

Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal

Cristiane Alves da FONSECA¹
Denise Gonçalves PEREIRA²

1. Farmacêutica-bioquímica, mestre em Bioquímica e Biologia Molecular, docente da disciplina de Biologia Molecular e Genética, Universidade Estadual de Goiás (UEG), Anápolis (GO).
2. Bióloga, docente da disciplina de Genética, Universidade Estadual de Goiás (UEG), Anápolis (GO).
Autor responsável: C.A. Fonseca. E-mail: tinina@cultura.com.br

INTRODUÇÃO

As plantas são capazes de produzir diferentes substâncias tóxicas em grandes quantidades, aparentemente para sua defesa contra vírus, bactérias, fungos e animais predadores. Tais substâncias vêm sendo estudadas e caracterizadas. Entretanto, são poucos os estudos toxicológicos e genotóxicos dessas substâncias.

Segundo a OMS, aproximadamente 80% da população utilizam medicamentos à base de produtos naturais no alívio de alguma sintomatologia desagradável. Há uma riqueza muito grande na flora brasileira, estimada em 120 mil espécies, das quais apenas 1% tem sido estudada, do ponto de vista fitoquímico ou farmacológico. Pesquisa desenvolvida por Rizzo *et al.* (1996) constatou que é expressivo o percentual da população que faz uso de plantas medicinais do cerrado na grande Goiânia (GO).

A Genética Toxicológica tem por objetivo detectar e entender a ação de determinadas substâncias denominadas genotoxinas sobre o organismo, com especificidade para ácidos nucleicos, especialmente DNA. O termo genotóxico se refere às alterações letais e/ou hereditárias, que são transmitidas, tanto pelas células somáticas, como pelas germinativas (Vogel, 1989).

Toda e qualquer alteração no DNA ou RNA, que pode afetar qualitativamente ou quantitativamente o gene, é considerada uma mutação e pode ser transmitida aos descendentes, se forem atingidas células germinativas, gerando indivíduos com uma ou mais características genéticas diferentes.

Existem ainda evidências experimentais que sugerem o envolvimento das mutações somáticas em doenças humanas relacionadas a anomalias neurológicas, destacando-se a arteriosclerose, bem como no processo gradual e progressivo de envelhecimento (Cunha, 1995). Uma das maneiras de se prevenir o efeito adverso de certos produtos químicos e substâncias naturais é a triagem de seu potencial genotóxico, através de testes rápidos realizados especialmente com bactérias, drosófila, camundongos e cultura de células.

A avaliação do potencial genotóxico de muitas substâncias utilizadas pela população tem sido empregada, através dos testes biológicos com a *Drosophila melanogaster*. São os chamados testes rápidos para células germinativas (Ring-x-loss e SLRL) e células somáticas (SMART/asa e SMART/olho).

Entre os testes que têm se mostrado eficiente na avaliação de genotoxicidade está SMART/olho (*white/white plus - coral eye mosaic system*) desenvolvido por Becker (1976) e aprimorado por Vogel e Zijlstra (1987), que caracteriza-se por ser um teste rápido, simples, de baixo custo e baseia-se na análise de alterações como deleções, conversões gênicas e outros eventos ocorridos em células somáticas de *D. melanogaster* pré-tratadas com substância a ser testada.

A. D. melanogaster, conhecida como mosca-da-fruta, é um organismo eucarionte, da ordem Díptera, com $2n = 8$ cromossomos sendo 3 pares de autossomos e 1 par sexual, tem sido material biológico largamente utilizado pelos pesquisadores, por ser de fácil manutenção em laboratório, ter um ciclo reprodutivo curto, fornecer um grande número de indivíduos por progênie e apresentar reações metabólicas semelhantes às dos mamíferos, o que permite um certo grau de extrapolação para humanos (Graf, 1994). Além destas características, apresenta um excelente banco de informações sobre mutações, ecologia e comportamento (Andrade *et al.*, 1991).

A utilização de plantas como recurso terapêutico é uma prática generalizada na medicina popular e tem aumentado acentuadamente nas últimas décadas. Apesar da ampla utilização das plantas medicinais, pouca informação se encontra disponível sobre seus constituintes, bem como sobre os riscos em potencial oferecidos à saúde humana.

