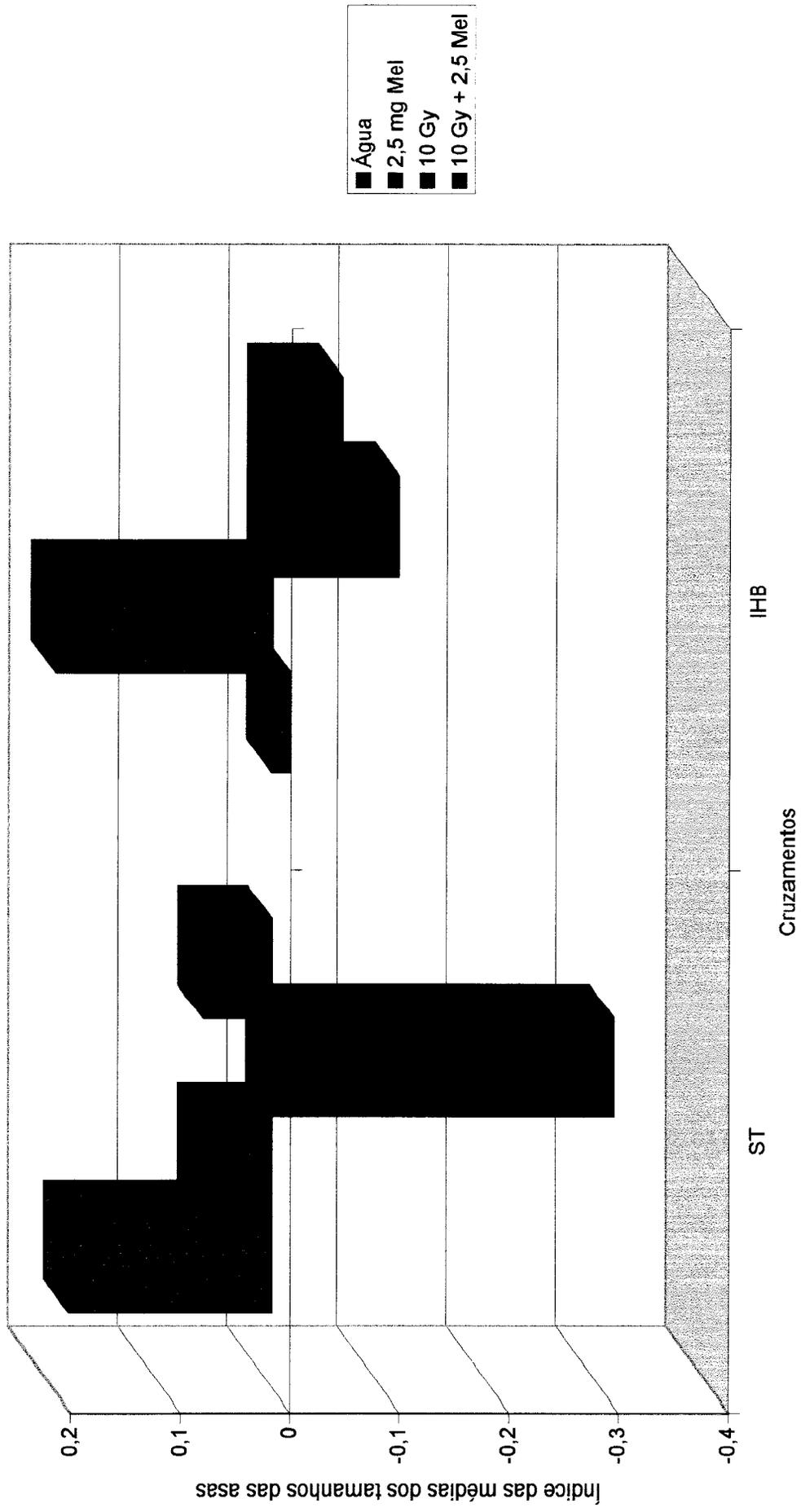


Tabela 3. Análise de Variância (ANOVA para dois fatores – tratamentos e sexo) do tamanho médio de asas de *D. melanogaster* entre machos e fêmeas do cruzamento padrão (ST).

