

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E ANTIGENOTÓXICOS DO
AVELÓS (*Euphorbia tirucalli*) EM *Drosophila melanogaster***

ANGELA PFEIFER DE OLIVEIRA

**JÚLIO CÉSAR NEPOMUCENO
(Orientador)**

Monografia apresentada ao Curso de
Agronomia, da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de
Engenheiro Agrônomo.

Uberlândia – MG
Fevereiro – 2003

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E ANTIGENOTÓXICOS DO
AVELÓS (*Euphorbia tirucalli*) EM *Drosophila melanogaster***

APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA EM ____ / ____ / ____

Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno
(Orientador)

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó
(Membro da Banca)

Prof. Dr. Malcon A. Manfred Brandeburgo
(Membro da Banca)

Uberlândia – MG
Fevereiro – 2003

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, ao meu esposo Leandro, à minha mãe Rosa, à minha irmã Aline, e à minha sogra Neusa, por terem me ajudado nos passos mais difíceis desta caminhada.

Agradeço ao meu pai Vicente, que mesmo não estando mais entre nós, tinha como maior sonho de sua vida me ver formada um dia

Agradeço ao Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno que orientou o meu trabalho e que foi um amigo quando precisava. Ao Prof. Dr. Mário Antônio Spanó, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, que sempre me auxiliou, esclarecendo minhas dúvidas e por ter paciência comigo. Ao Prof. Dr. Malcon A. Manfred Brandeburgo, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, que participou da avaliação do meu trabalho com muita boa vontade.

Gostaria de agradecer também à Dona Maria Aparecida Vilela, auxiliar do Laboratório de Citogenética e Mutagênese, que sempre nos ajudou e nos divertiu muito com suas conversas.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e Mutagênese: Vânia, Elaine, Shirleny, Silmara, Bruno, Cristina, Lidiane, Silma, Regildo, Luciana e Ana Paula, que são ótimas pessoas e que sempre se dispuseram a me ajudar quando precisava.

Agradeço à psicóloga Ana Paula da Universidade Federal de Uberlândia, que me ajudou muito nesta última etapa do meu curso.

E por fim agradeço a Duda, pela companhia de todo dia.

ÍNDICE

RESUMO	5
1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 <i>Euphorbia tirucalli</i> (Avelós).....	9
2.2 Características da planta.....	10
2.3 <i>Drosophila melanogaster</i>	13
2.4 Teste para Detecção de Mutações e Recombinações Somáticas induzidas em células de asas de <i>Drosophila melanogaster</i> (SMART).....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Látex da <i>Euphorbia tirucalli</i>	17
3.2 Agentes químicos.....	18
3.3 Teste Para Detecção de Mutações e Recombinações Somáticas em células de asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	18
3.3.1 Linhagens estoques.....	18
3.3.2 Cruzamento entre as linhagens mutantes.....	19
3.4 Procedimento.....	19
3.5 Preparação das asas para análise.....	20
3.6 Análise microscópica das asas.....	21
3.7 Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS	22
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÕES	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

RESUMO

O Avelós (*Euphorbia tirucalli*) é uma planta da família Euphorbiaceae que vem sendo utilizada popularmente no tratamento do câncer. O princípio ativo da possível ação tumoricida é encontrado no látex da planta ou metabólitos exudados por ela. Esta planta nativa da África chegou ao Brasil em 1892. É considerada uma planta tóxica, pois o seu látex é corrosivo em contato com pele e mucosas. Para comprovar a sabedoria popular, utilizamos o teste de mancha da asa de *Drosophila melanogaster* (Somatic Mutation and Recombination Test – SMART) para avaliar os possíveis efeitos genotóxicos da solução de látex, na concentração de 0,33µL / 1mL de água; 0,5µL / 1mL de água e 1µL / 1mL de água. Na avaliação dos possíveis efeitos antígenotóxicos, as mesmas concentrações da planta foram associadas à ciclofosfamida (1mM). Para tanto, foram utilizadas larvas de 3 dias de idade, resultantes do Cruzamento Padrão (ST) (fêmeas *flr³* x machos *mwh*) e de Alta Capacidade de Bioativação (HB) (fêmeas *ORR; flr³* x machos *mwh*). Os resultados obtidos demonstraram que a planta não apresentou comprovado efeito genotóxico nas doses utilizadas. Porém, quando se usou a associação 1µL / 1mL mais ciclofosfamida, notamos a potencialização do efeito genotóxico da ciclofosfamida, nos descendentes do cruzamento

HB. No entanto, o teste de antigenotoxicidade não apresentou diferença, estatisticamente significativa, quando comparado ao tratamento com ciclofosfamida isolada. Podemos concluir que nas doses trabalhadas e nas condições experimentais utilizadas, o látex da *E. tirucalli* não apresentou efeito genotóxico, nem antigenotóxico.

1. INTRODUÇÃO

Diz a sabedoria popular que nas plantas estão as curas para todas as doenças. O ditado pode estar certo, mas é sabido que nem todas as plantas são benéficas ao homem ou aos animais. É a partir destes dois princípios que a pesquisa vem estudar o poder de cura de determinadas plantas, tentando provar se é realmente proveitosa à saúde humana e se as mesmas causam algum efeito colateral.

O uso das plantas, seja na forma de chás, infusões, etc. pode levar ao aparecimento de efeitos genotóxicos ou antígenotóxicos (VÂNIA,2002) e (NEPOMUCENO,1999).

Para Burns E Bottino (1991) mutação é a alteração repentina, súbita e herdável na estrutura do material genético. Implicam em mudanças qualitativas ou quantitativas do material genético. Hoje sabemos que mutações são causadas por radiações como luz ultravioleta ou por agentes químicos como: aflatoxina B1, bromo-uracil e uretano.