A espécie herbácea ou arbustiva de *Hyptidendron canun* (*H. canun*), pertencente à família *Labiatae*, que apresenta ampla dispersão no cerrado brasileiro, cuja extensão ocupa 20 a 25% da área total do Brasil, mostrando-se como um ecossistema complexo e com formações que vão desde campo limpo até cerradão (Eitten, 1994). É usada pela comunidade em forma de chá, infusão e decocção (Brandão, 1991), em função da sua ação farmacológica como antimalarial, anti-inflamatória, anti-hepatotóxica e anticancerígena (Ferri e Ferreira, 1992) dentre outras, devido à presença de metabólicos secundários, como alcalóides, flavanóides, lactonas, terpenos e lignóides (Simões *et al.*, 1989). Os óleos essenciais secretados no gênero *Hyptis* têm importante ação farmacológica, como anestésico, antiespasmódico, anti-inflamatório, além de abortivo em doses elevadas (Stasi *et al.*, 1996).

Tendo em vista que algumas plantas, utilizadas comumente pela população podem apresentar atividades genotóxicas, torna-se oportuna a realização de pesquisas, visando a conhecer a genotoxicidade dessas plantas, não só para determinar o risco genético como ferramenta para avaliar os potenciais de desenvolvimento de tumores malignos nos indivíduos ou populações expostas a agentes genotóxicos químicos e físicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da planta

A Fitoterapia é uma ciência que visa ao tratamento de algumas doenças, através das ervas e plantas que apresentem propriedades curativas. Este fato desperta o interesse pelo estudo fitoquímico e farmacológico das plantas, de forma especial daquelas existentes no cerrado cuja análise pode conduzir a metabólitos secundários que podem apresentar maior ou menor atividade tóxica.

O uso terapêutico de um fitoterápico pode ocorrer de diferentes maneiras, através de cataplasmas, infusão, suco, chá, tintura, unguento, vinho medicinal etc, sendo as partes vegetativas mais utilizadas as raízes, os caules e as folhas (Brandão, 1991).

A espécie *Hyptidendron canun* (*H. canun*) (figura 1), pertencente à família *Labiatae*, gênero *hyptis*, que é caracterizada como sendo uma planta herbácea ou arbustivas, com folhas opostas, cruzadas, inteiras, pecioladas ou sésseis, tendo em sua citogenética um número cromossômico diversificado, variando desde $2n=16$ até $2n=64$, e a poliploidia o evento mais comum (Harley e Heyubod, 1992).

H. canun apresenta como propriedade medicinal a ação antifúngica, antiulcerativa, analgésica, anticancerígena, antimicrobiana etc (Ferri e Ferreira, 1992). Todas as propriedades medicinais referidas devem-se à presença de substâncias químicas que têm como principais grupos de metabólitos secundários os alcalóides (compostos de origem biossintética que apresentam uma enorme diversidade química, cuja função está relacionada a marcadores filogenéticos, ocorrendo naturalmente no reino vegetal); terpenos (substâncias caracterizadas por apresentarem cinco átomos de carbono, podendo variar o número e estão relacionados aos carotenóides que são pigmentos essenciais à fotossíntese); flavanóides (compostos secundários com ocorrência exclusiva em plantas superiores e responsáveis pela coloração das flores); lignanas (substâncias encontradas nas espécies lenhosas, com importantes ações farmacológicas, quer seja pela diversidade química estrutural, quer seja pelo amplo espectro de atividade biológica – Stasi *et al.*, 1996).

Outros grupos encontrados são os das lactonas, substâncias isoladas do ácido duodecanóico denominadas genericamente de hiptolídeos, altamente diversificadas em sua extensão e na estereoquímica dos vários centros quirais. Os óleos essenciais presentes nas plantas do gênero *Hyptis* são líquidos oleosos com química diversificada, localizados em estruturas secretoras.



Figura 1- Planta medicinal *Hyptidendron canun*. Aspecto de uma planta herbácea ou arbustiva, com folhas opostas, cruzadas, inteiras, pecioladas ou sésseis.

O teste Ring-x-loss

O Ring-x-loss é um teste rápido com apenas uma geração, que detecta eventos clastogênicos, que geralmente são devido a quebras cromossômicas como a perda do cromossomo X em anel, na progênie de machos previamente tratados de *Drosophila melanogaster* (Zijlstra e Vogel, 1988).