Fontes de variação	Soma dos quadrados	GL	Variância	F	P
Tratamentos	2,778	3	0,926	5,061	0,003
Sexo	69,853	1	69,853	381,802	0,000
Tratamentos + Sexo	0,835	3	0,278	1,522	0,216
Erro	13,173	72	0,183		

Tabela 4. Análise de Variância (ANOVA para dois fatores – tratamentos e sexo) do tamanho médio de asas de *D. melanogaster* entre machos e fêmeas do cruzamento aprimorado de alta capacidade de bioativação (IHB)

Fontes de variação	Soma dos quadrados	GL	Variância	F	P
Tratamentos	1,125	3	0,375	6,445	0,001
Sexo	66,775	1	66,775	1147,679	0,000
Tratamentos + Sexo	0,275	3	0,092	1,574	0,203
Erro	4,189	72	0,058		

Tabela 5. Diferenças dos valores de FA1, FA2 e FA3 dos tratamentos com os controles negativos (Teste de Tukey).

Variável	F	P
FA1	2,222	0,035
FA2	1,403	0,208
FA3	1,134	0,345

Tabela 6. Diferenças de FA1 entre os tratamentos com os controles negativos (Teste de Tukey)

Tratamentos	P	
	ST	IHB
2,5 mel	0,277	0,859
10Gy	0,269	0,996
2,5 mel + 10 Gy	1,000	1,000

Tabela 7. Índices de correlação de Pearson entre médias de tamanho e de FA1, FA2, FA3 com a média de manchas mutantes dos cruzamentos ST e IHB.

Cruzamentos	r			
	Tamanho	FA1	FA2	FA3
ST	-0,84	-0,51	0,85	-0,32
IHB	-0,74	0,79	-0,47	-0,47

## 5 – DISCUSSÃO

O teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (SMART) vem sendo empregado com grande sucesso em vários estudos experimentais, pois apesar de ser relativamente novo, é reconhecido por sua eficiência e credibilidade em detectar substâncias mutagênicas e pró-mutagênicas.

O presente estudo utilizou o SMART para avaliar os possíveis efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos da melatonina, ou o potencial anti-genotóxico da melatonina, quando associada à radiação- $\gamma$ .

Os resultados obtidos demonstraram que a melatonina não possui efeito genotóxico em larvas de 3º estágio de *D. melanogaster*, enquanto que o pré-tratamento apresentou um efeito rádio-protetor.

Esses resultados concordam com os obtidos por Vijayalaximi *et al.* (1995, 1996), que observaram que a melatonina possui efeito rádio-protetor em linfócitos do sangue periférico humano *in vitro* e *in vivo*.

A análise da plasticidade fenotípica de *D. melanogaster* foi realizada por meio das análises das médias dos tamanhos e da flutuação na simetria bilateral das asas.

Os resultados mostraram que os indivíduos controles, e os submetidos à diferentes tratamentos, apresentaram plasticidade fenotípica, tanto na simetria bilateral quanto no tamanho, ou seja, o organismo foi plástico, pois apresentou alterações morfológicas conseqüentes de uma adaptação ao stress vivenciado durante o período de desenvolvimento larval.

Os valores de FA2 e FA3 não foram significativamente diferentes entre os tratamentos, enquanto que FA1 apresentou diferenças significativas. Entretanto, as diferenças de FA1 analisadas pelo teste de Tukey, apresentaram se não significativas para os tratamentos. Percebe-se portanto, que o grau de FA variou nas três medidas efetuadas de modo distinto, o que leva a crer que FA é dependente do caráter e não do indivíduo.

Os dados da análise das médias dos tamanhos evidenciaram as diferenças dos tratamentos entre os cruzamentos. Tais dados indicaram que os efeitos dos raios- $\gamma$  nos indivíduos, no cruzamento padrão, provocou redução significativa no tamanho dos mesmos. Tal efeito foi tamponado significativamente pelo pré-tratamento com melatonina. Já no cruzamento aprimorado de alta capacidade de bioativação, não houve redução significativa no tamanho dos indivíduos, quando submetidos aos raios- $\gamma$ , mas os indivíduos tratados com melatonina foram significativamente maiores.