Em *Drosophila melanogaster* foi desenvolvido um teste de genotoxicidade, o Teste de Detecções de Mutações e Recombinações Somáticas (SMART), que é capaz de

detectar um amplo espectro de alterações genéticas: mutações, deleções e recombinações mitóticas (GRAF *et al.*, 1984).

Com o intuito de avaliar os efeitos genotóxicos e antigenotóxicos da *E. tirucalli*, testamos o látex da planta, por meio do teste SMART, em asas de *Drosophila melanogaster*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Euphorbia. tirucalli* – Avelós

Conhecido por árvore-do-lápis, por causa dos seus ramos cilíndricos, o Avelós é uma excelente cerca-viva. Em diversos países africanos, e também na maioria dos Estados do Nordeste Brasileiro, as plantações de Avelós funcionam como verdadeiras proteções contra invasores. A planta produz um suco leitoso cáustico, de efeito altamente irritante à pele e também aos olhos – esse látex pode provocar uma conjuntivite gravíssima. Nem mesmo o gado se aproxima do conjunto de árvores, daí sua utilização, em algumas regiões, como cerca de áreas de pastagens e mesmo de pequenas plantações (SCHVARTSMAN, 1979).

A mesma planta usada contra invasores das propriedades particulares também é indicada, na medicina popular, como complemento de tratamento de tumores cancerosos e pré-cancerosos. Na África e na Índia, o Avelós é ainda empregado como repelente de mosquitos. Também se tornou um comprovado mata-verrugas devido aos seus componentes cáusticos (LYMAN *et al.*, 1988).

Planta arbustiva originária do Sul do continente africano, propagou-se por todas as regiões tropicais do planeta. Aclimatou-se bem em lugares de clima quente, especialmente

no Nordeste do Brasil (CORRÊA, 1978). A partir da década de 70, pesquisadores norte-americanos começaram a se interessar pelo Avelós. Apelidaram a planta de árvore-do-petróleo, certos de que o seu látex poderia no futuro ser transformado em combustível. Mas, até agora, sua principal função continua a ser a de uma cerca bem mais barata que a feita com outros materiais, como arames, por exemplo (BALBACH, 1974).

2.2 Características da planta

Há referências de que o Avelós (*E. tirucalli*) teria sido introduzido no Brasil pela primeira vez no município de Caruaru, em Pernambuco, em 1892. As mudas teriam sido trazidas pelos africanos, junto com outras plantas, como a Guiné (TOLEDO e VALTER, 1976).

O Avelós é uma planta de porte arbustivo. Alcança, no máximo, 6 metros de altura. Na África, de onde é originário, o exemplar normalmente atinge esse tamanho. No Brasil, geralmente não ultrapassam a altura de 3 metros. É uma vegetação arbustiva bastante comum na caatinga nordestina (JOLY, 1966).

Propícia à regiões de clima quente, o Avelós é extremamente ramificado. Seus galhos são cilíndricos, flexíveis e de tamanhos irregulares. Vistos de perto, são repletos de estrias finas e esbranquiçadas. Os ramos verdes, em forma de lápis, constituem sem dúvida a maior atração ornamental da planta. As folhas são muito pequenas e caem facilmente. Depois de amadurecidas, as flores também não permanecem muito tempo nas extremidades dos ramos (BALBACH, 1974).

As diminutas flores do Avelós são dispostas em ciátio – tipo de florescência em que há uma flor feminina nua (sem cálice e corola), constituída apenas pelo gineceu, e várias flores masculinas, cada uma delas reduzida a um estame com pedicelo. Todo o conjunto é

protegido por um involúcro de brácteas (folhas modificadas, geralmente coloridas) amarelas ou esverdeadas que desabrocham nas extremidades dos ramos. O fruto é uma cápsula recoberta de pêlos e que contém três sementes. Ao contrário das outras plantas representantes da família Euforbiaceae, como a igualmente tóxica coroa-de-cristo, o tronco e os galhos do Avelós não têm espinhos (TOLEDO e VALTER, 1976).

Embora seja uma árvore ornamental, só é conveniente plantá-la nos jardins em volta de cercas. Seu látex é altamente tóxico e pode tornar-se um grande perigo, especialmente em casas com crianças. Os ramos estouram facilmente, mediante simples toque, deixando assim o látex livre (BALBACH, 1974).

O látex da *E. tirucalli*, originário de Madagascar, contém um constituinte irritante tipo ingenane e tigliane, ésteres diterpênicos derivados de álcoois engenol e phorbol (FÜRSTENBERGER e HECKER, 1986). Eles são caracterizados como 13-O-acetyl-12-O-acylphorbol e 12-O-acetyl-13-O-acylphorbol derivados, carregando ácidos homólogos conjugados insaturados como o grupo acil (FÜRSTENBERGER e HECKER., 1977). Os principais constituintes irritantes são: 12, 13 acetatos isoméricos acilatos de phorbol assim como 3 acilatos do engenol (FÜRSTENBERGER e HECKER., 1986). Apesar da alta insaturância dos grupos acil, todos os fatores da *Euphorbia* ou grupos de fatores isolados são altamente sensíveis à alta oxidação (FÜRSTENBERGER e HECKER , 1977).

No látex irritante e promotor de tumores da *E. tirucalli*, originária do Sul da África, também foram identificados ingenane e tigliane irritantes. O éster irritante e promotor de tumores 4-deoxyphorbol é caracterizado, química e biologicamente (FÜRSTENBERGER e HECKER, 1985). Comparações da estrutura e atividade biológica do 12, 13-diésteres de 4-deoxyphorbol distinguem quanto ao número de átomos de carbono e de cadeias duplas

conjugadas, a medida em que crescem, reduzem a atividade promotora de tumores (FÜRSTENBERGER e HECKER., 1985).