O teste Ring-x-loss envolve duas diferentes linhagens de *Drosophila melanogaster*: fêmeas $ywsn^3$ (com marcadores genéticos: y (yellow) para cor do corpo – amarelo; w (White) para cor do

olho – branco; sn^3 (singed) cerdas curtas que serão cruzadas com machos Ring-x (forma do olho – barrado; cor do olho – sépia; cor do corpo – cinza; forma das cerdas – normais) que foram previamente ampliadas em meio banana, contendo: banana nanica, açúcar, ágar, nipagin, ácido propiônico e fermento dissolvido em água.

Os machos Ring X foram submetidos a um jejum de quatro a seis horas e logo em seguida foram tratados por 24 horas. O tratamento foi realizado, em tubos de fundo chato previamente preparados com algodão e papel filtro e posteriormente, hidratados com a suspensão da planta *H. canun* a ser testada em três diferentes concentrações: D1-0.004g/ml; D2-0.006g/ml; D3-0.009g/ml. O controle positivo foi o Uretano-0,04g/ml e o controle negativo a solução aquosa de sucrose a 5%. Os machos foram cruzados com fêmeas virgens, visando a analisar o efeito de compostos da *H. canun* em células germinativas de diferentes momentos da gametogênese, seguindo o sistema de ninhada (ninhada 1: 72 horas; ninhada 2: 48 horas e ninhada 3: 48 horas).

Tabela 1 - Cronograma de ovoposição

Zero (0.0h)	3 dias (72h)	2 dias (120h)	2 dias (168h)
Cruzamento dos machos tratados por 24 h.	Brood - 1	Brood - 2	Brood - 3

Análise da F1

A análise é feita, apenas da geração F1, dez dias após o cruzamento, com a emergência das moscas adultas, durante quatro-cinco dias consecutivos. A combinação de vários marcadores genéticos (cor e forma do olho, cor do corpo, forma das cerdas) permite o aparecimento na F1, de 11 classes fenotípicas:

* NORMAIS:

- CLASSE 1: fêmea (Xp/Xm) – olho vermelho, riniforme, corpo amarelo e cerdas normais.
- CLASSE 2: macho ($Xm/Y+YB^s$) – olho branco e em barra, corpo selvagem e cerdas retorcidas.

* MUTANTES:

- CLASSE 3: macho (Xm/O) – perda total do cromossomo X em anel; olho branco e redondo (normal), corpo amarelo e cerdas retorcidas.
- CLASSE 4: mosaico ($Xm/O - Xm/Xp$) – perda total do cromossomo X em anel na porção masculina; olho branco e redondo, corpo amarelo e cerdas retorcidas. No lado feminino: olho vermelho e reniforme, corpo amarelo e cerdas normais.
- CLASSE 5: fêmea ($Xm/Xp/y^+YB^s$) – não-disjunção no macho: olho vermelho e em barra, corpo selvagem e cerdas retorcidas.
- CLASSE 6: macho (Xm/y^+Y) – perda parcial do braço longo do cromossomo Y: olho branco e em barra, corpo amarelo e cerdas retorcidas.
- CLASSE 7: macho ($XmYB^s$) – perda do braço curto do cromossomo Y: olho branco e em barra, corpo amarelo e cerdas retorcidas.
- CLASSE 8: mosaico ($Xm/yYB^s - Xm/YB^s$) – perda do cromossomo Y, no braço curto; lado A: olho branco e em barra, corpo selvagem e cerdas retorcidas. Lado B: olho branco e me barra, corpo amarelo e cerdas retorcidas
- CLASSE 9: fêmea ($Xm/Xm/y^+YB^s$) – não disjunção na fêmea: olho branco e em barra, corpo selvagem e cerdas retorcidas

- CLASSE 10: fêmea (Xm/XM) – não-disjunção na fêmea: olho branco, redondo, corpo amarelo e cerdas retorcidas.
- CLASSE 11: macho (Xm/O) não-disjunção na fêmea: olho vermelho e reniforme, corpo amarelo e cerdas retorcidas.