Isto sugere que, os indivíduos do cruzamento padrão estão sofrendo uma maior diminuição do tamanho devido à uma maior utilização de mecanismos de reparo, na tentativa de amenizar o efeitos da radiação- $\gamma$ .

O grau de flutuação não se correlacionou com os efeitos esperados para os tratamentos efetuados, pois nenhum teste de correlação foi significativo a nível de 5%, além dos sinais dos coeficientes de correlação terem sido tanto positivos quanto negativos. Por outro lado, as médias de manchas mutantes e as médias dos tamanhos dos indivíduos, em todos os tratamentos provenientes de ambos os cruzamentos, se correlacionaram de forma negativa, e quase significativa.

Acredita-se que com o aumento do número de indivíduos investigados e a análise mais pormenorizada das médias das manchas mutantes (que foram feitas sem especificar o tamanho e o tipo de mancha), este coeficiente possa vir a ser significativo.

Portanto, as alterações morfológicas ocorridas nas asas, sugerem que os indivíduos analisados são plásticos frente aos tratamentos efetuados neste estudo.

Recentes estudos demonstraram que células expostas às radiações ionizantes, ou à agentes alquilantes, podem desenvolver uma instabilidade genética prolongada, provocando um aumento da freqüência de mutações de ponto e rearranjos cromossômicos, podendo, assim, levar ao desenvolvimento de canceres e doenças hereditárias (Murname, 1996)

As espécies reativas de oxigênio podem também ser formadas a partir de

processos endógenos (oxidação, metilação, desaminação, e depurinação). Os agentes oxidantes têm capacidade de oxidar os diferentes tipos de moléculas biológicas (lipídeos, proteínas, carboidratos e DNA) por meio da formação de radicais livres e peróxido de hidrogênio (Sies, 1993 *in* Cecchi, 1995).

Os organismos apresentam mecanismos naturais de defesa anti-oxidantes, como, por exemplo, as enzimas superóxido desmutase, glutathione peroxidase e glutathione (Anderson e Francis, 1993 *in* Cecchi, 1995)

Os agentes inibidores da mutagenicidade dos compostos podem agir inibindo a formação de compostos mutagênicos (Mirvish, 1981; Stich *et al.*, 1982 a, 1982 b, *in* Antunes, 1997), inativando substâncias mutagênicas (Kada *et al.*, 1978; Orita *et al.*, 1978 *in* Antunes, 1997), atuando no processo de reparo de DNA (Kada e Kanematsu, 1978 *in* Antunes, 1997), ou então funcionando como: agentes bloqueadores (Watters *et al.*, 1996 *in* Antunes, 1997); seqüestradores de radicais livres (Ames, 1983 *in* Antunes, 1997); ou agentes supressores (Moon *et al.*, 1983 *in* Antunes, 1997),

Sendo assim, os agentes anti-mutagênicos podem, em geral, ser classificados em : bioantimutagênicos, que protegem diretamente a molécula de DNA contra danos (Ramel *et al.*, 1986 *in* Antunes, 1997), atuando mais a nível de reparo, e os desmutagênicos, com capacidade de inativar química ou enzimaticamente os agentes mutagênicos, ou ainda inibir a ativação metabólica de pró-mutagênicos (Kuroda *et al.*, 1992 *in* Antunes, 1997).

Segundo Vijayalaximi *et al.* (1996) o mecanismo de proteção da melatonina pode ser através da ativação de enzimas de reparo, facilitando o reparo no DNA danificado, ou pela ativação de algum outro processo, pelo qual o dano genético inicial primário é significativamente reduzido.

Dados da literatura sugerem que o mecanismo de seqüestrar radicais livres é o mecanismo mais efetivo para a rádio-proteção (Miyazaki *et al.*, 1990 *in* Moralez-Ramírez, 1996)

A ativação da enzima glutathione peroxidase reduz a formação de OH pela metabolização do seu precursor, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Outras enzimas as quais são envolvidas

no reparo de DNA pode também ser induzidas pela melatonina (Vijayalaxmi *et al.*, 1995).