No látex, originário de Madagascar a falta do éster 4-deoxyphorbol no látex quando comparado com o látex originado do Sul da África prova a existência de uma outra variedade química da *E. tirucalli* (FÜRSTENBERGER e HECKER., 1986). O extrato da *E. tirucalli* coletado na Colômbia, produziu 12-O-2Z-4E-octadienoyl-4-deoxyphorbol-13-acetate. Porém o diéster 4-deoxyphorbol insaturado encontrado no látex da *E. tirucalli* do Sul da África não foi observado (KINGHORN, 1979).

Algumas estruturas ativas, como os ésteres diterpênicos, promotores de tumor da *E. tirucalli* produzem excelentes instrumentos na pesquisa experimental do câncer (FÜRSTENBERGER e HECKER., 1985).

As plantas de *E. tirucalli* que recebem grande quantidade de luz solar apresentaram ação molusquicida no *Biomphalaria glabrata*, com LD 50 obtido na concentração de 28 ppm e LD 90 na concentração de 85 ppm. Entretanto, a larga distribuição da planta, sua fácil propagação e o simples procedimento de extração do látex da planta, que é biodegradável, favorece o Avelós como agente promissor no controle da esquistossomose (JURBERG *et al.*, 1985).

O linfoma de Burkitt (BL), um vírus Epstein-Barr (EBV) associado ao linfoma não maligno de Hodgkin, é endêmico em uma área da África conhecida como Cinturão do Linfoma (VAN DE BOSCH *et al.*, 1993). Aya *et al.* (1991) acreditam que a *E. tirucalli*, que é nativa em partes da África onde o linfoma de Burkitt é endêmico, pode ser um importante fator de risco para a ocorrência da doença.

A dupla exposição do EBV e o éster 4-deoxyphorbol purificado, derivado da planta *E. tirucalli*, induziu uma alta frequência de rearranjos cromossômicos em linfócitos B humanos, *in vitro* (AYA *et al.*, 1991).

A ativação do genoma EBV foi induzida utilizando-se solo e água de beber encontrados em volta das plantas, indicando fortemente que as pessoas que moram na área endêmica do BL são frequentemente expostas a uma substância promotora do EBV (MIZUNO *et al.*, 1986).

2.3 *Drosophila melanogaster*

Conhecida como mosca de fruta. Foi considerada como um animal experimental ideal para estudos genéticos, pois possui um sistema enzimático que permite o metabolismo de agentes xenobióticos, e também por ser organismo pequeno, de fácil manutenção, pequeno tempo de geração, grande progênie e baixo número de cromossomos (GRAF *et al.*, 1984).

2.4 Teste para Detecção de Mutações e Recombinações Somáticas induzidas em células de asas de *Drosophila melanogaster* (SMART)

É o sistema teste descrito por Graf *et al.* (1984), que é utilizado para detecção de atividades mutagênicas e recombinogênicas ocorridas no cromossomo 3 de *Drosophila melanogaster*.

O SMART, de acordo com Graf *et al.* (1984), foi desenvolvido para detectar a perda de heterozigose de genes que determinam a expressão de fenótipos detectáveis nas asas das moscas. É um teste rápido, de fácil realização e baixo custo. Nele, as larvas trans-heterozigotas são expostas aos componentes testes por períodos de tempo variados (GRAF *et al.*, 1984).

No SMART são utilizadas três linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*:

1) linhagem *multiple wing hairs (mwh)*, que possui um gene marcador. O marcador *multiple wing hairs* é mantido na linhagem como uma mutação viável em homozigose recessiva. A mutação *mwh* está localizada no cromossomo 3 (3-0,3) e em condições de homozigose produz múltiplos tricomas por célula, ao invés de apenas um único tricoma, como normalmente acontece; 2) A linhagem *flare3 (flr³)*, que possui um gene marcador recessivo *flare3 (flr³)* que afeta a forma do pêlo da asa. Ele também está localizado no cromossomo 3, mas em posição mais proximal (3-38,8). Ele produz pêlos mal formados que têm a forma de uma chama; 3) linhagem *ORR; flare3 (ORR; flr³)*, construída por Frölich e Würigler (1990), que possui um gene marcador em hemizigose (*flr³*) no cromossomo 3 (3-38,8), que afeta os pêlos das células das asas, modificando-os parecendo uma chama, e um no cromossomo 2, transferido de uma linhagem selvagem de Oregon R (*ORR*), resistente ao DDT (DAPKUS e MERREL, 1997). Esta linhagem “*ORR; flare3*” é caracterizada por um aumento na atividade de enzimas citocromo P-450 (GUZMÁN- RINCÓN e GRAF, 1995). Os alelos mutantes *flr* conhecidos são letais em homozigose recessiva nos zigotos (os zigotos homozigotos para *flr³* não são capazes de desenvolver moscas adultas). Ao contrário, células homozigotas do disco imaginal são viáveis e levam à formação de células mutantes nas asas. Devido à letalidade, o alelo *flr* é mantido contrabalanceado por um cromossomo homólogo balanceador com múltiplas inversões cromossômicas e um gene marcador dominante (*TM3, Bds – Third multiple, Beaded – Serrate*) (GUZMÁN-RINCÓN e GRAF, 1995).

Atualmente o SMART, usado para detecção de manchas mutantes em asas de *Drosophila melanogaster*, tem sido realizado por meio de dois cruzamentos: Cruzamento

Padrão (ST – “Standard Cross”) no qual fêmeas virgens da linhagem *flare-3* são cruzadas com machos *multiple wing hairs* (GRAF *et al.*, 1984); Cruzamento de Alta Bioativação (HB – “High Bioactivation Cross”), no qual fêmeas virgens de linhagem “*ORR-flare-3*” com machos *multiple wing hairs* (GRAF e VAN SCHAIK, 1992). Desse cruzamento são obtidos dois tipos de descendentes, trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH). Nos adultos são analisadas as asas por meio do microscópio óptico de luz.