Análise estatística

A análise foi feita, segundo Frei e Wrügler (1988), considerando-se as hipótese (Ho – hipótese nula, onde se considera que não haja diferença entre o controle negativo (K-) e o tratamento e Ha – hipótese alternativa que determina que o tratamento leva a um aumento da frequência de mutações, quando comparadas com as frequências de mutações espontâneas), que permitem classificar o resultado como: positivo, negativo fraco-positivo e inconclusivo.

Teste de Qui-quadrado (X²)

O resultado de X² calculado foi comparado com um valor de X² na tabela, com um nível de significância especificado, unilateral = 2.706 e com 0,5 (1 GL), podendo ou não aceitar Ho, dependendo do resultado.

RESULTADOS

O teste rápido Ring-x-loss baseia-se na perda do cromossomo X em anel em células pós-meióticas. Com este teste, podemos detectar eventos, como a perda total do cromossomo X e/ou Y, mosaïcismo e não-disjunção, ocorridos em células germinativas. Machos da linhagem Ring X, tratados por 24 horas, com extrato da folha de *Hyptidendrom canun* foram cruzados com fêmeas virgens yw^{sn3} pela técnica de brooding (ninhada 1, 2 e 3).

O extrato foi usado nas seguintes concentrações: D1-0.004g/ml; D2-0.006g/ml e D3-0.009g/ml em solução aquosa de sucrose à 5%. Para controle positivo foi utilizado uretano à 0.04g/ml e para controle negativo, usou-se sucrose a 5%.

As figuras 2, 3 e 4 mostram a frequência de perda completa do cromossomo X em anel, para as ninhadas 1, 2 e 3, ocorridas em espermatozoides, espermátides adultas e espermátides jovens, respectivamente. Não foi observada uma diferença significativa entre os tratamentos.

A análise fenotípica da geração F1 forneceu uma porcentagem média de perda cromossômica para *Hyptidendrom canun* de 1.63% para dose 1; 1.78% para dose 2 e 1.89% para dose 3. Tomando-se o controle negativo como referência (2 a 4%), a análise estatística forneceu um resultado negativo, indicando que *Hyptidendrom canun*, não provoca perda cromossômica parciais, totais ou não-disjunção em células germinativas de *Drosophila melanogaster*. Os resultados obtidos nos permitiu concluir que o extrato da planta *Hyptidendrom canun*, nas referidas concentrações, não se mostrou capaz de induzir alterações mutacionais, bem como não-disjunção, deleção ou perda cromossômica. Sendo assim, torna-se viável a utilização da planta pela população, porém fica a necessidade da realização de novos testes em células somáticas.

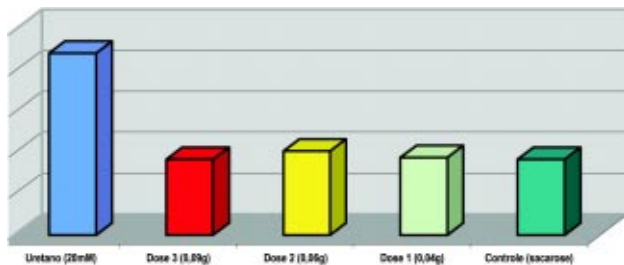


Figura 2 -Frequência de perda completa do cromossomo X em anel, em espermatozoides (ninhada 1) de *D. melanogaster* tratados com diferentes concentrações do extrato de *H. canun*.

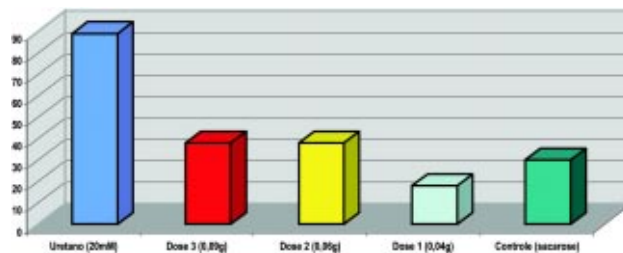


Figura 3 - Frequência de perda de cromossomo X em anel, em espermátides adultas (ninhada 2) de *D. melanogaster*, tratadas com diferentes concentrações do extrato de *H. canun*