A administração da melatonina em ratos tratados com lipopolissacarídeos (LPS) apresentou uma redução significativamente alta da frequência de micronúcleos, em ambas as células do sangue periférico e da medula óssea. De acordo com Swerynek *et al.* (1996) esta redução se deve a rápida difusão da melatonina no núcleo.

O efeito imunoestimulante poderia ser usado como um argumento que explicaria o aumento da longevidade em animais tratados com melatonina (Maestroni *et al.*, 1988 *in* Reiter, 1992). A idade avançada pode estar relacionada com uma desordem imunológica na qual os níveis sorológicos de anticorpos reativos cerebrais (BRA) estão elevados (Nandi *et al.*, 1983 *in* Reiter, 1992). A implicação é que a melatonina pode prolongar a vida pela supressão da produção de BRA (Reiter, 1992).

Outro possível papel estimulante, no sistema imune, é a supressão do crescimento tumoral (Blask *et al.*, 1984 *in* Reiter, 1992). O mecanismo pelo qual este hormônio melhora a atividade anti-tumoral não é ainda conhecido. A hipótese é que pela produção disparada de uma citoquina, especialmente IL-2, a melatonina pode recuperar a resposta de células T e aumentar a atividade de células Killer, as quais são freqüentemente suprimidas em pacientes com câncer (Wanebo *et al.*, 1985 *in* Neri *et al.*, 1994).

Blickenstaff *et al.* (1994) relataram um aumento da sobrevivência de camudongos Swiss ND4 pré-tratados por 30 min com melatonina (250 mg/kg) e irradiadas com 950 cGy de 6 mV photons produzido por um acelerador linear. Segundo este autor, compostos homólogos vem sendo desenvolvidos, afim de proporcionar uma maior proteção em acidentes nucleares como ocorridos em Goiânia e Chernobyl. (Séries homólogas de aminas de 5-metoxitriptamina são sintetizadas e testadas como radioprotetores).

Devido a esta forte correlação entre mutagênese e carcinogênese, podemos perceber a importância de cada vez mais descobrir agentes anti-mutagênicos naturais ou sintéticos.

A eficácia dos testes utilizados para detecção de mutações e recombinações somáticas, assim como de efeitos antimutagênicos, utilizando células de asas de *Drosophila melanogaster*, tratadas com melatonina e/ou irradiadas com raios- $\gamma$ , é confirmada pelos resultados obtidos na análise da plasticidade fenotípica, que demonstram, claramente, o efeito rádio-protetor da melatonina neste organismo teste, e nessas condições experimentais.

A análise da plasticidade fenotípica de *D. melanogaster* foi realizada por meio das análises das médias dos tamanhos e da flutuação na simetria bilateral das asas.

Os resultados mostraram que os indivíduos controles, e os submetidos a diferentes tratamentos, apresentaram plasticidade fenotípica, tanto na simetria bilateral quanto no tamanho, pois houve flutuação na simetria bilateral e variação no tamanho, em todos os grupos de indivíduos analisados, em ambos cruzamentos, ou seja, o organismo foi plástico, pois apresentou alterações morfológicas conseqüentes de uma adaptação.

Os valores de FA2 e FA3 não foram significativamente diferentes entre os tratamentos, enquanto que FA1 apresentou diferenças significativas. Entretanto, as diferenças de FA1 analisadas pelo teste de Tukey, apresentaram se não significativas para os tratamentos.

Os dados da análise das médias dos tamanhos evidenciaram as diferenças dos tratamentos entre os cruzamentos. Tais dados indicaram que a plasticidade no tamanho dos indivíduos apresenta, no cruzamento padrão, característica negativa significativa com os efeitos genotóxicos da radiação  $\gamma$ , e positiva com os efeitos protetores da melatonina. No cruzamento aprimorado de alta capacidade de bioativação, a plasticidade no tamanho apresentou característica positiva significativa com o tratamento com melatonina.