Caso ocorra uma alteração genética em uma das células do disco imaginal, durante a metamorfose das moscas, tais células se diferenciam e se expressam em mutações nos pêlos das asas para *multiple wing hairs (mwh)* e *flare (flr)*. As mutações induzidas são detectadas em moscas adultas que apresentam manchas simples (com fenótipo *mwh* ou *flr*) ou gêmeas, com os dois tipos de pêlos mutantes.

O registro desta frequência e tamanho de diferentes manchas permite a determinação quantitativa de efeitos mutagênicos e recombinogênicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Látex da *E. tirucalli*

O látex da *E. tirucalli* foi obtido na região do Triângulo Mineiro, em Uberlândia, Minas Gerais.

Neste experimento foram usadas três concentrações diferentes do látex para o teste SMART, sendo:

- a) 0,33 microlitros de látex diluído em 1 ml de água destilada estéril;
- b) 0,5 microlitros de látex diluído em 1 ml de água destilada estéril;
- c) 1,0 microlitros de látex diluído em 1 ml de água destilada estéril.

A extração do látex, bem como as preparações das diluições foram feitas momentos antes de cada tratamento.

3.2 Agentes químicos

A Ciclofosfamida, de nome comercial “Enduxan” (Laboratório Roche) ou “Genuxal”, é um agente alquilante (2-[bis(2-cloroetil)amino]tetrahydro-2H-1,3,2-oxafosforino2-óxido).

A Ciclofosfamida é um agente químico usado em amplo espectro clínico e tem um provado efeito no tratamento de câncer (GRINBERG-FUNES *et al.*, 1990). É uma das

drogas imunossupressoras mais utilizadas. É usada em casos de leucemia, esclerose múltipla (CRUZ *et al.*, 2000), carcinomas, micose fúngica adiantada, mieloma múltiplo, câncer de bexiga, câncer do endométrio, câncer de ovário, câncer de testículo, câncer de mama (PIATO *et al.*, 2002), lúpus eritematoso (BALBI *et al.*, 2001), artrite reumatóide, vasculite (LINO *et al.*, 1998).

Este agente químico foi cedido pelo Dr. Rogério Agenor de Araújo, chefe do setor de oncologia do Hospital do Câncer de Uberlândia, MG.

3.3. Teste para Detecção de Mutações e Recombinações Somáticas em células de asas de *Drosophila melanogaster* (GRAF *et al.*, 1984)

3.3.1 Linhagens Estoques

Foram utilizadas três linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*, portadoras dos marcadores genéticos *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e *flare* (*flr*³, 3-38,8).

I. *multiple wing hairs* (*mwh*), com constituição genética y: *mwh* jv.

II. *flare-3* (*flr*³), com constituição genética *flr*³/*In*(3LR)TM3, *ri p^p sep1(3)89Aabx^{34e} e Bd^s*.

III. *ORR; flare-3* (*ORR; flr*³), com constituição genética *ORR; flr*³/*In*(3LR)TM3, *ri p^p sep1(3)89Aabx^{34e} e Bd^s*.

Os estoques são mantidos em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura de *Drosophila melanogaster*: 820 ml de água, 25 g de fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*), 11 g de ágar, 156 g de banana e 1 g de nipagin.

3.3.2 Cruzamentos entre as linhagens mutantes

I. Cruzamento Padrão – ST – Standard Cross – (GRAF *et al.*, 1984)

Fêmeas virgens *flr*³/*In*(3LR)TM3, *ri p^p sep1(3)89Aabx^{34e} e Bd^s* cruzadas com machos *mwh/mwh*.

II. Cruzamento de Alta Capacidade de Bioativação (HB – High Bioactivation Cross - GRAF E VAN SCHAICK, 1992).

Fêmeas virgens *ORR; flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep 1(3)89Aabx^{34e} e Bd^s* cruzadas com machos *mwh/mwh*.

3.4 Procedimento

Os ovos foram coletados por um período de 8 horas em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% de ágar em água) e uma camada de fermento (*S. cerevisiae*) suplementado com açúcar. Após 72 ± 4 horas, larvas de 3º estágio foram lavadas com água corrente e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina. Grupos de aproximadamente 100 larvas foram transferidas para tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura) contendo 1,5 g de purê de batatas da marca YOKI e 5,0 ml de diferentes concentrações de Avelós.

Os tratamentos foram realizados de acordo com o protocolo da figura 1.

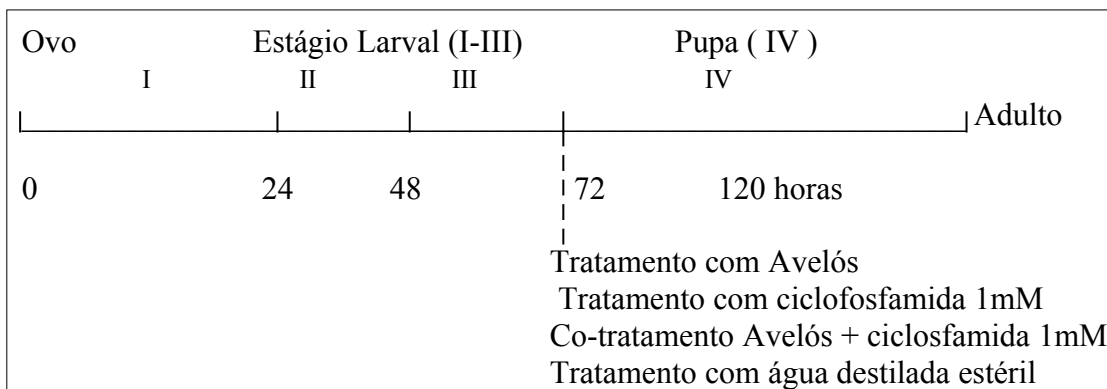


Figura1: Protocolo de tratamento de Larvas de *Drosophila melanogaster*, descendentes dos Cruzamentos ST e HB.