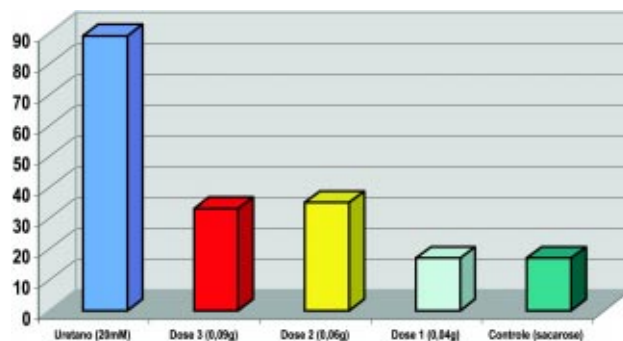


Figura 4 - Frequência de perda completa do cromossomo X em anel, em espermátides jovens (ninhada 3) de *D. melanogaster*, tratadas com diferentes concentrações do extrato de *H. canun*.

DISCUSSÃO

O aparecimento de algumas doenças e o alto custo dos medicamentos têm levado a população a procurar o apoio na medicina alternativa, fazendo uso de remédios preparados com plantas medicinais, por estes serem de fácil acesso e mais econômico. Porém a preocupação com o uso indiscriminado de certas plantas está no fato de não conhecermos o verdadeiro potencial genotóxico, bem como a ação farmacológica de todas as espécies.

Pesquisas e estudos têm mostrado que muitas substâncias extraídas de plantas medicinais podem causar danos no material genético, caracterizando-se em mutação (adição, substituição ou deleção de base no DNA).

Muitos testes estão à disposição dos pesquisadores para avaliação dos efeitos genotóxicos e/ou carcinogênicos de diferentes substâncias, utilizando também diferentes organismos, como microrganismos, plantas, roedores e *Drosophila*.

No Brasil, diversas plantas já tiveram sua genotoxicidade estudada, tais como a lobeira (Carmo et al, 1997), o barbatimão (Sousa et al, 1997), a espinheira-santa e a goiabeira - vermelha (Teixeira et al, 1997) e a sucupira (Carvalho et al, 1998).

Moreno et al., 1991, em estudos feitos para verificar os efeitos genotóxicos, mutagênicos e recombinogênicos do alcalóide aporfínico boldina, presente na planta medicinal *Peumus boldus*, através do “SOS cromoteste” e “Teste de Ames”, para linhagens TA100, TA98 e TA102, observou que este alcalóide não apresentou atividade genotóxica com ou sem ativação metabólica e não foi capaz de induzir mutações de ponto em células haplóides de *S. cerevisiae*.

A boldina, também, teve sua genotoxicidade testada por Tavares e Takshashi (1991), através do teste de micronúcleos “in vivo” em ratos e em teste “in vitro” com linfócitos de sangue de pessoas saudáveis de ambos os sexos, através da análise citogenética. Os resultados mostraram um aumento de aberrações cromossômicas ou da frequência de trocas de cromátides-irmãs (SCE).

No presente trabalho realizado, para testar a genotoxicidade de *Hyptidendron canun* (Pohl ex Benth) R. Harley, que é uma planta popularmente usada, devido às suas propriedades medicinais, através do teste rápido "Ring-x-loss" com *D. melanogaster*, o Uretano funcionou como controle positivo, mostrando-se capaz de induzir perdas cromossômicas e outras alterações.