O fato de que, as flutuações na simetria bilateral não apresentaram diferenças significativas para os tratamentos, enquanto que o tamanho foi alterado de forma estatisticamente significativa negativa, nos tratados com raios  $\gamma$ , sugere que, os indivíduos do cruzamento padrão estão sofrendo uma maior

diminuição do tamanho devido à uma maior utilização de mecanismos de reparo, na tentativa de amenizar o efeitos da radiação  $\gamma$ .

O grau de flutuação não se correlacionou com os efeitos esperados para os tratamentos efetuados, pois nenhum teste de correlação foi significativo a nível de 5%. Enquanto que, as médias de manchas mutantes e as médias dos tamanhos dos indivíduos, em todos os tratamentos provenientes de ambos os cruzamentos, se correlacionaram de forma negativa, mas quase significativa.

A hipótese para essa correlação quase significativa, é que as médias das manchas mutantes foram feitas de forma superficial, ou seja, foram feitas sem especificar o tamanho e o tipo de mancha.

Portanto, as alterações morfológicas ocorridas nas asas, sugerem que os indivíduos analisados são plásticos frente aos tratamentos efetuados neste estudo.

## 6 – CONCLUSÕES

Neste trabalho foi avaliado o potencial anti-genotóxico, e os efeitos genômicos da melatonina, em células somáticas de *Drosophila melanogaster* tratadas com raios- $\gamma$ .

Em vista dos dados obtidos podemos concluir que:

- A radiação- $\gamma$  induz aumento na frequência de manchas mutantes, e reduz significativamente o tamanho dos indivíduos.
- A melatonina não possui efeitos mutagênicos e recombinogênicos.
- A melatonina possui efeito antimutagênico em ambos os cruzamentos.
- A melatonina protege o organismo contra alterações morfológicas (tamanho) induzidas pelos raios- $\gamma$ .
- O grau de flutuação na simetria bilateral não se correlaciona com os efeitos genotóxicos dos raios- $\gamma$  e dos efeitos de proteção da melatonina.

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, L. M.G., 1997. *Efeito protetor das vitaminas C e E sobre os danos cromossômicos induzidos pelo antitumoral doxorrubicina em células de mamíferos in vivo e in vitro*. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto. (Tese, mestrado).
- BAARS, A. J., 1980. Biotransformation of xenobiotics in *Drosophila melanogaster* and its relevance for mutagenicity testing. *Dry metab. Ver.*, 11: 191-221.
- BLICKENSTAFF, R. T., BRANDSTADTER, S. M., REDDY, S. & WITT, R., 1994. Potential radioprotective. 1. Homologs of melatonin. *J.Pharmaceutical Sciences*, 83: 216-218.
- CECCHI, A. O., 1996. *Efeito da vitamina C sobre as aberrações cromossômicas induzidas pelo antitumoral bleomicina em cultura de linfócitos de indivíduos fumantes*. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto. (Tese, mestrado).
- CLARKE, G. M., OLDROYD, B. P. & HUNT, P., 1992. The genetic basis of developmental stability in *Apis mellifera*: Heterozygosity versus geneic balance. *Evolution*, 46 (3): 753-762.
- CLARKE, G. M., 1995. The genetic basis of developmental stability. II. Asymmetry of extreme phenotypes revisited. *Am. Nat.*, 146: 708-725.
- DAPKUS, D. & MERRELL, D. J., 1977. Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 87: 685-697.

- DELPUECH, J-M., MORETEAU, B., CHICHE, J., PLA, E., VOUIDIBIO, J. & DAVID, J. R., 1995. Phenotypic plasticity and reaction norms in temperate and tropical populations of *Drosophila melanogaster*. Ovarian Size and developmental temperature. *Evolution*, 49 (4): 670-675.
- EGGERT, A-K. & SAKALUK, S. K., 1993. Fluctuating asymmetry and variation in the size of courtship food gifts in decorated crickets. *Am. Nat.*, 144: 708-716.
- FREI, H. & WÜRGLER, F. E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila melanogaster* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Res.*, 203: 297-308.
- FRÖLICH, A. J. & WÜRGLER, F. E., 1989. New test strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila melanogaster* wing-spot test. *Mutation Res.*, 216: 179-87.
- GRAF, U., WÜRGLER, F. E., KATZ, A. J., JUON, H. H., HALL, C. B. & KALE, P. G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagenesis*, 6: 153-188.
- GRAF, U & SINGER, D., 1992. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 8: 15-27.
- GRAF, U., & van SCHAIK, N., 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 271: 59-67.
- GUZMÁN-RINCÓN, J. & GRAF, U., 1995. *Drosophila melanogaster* somatic and recombination test as a biomonitor. *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Edited by F. M. Butterworth *et al.*, Plenum Press, New York.