De ambos os cruzamentos foram obtidos 2 tipos de descendentes: 1) trans-heterozigotos marcados (*mwh +/+ flr³*) - asas fenotipicamente do tipo selvagem e, 2)

heterozigoto balanceado (*mwh +/+ TM3, Bd^s*) - asas fenotipicamente do tipo serrilhada. As moscas adultas emergentes foram coletadas e fixadas em etanol 70%.

3.5 Preparação das asas para análise

As asas das moscas foram retiradas, embebidas em solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 1,5 g de hidrato de cloral e 50 ml de água destilada) e distendidas sobre uma lâmina seca.

Em seguida, as lâminas foram mantidas por 24 horas sobre placa aquecedora (40°C). No final, procedeu-se a montagem com lamínula, e secagem por mais de 48 horas.

Neste experimento, apenas os descendentes trans-heterozigotos marcados foram analisados.

3.6 Análise microscópica das asas

As análises das asas foram realizadas em microscópio de luz (objetiva 40X). Foram registrados o número e os tipos de manchas encontradas (simples ou gêmeas) assim como o tamanho das mesmas, e a posição em que se encontram na asa. Aproximadamente 24.400 células foram analisadas por asa.

Ao final da análise, foram comparadas as freqüências de manchas encontradas nas moscas tratadas com *E. tirucalli*. As freqüências de manchas encontradas na associação *E. tirucalli* com ciclofosfamida (1mM) foram comparadas com o controle positivo (ciclofosfamida 1mM).

3.7 Análise estatística

A análise estatística dos experimentos realizados para verificação da possível ação genotóxica do Avelós foi realizada por meio do teste descrito por Frei e Würigler (1988). Para a análise estatística de antigenotoxicidade as frequências de cada tipo de mancha, por mosca, foram comparadas aos pares (Ex.: controle negativo versus positivo; Ciclosfosfamida isoladamente versus Ciclosfosfamida + Avelós).

4. RESULTADOS

A **Tabela 1** apresenta os resultados obtidos na análise dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH), do Cruzamento Padrão (ST), tratados com diferentes diluições de Avelós (0,33 μ L Avelós/1mL; 0,5 μ L Avelós/1mL; 1 μ L Avelós/1mL;).

As frequências totais de manchas, bem como todas as categorias de manchas mutantes (pequenas simples, grandes simples e gêmeas) apresentaram resultados estatisticamente inconclusivos, para todas as diluições testadas, quando comparadas com o controle negativo (água).

Verifica-se, porém, que as frequências totais de manchas mutantes, nas diversas diluições, são maiores que as frequências encontradas no controle água.

Na **Tabela 2** os resultados obtidos dos tratamentos com os descendentes (MH), do Cruzamento de Alta Bioativação (HB), mostram aumentos porém não significativos, nas frequências de manchas simples pequenas.

Na categoria de manchas simples grandes ocorreu um resultado inconclusivo na diluição 1 μ L Avelós/1mL. Os resultados foram inconclusivos para as manchas gêmeas, em todas as diluições de Avelós.

A **Tabela 3** apresenta os resultados obtidos na análise dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH), do Cruzamento Padrão (ST), tratados com diferentes diluições de Avelós (0,33 μ L Avelós/1mL; 0,5 μ L Avelós/1mL; 1 μ L Avelós/1mL;) em associação com ciclofosfamida 1mM e ciclofosfamida 1mM somente.

Para todas as diluições do látex de Avelós (0,33 μ L Avelós/1mL; 0,5 μ L Avelós/1mL; 1 μ L Avelós/1mL;). associadas a ciclofosfamida 1mM, as frequências de manchas grandes simples e gêmeas foram estatisticamente inconclusivas.

A **Tabela 4** apresenta os resultados obtidos na análise descendentes trans-heterozigotos marcados (MH), do Cruzamento de Alta Bioativação (HB), tratados com diferentes diluições de Avelós (0,33 μ L Avelós/1mL; 0,5 μ L Avelós/1mL; 1 μ L Avelós/1mL;).em associação com ciclofosfamida 1mM comparado com os tratamentos com ciclofosfamida 1mM somente.

Na diluição (0,33 μ L Avelós/1mL), associada com a ciclofosfamida 1mM, ocorreu um aumento, estatisticamente significativo nas frequências totais de manchas quando comparadas com as frequências do controle ciclofosfamida 1mM. Nesta mesma diluição e associação foi observado também, um aumento nas frequências de manchas simples pequenas.

Nas demais diluições (0,33 μ L Avelós/1mL; 0,5 μ L Avelós/1mL) associadas a ciclofosfamida 1mM, os resultados foram inconclusivos para manchas simples grandes e manchas gêmeas.

A Figura 2 apresenta as frequências totais de manchas mutantes por mosca, observadas em asas dos descendentes “MH” de *Drosophila melanogaster*, provenientes dos

cruzamentos “ST” e “HB”, tratadas com diferentes concentrações de Avelós (0,33µL Avelós/1mL; 0,5µL Avelós/1mL) isoladamente e associado a ciclofosfamida 1mM.