O controle negativo sucrose a 5% apresentou uma porcentagem média de perda cromossômica de 1.65% para o brood-1, 2.0% para o brood-2 e 1.30% para o brood-3. A frequência de mutações espontâneas varia de 2.0% a 4.3%, com uma média de 3.3%, sendo que o valor histórico do Grupo da Universidade de Leiden (Holanda) é de 25%, (Zijlstra e Vogel, 1988).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, H.H.R.; GIMMLER- LUZ, M.C.; REGULY, M.L. A *Drosophila melanogaster* como um Organismo para testar atividade antimutagênica. In: RESUMOS DO 1º SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE MUTAGÊNESE AMBIENTAL, 1991, Caxambu-MG. p16.
- BECKER, H.J. (Ed.) Mitotic Recombination. In: Ashburner M. e Novitski E. *The Genetics and Biology of Drosophila*, Lc. Academic press, 1976 p.1019-1087.
- BRANDÃO, M. Plantas Medicinais do Cerrado Mineiro. *Inf. Agraptec.* v.15, n.168, p.15-20, 1991.
- CARVALHO S.; GUERRA A.D; KRATZ FL; CARVALHO L.C, PAIVA C.P. Avaliação do Potencial Genotóxico da Planta *Synadenium sp* (cola) em *D. melanogaster*. In: RESUMOS DA 44ª REUNÃO ANUAL DA SBPC, 1992, p.806.
- CUNHA K.S; REGULY M.L; GIMMLER-LUZ M.S; GRAF U., ANDRADE H.H.R. Tanic Acid is not Mutagenic in Germ Cells but Weakly Genotoxic in Somatic Cells of *D. melanogaster*. *Mutagenesis*, v.10, n.4, p.291-95,1995.
- EITTEN, G. Vegetação do Cerrado. In: Pinto M.N., Cerrado; caracterização, ocupação e perspectivas. Brasília: UNB. 1994. p.45-60.
- FERRI, P.H & FERREIRA H.D. Fitoquímica das folhas de *Hyptis Benth*. In: Semana de Química, Goiânia: Departamento de Química Orgânica, 1992, p.1 – 32.
- FREI, H.E & WRÜGLER, F.E. Statistical Methods to Decide Whether Mutagenicity Test data from *Drosophila* Assay Indicate a Positive, negative or inconclusive Result. *Mutat. Res.* v.334, p.247 – 58, 1988.
- GRAF, U. The Actual Situation of SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) in *D. melanogaster*. *Ver. Int. Contam. Ambient.* v.10, suplement. v.1, p.5-7, 1994.
- GUERRA, A.D. Investigação da Genotoxicidade do Boldo (*Veronica condensata*) em *Drosophila*. 1994. 14p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-Go, 1994.
- MORENO, P.R.H.; VARGAS, V.M.F.; ANDRADE, H.H.R.; HENRIQUES A.T.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of the boldine aporphine alkaloid in Procariotic and Eukaryotic Organisms. *Mutation Res.* v.1, p.1-8, 1991.
- RIZZO, J.A.; FONSECA, A.S.S; VALVA, F.D.; COELHO, A.S.G.; SILVA, M.J. & VIANA, M.V.L. Ecogenética de *Hanconia speciosa Gomez*. I - Padrão de distribuição espacial de *H. speciosa var gardineri* e *var pubescens*. In: ANAIS XLVII CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, São Paulo, 1996. p.20.
- SIMÕES, C.M. et al. Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul, 1ª ed., Porto Alegre: ed. da Universidade/URGS, 1989. p.150-152.
- SOUZA, N.C. Avaliação da Atividade Mutagênica e/ou Recombinogênica do Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens mart*) em Células Somáticas de *D. melanogaster*. 1997. Dissertação de Mestrado – UFG – Goiânia, 1997.
- STASI, C.L.D. et al. Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo, 1996. p.109-126.
- TAVARES, D.C. & TAKAHASHI, C.S. Evaluation of the possible genotoxic activity of the Alcaloide Boldine "in vitro" systems. In: RESUMOS DO 1º SIMPÓSIO LATINO – AMERICANO DE MUTAGÊNESE AMBIENTAL, 1991, Caxambu – MG. p.91.
- TEIXEIRA, R.O. & VICENTINI, V.E.P. Estudo da mutagenicidade das plantas: Espinheira-santa e Goiabeira-vermelha. In: 43TH NATIONAL CONGRESS OF GENETIC. 1997, Goiânia. Program and abstracts. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 1997. p.115.
- VOGEL, E.W. Discussion Forum: Evaluation of Potential Mammalian Genotoxins Using *Drosophila*: The Need for a Change in Test Strategy. *Mutagenesis* v.2, n.3, p.161–71, 1987.
- VOGEL, E.W. & SZZAKMARY. Basic Principles and Evaluation of Results of Assays Measuring Genotoxic Damage in Somatic Cells of *Drosophila*. 5th ICEMS Cleveland, 1989.
- WÜRGLER, F.E & VOGEL, E.W. In Vivo Mutagenicity Testing Using Somatic Cells of *D. melanogaster*. In: de Serres. F. J. (Eds) Chemical Mutagens (10), Plenum. Press: New York, p.1- 59, 1986.
- ZIJSTRA, J.A. Pharmacological and Mechanistic Aspects of Chemically Induced Mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. Ed. Leiden, 1988. p.7-19.