- HÄLSTRÖM, I., 1984. *Cytochrome P-450 in Drosophila melanogaster activity. Gene variation and regulation.* Stockholm. (Ph.D. Thesis).
- LEARY, R. F. & ALLENDORF, F. W., 1989. Fluctuating asymmetry as an indicator of stress: implication for conservation biology. *Tree*, 4 (7): 214-216.
- LEONE, M. A. M. & SKENE, D., 1994. Melatonin concentrations in pineal organ culture are suppressed by sera from tumor-bearing mice. *J. Pineal Res.*, 17 (1): 17-19.
- LIEBERMAN, H. R., WALDHAWSER, F., GARFIELD, G., LYNCH, H. & WURTMAN, R., 1984. Effects of melatonin on human mood and performance. *Brain Res.*, 323: 201-207.
- LINDSLEY, D. L. & ZIMM, G. G. (Eds.), 1992. *The genome of Drosophila melanogaster.* Academic Press, San Diego. 1133.
- MANLY, B. F. J., 1994. *Multivariate statistical methods.* A primer. Second edition. Ed. Chapman e Hall. London.
- MARKOV, T. A., 1995. Evolutionary ecology and developmental instability. *Annu. Rev. Entomol.*, 40: 105-120.
- MOLLER, A. P., 1995. Leaf-mining insects and fluctuating asymmetry in elm *Ulmus glabra* leaves. *Journal of Animal Ecology*, 64: 697- 707.
- MOLLER, A. P. & POMIANKOWSKI, A., 1993. Fluctuating asymmetry and sexual selection. *Genetica*, 89: 267-279.
- MORALES-RAMÍREZ, P., VALLARINO KELLY, T. & RODRÍGUEZ-REYES, R., 1996. Effect of chlorophyllin on gamma ray induced micronuclei in polychromatic erythrocytes of murine peripheral blood determined by the ABC strategy. *Mutation Res.*, 367 (2): 51-56.

- MURNAME, J. P., 1996. Role of induced genetic instability in the mutagenic effects of chemical and radiation. *Mutation Res.*, 367 (1): 11-13.
- NERI, B., FIORELLI, C., MORANI, F., NICITA, G., PAOLETTI, M.C., PONCHIETTI, R., RAUGEI, A., SANTONI, G., TRIPPITELLI, A & GRECHI, G., 1994. Modulation of human lymphoblastoid interferon activity by melatonin in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer*, 73 (12): 3015-3019.
- PALMER, A. R. & STROBECK, C., 1986. Fluctuating asymmetry: Measurement, analysis, patterns. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 17: 391-421.
- PARSONS, P. A., 1990. Fluctuating asymmetry: An epigenetic measure of stress. *Biol. Rev.*, 65: 131-145.
- PARSONS, P. A., 1992. Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genomic stress. *Heredity*, 68: 361-364.
- REITER, R. J., 1992. The Ageing gland and its physiological consequences. *BioEssays*, 14 (3): 169-175.
- RONCO, A. L. & HALBERG, F. 1996. The pineal gland and cancer. *Anticancer Res.*, 16: 2033-2040.
- SEWERYNEK, E., ORTIZ, G. G., REITER, R. J., PABLOS, M. I., MELCHIORRI, D. & DANIELS, W. M., 1997. Lipopolysaccharide-induced DNA damage is greatly reduced in rats treated with the pineal hormone melatonin. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 117 (2): 183-188.
- SHEINER, S. M., 1993. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annu. Rev. Ecol.*, 24: 35-68.
- SHELLARD, S. A., WHELAN, R. D. H. & HILL, B. T., 1989. Growth inhibitory and cytotoxic effects of melatonin and its metabolites on human tumor cell lines *in vitro*. *Br. J. Cancer*, 60: 288-290.