Tabela 1: Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes "MH" de *Drosophila melanogaster*, do Cruzamento Padrão(ST), tratados com diferentes diluições de Avelós (*Euphorbia tirucalli*)

Tratamentos	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (nº. de manchas) diag. Estatístico ^a				Total manchas mwh ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2	MSG (>2 céls) ^b m = 5	MG m = 5	TM m = 2	
Contr. Neg.	20	0,55 (11)	0,00 (00)	0,05 (01)	0,60 (12)	12
Ave 0,33uL/1mL água	20	0,90 (18) i	0,00 (00) i	0,05 (01) i	0,95 (19) i	19
Ave 0,50uL/1mL água	20	0,60 (12) i	0,15 (03) i	0,05 (01) i	0,80 (16) i	15
Ave 1,00uL/1mL água	20	0,90 (18) i	0,15 (03) i	0,00 (00) i	1,05 (21) i	20

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

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

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

MSP – manchas simples pequenas

MSG – manchas simples grandes

MG – manchas gêmeas

TM – total de manchas

Tabela 2: Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes "MH" de *Drosophila melanogaster*, do Cruzamento de Alta Bioativação (HB), tratados com diferentes diluições de Avelós (*Euphorbia tirucalli*)

Tratamentos	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (nº. de manchas) diag. Estatístico ^a				Total manchas mwh ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2	MSG (>2 céls) ^b m = 5	MG m = 5	TM m = 2	
Contr. Neg.	20	1,20 (24)	0,40 (08)	0,05 (01)	1,65 (33)	32
Ave 0,33uL/1mL água	20	1,25 (25) -	0,05 (01) -	0,05 (01) i	1,35 (27) -	27
Ave 0,50uL/1mL água	20	1,75 (35) i	0,15 (03) -	0,05 (01) i	1,95 (39) -	39
Ave 1,00uL/1mL água	20	1,60 (32) i	0,35 (07) i	0,00 (00) i	1,95 (39) -	39

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

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

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

MSP – manchas simples pequenas

MSG – manchas simples grandes

MG – manchas gêmeas

TM – total de manchas

Tabela 3: Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes "MH" de *Drosophila melanogaster*, do Cruzamento Padrão (ST), tratados com diferentes diluições de Avelós (*Euphorbia tirucalli*) associadas a ciclofosfamida 1mM

Tratamentos	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (n ^o . de manchas) diag. Estatístico ^a				Total manchas mwh ^c (n)
		MSP	MSG	MG	TM	
		(1-2 céls) ^b m = 2	(>2 céls) ^b m = 5	m = 5	m = 2	
CPH 1mM	20	2,25 (45)	0,15 (03)	0,10 (02)	2,50 (50)	50
Ave 0,33uL/1mL água +CPH 1mM	20	2,45 (49) -	0,15 (03) i	0,05 (01) i	2,65 (53) -	53
Ave 0,50uL/1mL água +CPH 1mM	20	1,95 (39) -	0,30 (06) i	0,05 (01) i	2,25 (45) -	44
Ave 1,00uL/1mL água +CPH 1mM	20	1,45 (29) -	0,35 (07) i	0,05 (01) i	1,85 (37) -	37

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

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

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

MSP – manchas simples pequenas

MSG – manchas simples grandes

MG – manchas gêmeas

TM – total de manchas

Tabela 4: Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes "MH" de *Drosophila melanogaster*, do Cruzamento de Alta Bioativação (HB), tratados com diferentes diluições de Avelós (*Euphorbia tirucalli*) associadas a ciclofosfamida 1mM

Tratamentos	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (n ^o . de manchas) diag. Estatístico ^a				Total manchas mwh ^c (n)
		MSP	MSG	MG	TM	
		(1-2 céls) ^b m = 2	(>2 céls) ^b m = 5	m = 5	m = 2	
CPH 1mM	20	4,95(90)	0,95 (19)	0,25 (05)	5,70 (114)	113
Ave 0,33uL/1mL água +CPH 1mM	20	6,40 (128) f+	1,00 (20) -	0,15 (03) i	7,55 (151) f+	148
Ave 0,50uL/1mL água +CPH 1mM	20	5,35 (107) -	0,85 (17) i	0,25 (05) i	6,45 (129) -	127
Ave 1,00uL/1mL água +CPH 1mM	20	5,15 (103) -	0,55 (11) i	0,10 (02) i	5,80 (116) -	116

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

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

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

MSP – manchas simples pequenas

MSG – manchas simples grandes

MG – manchas gêmeas

TM – total de manchas

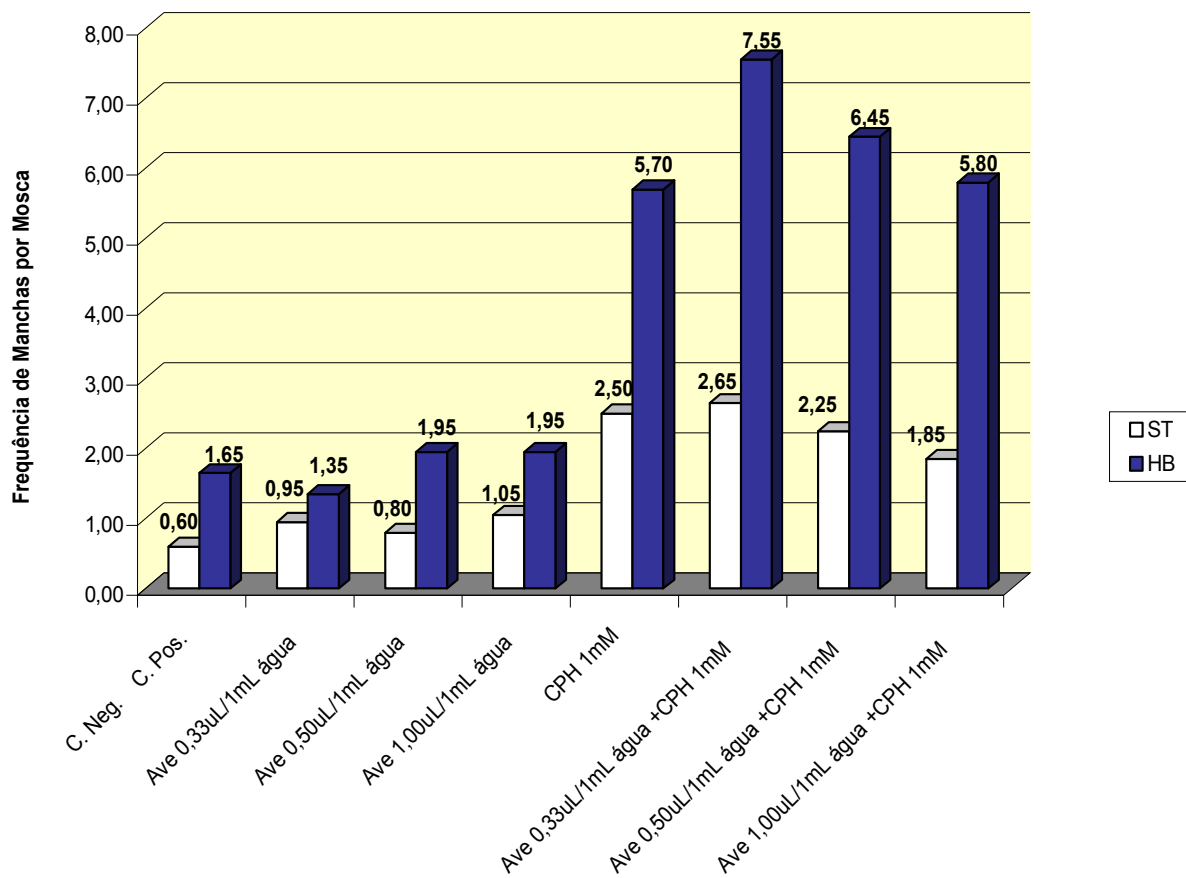


Figura 2 – Frequências totais de manchas mutantes por mosca, observadas em asas dos descendentes “MH” de *Drosophila melanogaster*, provenientes dos cruzamentos “ST” e “HB”, tratadas com diferentes concentrações de Avelós (0,33µL Avelós/1mL; 0,5µL Avelós/1mL; 1µL Avelós/1mL;), isoladamente e associado à ciclofosfamida 1mM.

5. DISCUSSÃO

A indicação na medicina popular para o uso do látex, no tratamento do câncer, é de aproximadamente 2 gotas em um copo de água. Em função desta concentração, utilizada popularmente, foram feitas as diluições e tratamentos descritos neste trabalho.

Na avaliação da atividade genotóxica das diluições do látex de *E. tirucalli* (0,33µL Avelós/1mL; 0,5µL Avelós/1mL; 1µL Avelós/1mL;) foram observados aumentos, porém não significativos, nas frequências de manchas mutantes, nos descendentes dos cruzamentos “ST” e “HB”. Nos descendentes do Cruzamento de Alta Bioativação os aumentos, não significativos, ocorreram apenas nos totais de manchas daqueles indivíduos tratados com (0,5µL Avelós/1mL; 1µL Avelós/1mL;).. Estes resultados mostram que nestas condições experimentais o látex de Avelós não é genotóxico.

Os resultados negativos, quanto à indução da genotoxicidade pelo látex de Avelós, podem ser devido às diluições feitas neste experimento. É provável, que com uma maior concentração do látex, ocorram resultados positivos, tendo em vista os aumentos, porém não significativos, nas frequências de manchas nas maiores concentrações do látex.

Contudo, existem evidências, nos estudos feitos por Fürstenberger e Hecker (1986), que sugerem o aparecimento de variedades de plantas, diferentes daquela encontrada no Sul

da África. Na Colômbia, encontra-se a *E. tirucalli*, assim como na África, com compostos irritantes semelhantes ao da planta africana, porém com princípio ativo completamente diferente (KINGORN, 1979). É possível, também, que os compostos da planta ou o princípio ativo da mesma, que induz a genotoxicidade, não sejam encontrados nas plantas do Brasil.

Na associação do látex de *E. tirucalli* com a ciclofosfamida 1mM não foram verificadas diminuições, estatisticamente significativas, nas freqüências de manchas mutantes, induzidas por este agente genotóxico, nos descendentes de ambos cruzamentos (ST e HB).

Na diluição de (1 μ L Avelós/1mL), associada à ciclofosfamida 1mM, ocorreu uma diminuição, porém não significativa, nas freqüências de manchas simples pequenas, nos descendentes do cruzamento ST.

Esta redução pode ser, provavelmente, devido a uma ação citotóxica do látex de Avelós em associação à toxicidade da ciclofosfamida 1mM. Esta possível ação citotóxica pode ter levado a uma diminuição das células mutantes e, conseqüentemente, uma diminuição nas freqüências de manchas mutantes.

Contudo, na maior diluição do látex 0,33 μ L Avelós/1mL de água, associada a ciclofosfamida 1mM, verificou-se, nos descendentes de Cruzamento de Alta Bioativação (HB), um aumento, estatisticamente significativo nas freqüências de manchas mutantes, quando comparadas com o controle ciclofosfamida 1mM. Acreditamos que por ser esta uma

concentração mais diluída do látex, não tenha ocorrido uma maior ação citotóxica, mas sim, uma potencialização dos efeitos genotóxicos induzidos pela ciclofosfamida.

6. CONCLUSÕES

O látex extraído da *E. tirucalli*, encontrado em Uberlândia-MG, não teve efeito genotóxico claramente comprovado, nem tampouco antigenotóxico, nas doses testadas no experimento. Porém, à medida que as concentrações do látex aumentam há um aumento da frequência da atividade genotóxica.

É possível que, dependendo da concentração do látex, pacientes submetidos a tratamentos concomitantes com ciclofosfamida e Avelós possam agravar os efeitos colaterais deste agente quimioterápico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYA, T.; KINOSHITA, T.; IMAI, S.; KOIZUME, S.; MIZUNO, F.; OSATO, T.; SATOH, C.; OIKAWA, T.; KUZUMAKI, N.; OHIGASHI, H. Chromosome translocation and c-MYC activation by Epstein-Barr virus and *E. tirucalli* in B lymphocytes. **Lancet**, v. 337, p. 1190. 18 May, 1991.

BALBACH, A. **Flora nacional na medicina doméstica**. Edições A Edificação do Lar, SP, 2002. p.102-105.