- SCHLICHTING, C. D., 1986. The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 17: 667-693.
- SWADDLE, J. P., WITTER, M. S. & CUTHILL, I. C., 1994. The analysis of fluctuating asymmetry. *Anim. Behav.*, 48: 986-989.
- TOSINI, G. & MENAKER, M., 1996. Circadian rhythms in cultures mammalian retina. *Science*, 272 (5260): 419-421.
- UENO, H., 1994. Fluctuating asymmetry in relation to two fitness components, adult longevity and male mating success in a ladybird beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ecological Entomology*, 19: 87-88.
- VIJAYALAXMI, R, R. J. & MELTZ, M. L., 1995. Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation-induced chromosome damage. *Mutation Res.*, 346: 23-31.
- VIJAYALAXMI, R, R. J., HERMAN, T. S. & MELTZ, M. L., 1996. Melatonin and radioprotection from genetic damage: In vivo / in vitro studies with humans volunteers. *Mutation Res.*, 371: 221-228.
- WEISSBLUTH, L. & WEISSBLUTH, M., 1994. Sudden Infant Death Syndrome: a genetically determined impaired maturation of the photoneuroendocrine system. A unifying hypothesis. *J. Theor. Biol.*, 167 (1): 13-25.
- WOORDOUW, B. C. G., EUSER, E., VERDONK, R. E. R., ALBERDA, B., JONG, F. H., DROGENDIJK, A. C., FAUSER, B. C. J. M., & COHEN, M., 1992. Progestin combinations alter pituitary-ovarian function in women and can inhibit ovulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 74: 108-117.
- ZAR, J. H., 1984. *Biostatistical Analysis*. Second edition. Ed. Prentice-Hall. New Jersey.

## RESUMO

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio sintetizado pela glândula pineal. A produção da melatonina obedece um ritmo circadiano, apresentando produção máxima durante a noite. Para realizar o estudo dos possíveis efeitos anti-genotóxicos da melatonina, associada à radiação gamma, utilizou-se o teste de detecção de mutações e recombinações somáticas (SMART), em asas de *D. melanogaster*. Foram utilizados dois cruzamentos: 1) Cruzamento padrão (ST-“Standard Cross”) no qual fêmeas *flr<sup>3</sup>/ln(3LR)TM3, ri p<sup>p</sup> sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>* foram cruzadas com machos *mwh / mwh*. 2) Cruzamento aprimorado de alta capacidade de bioativação (IHB - “Improved High Bioactivation Cross”) no qual fêmeas *ORR; flr<sup>3</sup>/ln(3LR)TM3, ri p<sup>p</sup> sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>* foram cruzadas com machos *mwh / mwh*. As larvas resultantes destes cruzamentos foram pré-tratadas por 2 h com melatonina (2,5 mg / 5 ml de água) em 0,5 mg de celulose em pó (Merck). Após o pré-tratamento, parte das larvas foram tratadas com 10 Gy de raios- $\gamma$ , emitidos por uma bomba de cobalto 60. Investigou-se também, os efeitos genômicos da radiação- $\gamma$  e atuação reparadora da melatonina, por meio da análise de plasticidade fenotípica morfológicas, em adultos de *D. melanogaster*. Para isto, foram realizadas medições nas asas para verificar alteração no tamanho e flutuação na simetria bilateral. Os resultados observados demonstraram que, a radiação- $\gamma$  induz aumento significativo na frequência de manchas mutantes; reduziu significativamente o tamanho dos indivíduos. A melatonina não possui efeitos genotóxicos; apresentou efeitos anti-genotóxicos; atuou contra alterações morfológicas (tamanho) induzidas pelos raios- $\gamma$ . Enquanto que, o grau de flutuação na simetria bilateral não se correlacionou com os efeitos genotóxicos dos raios- $\gamma$ , e os efeitos de proteção da melatonina.