BALBI, A. L.; BARBOSA, R. A.; LIMA, M. C. P.; DE ALMEIDA, D. B. Estudo comparativo das complicações terapêuticas no lúpus eritematoso sistêmico e nas glomerulopatias idiopáticas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.47, n.4, p. 296-301. Oct./Dec. 2001.

BURNS, G. W. e BOTTINO, P. J. **Genética**. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1991. 381p.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das planta úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional. 1978. Rio de Janeiro. v.2. 408 p.

CRUZ, B. A.; QUEIRÓZ, E.; NUNES, S.V.; FILHO, A.C.; CAMPOS, G.B.; MONTEIRO, E. L. C.; CRIVELLARI, H. Fenômenos de Raynoud grave associado à terapia com interferon – beta para esclerose múltipla. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.58, n.2B, p. 556-559. June 2000.

DAPKUS, D.; MERRELL, D. J. Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*.. **Genetics**, v.87, p.685-697. 1977.

FREI, H. and WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research**, v.203, p. 297-308. 1988.

FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F. E. *Drosophila* Wing Spot Test: Improved Detectability of Genotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Mutation Research**, v.234, p.71-80. 1990.

FÜRSTENBERGER, G.; HECKER, E. New highly irritant Euphorbia factors from latex of *E. tirucalli* L. **Experientia**, v.33, n.8, p. 235-239. 15 August, 1977.

FÜRSTENBERGER, G.; HECKER, E. On the active principles of the spurge family (Euphorbiaceae). XI. [1] The skin irritant and tumor promoting diterpene esters of *E. tirucalli* L. originating from South Africa. **Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences**, v.9, n.10, p. 631-646. Sep./Oct. 1985.

FÜRSTENBERGER, G.; HECKER, E. On the active principles of the Euphorbiaceae, XII. Highly unsaturated irritant diterpene esters from *E. tirucalli* L. originating from Madagascar. **Journal of Natural Products**, v.49, n.3, p. 386-397. May./Jun. 1986.

GRAF, U.; WÜRGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; HALL, C. B.; KALE, P. B. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v.6, p. 153-188. 1984.

GRAF, U.; VAN SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.271, p.59-67. 1992.

GRINBERG-FUNES D.; SHELDON C. ; WEISS, M. The use of prostaglandin F2 for the prophylaxis of cyclophosphamide – induced cystitis in the rat. **Journal of Urology** . v.44, p. 1500-1504. 1990.

GUZMÁN-RINCON, J. and GRAF, U. *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test as a biomonitor. In: BUTTERWORTH, F. M.; CORKUM, C. D.; GUZMÁN-RINCON, J. Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. **Plenum**, New York, p. 169-181. 1995.

JOLY, A. B. **Botânica**: Introdução à taxonomia vegetal. Ed. Nacional. 1966. São Paulo. v.4. 350 p.

JURBERG, P.; CABRAL NETO, J.B.; SCHALL, V.T. Molluscicide activity of the “avelós” plant *E. tirucalli* L. on *Biomphalaria glabrata*, the mollusc vector of schistosomiasis. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v.80. n.4, p. 423-427. Oct./Dec.1985.

KINGHORN, A.D. Characterization of an irritant 4-deoxyphorbol diester from *E. tirucalli*. **Journal of Natural Products**. v.42, n.1, p. 112-115. Jan./Feb. 1979.

LINO, M. M. A.; HIRATA, M.T.A.; BAÊTA, A.M.; TSANACLIS, A.M.C.; SCAFF, M.; MARCHIORI, P.E. Terapêutica intravenosa com metilprednisolona e ciclofosfamida na

vasculite do sistema nervoso periférico. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.56 n.2, p. 274-280. June 1988.

LYMAN, B. S.; ROBERT J. D.; ROBERTO, M. K. **Flora ilustrada catarinense (Euforbiaceas)**. Ed. Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária S.A. 1988. Santa Catarina. 408p.

MIZUNO, F.; AYA, T.; KINOSHITA, T.; IMAI, S.; KOIZUME, S.; OSATO, T.; KUZUMAKI, N.; OHIGASHI, H.; HIRAI, N.; HIROTA, M.; KOSHIMIZO, K. Epstein-Barr virus-enhancing plant promoters in east Africa, **AIDS Reserch**, v.2 ,n.1, p. 151-155. December 1986. Suppl. 1.

NEPOMUCENO, J. C.; SPANÓ, M. A.; WÜRGLER, F. E.; GRAF, U. Efeito protetor da *Moringa oleifera* contra a ação genotóxica da mitomicina C em *D. melanogaster* (abstract). **Genetics and Molecular Biology**., 127p, 21 November 1998. Suppl. 127.

PIATO, J. R. M.; BARROS, A. L. S. D.; PINCERATO, K.N.; VIGÁRIO, A.O.; PINOTTI, J.A. Acurácia do linfonodo sentinela em pacientes com câncer inicial da mama tratadas com quimioterapia neoadjuvante. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v.24, n.2, p. 81-86, Março 2002.

PIMENTA, V. M. S. D. **Atividade recombinogênica induzida pelo *Plantago major* (Tanchagem) em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2002. 89f. Dissertação de mestrado. Pós-graduação de genética e bioquímica, Uberlândia, 2002.

SCHVARTSMAN, SAMUEL. **Plantas venenosas**. São Paulo. 1979. p.81-83.

STADLER, L. J. Mutations in Barley induced by X-rays and radium. **Science**, v.68, p.186-187. 1928.

TOLEDO, C. R.; WALTER B. M. **Botânica econômica brasileira**. Edusp. 1976. p.46-52.

VAN DEN BOSCH, C.; GRIFIN, B.E.; KAZEMB, P.; DZIWENI, C.; KADZAMIRA, L. Are plant factors a missing link in the evolution of endemic Burkitt's lymphoma? **British Journal of Cancer**, v.68, n.6, p. 1232-1235, December 1993.