

Efeito antimutagênico do látex de *Euphorbia tirucalli* no sistema metionina em *Aspergillus nidulans*

Judy Ruiz Rezende, Suzymeire Baroni Rodrigues, Izabel Aparecida Soares Jabor, João Alencar Pamphile e Carmem Lucia de Mello Sartori Cardoso da Rocha*

Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência.

RESUMO. Muitas plantas medicinais têm sido analisadas quanto a seus potenciais antitumoral e antimutagênico. Aveloz, uma planta do gênero *Euphorbia* (Euphorbiaceae), tem sido utilizada popularmente na América do Sul no tratamento de úlceras, cânceres, tumores, verrugas e outras doenças. No entanto, algumas pesquisas demonstraram efeitos contrários a estes descritos. Devido a estes resultados contraditórios, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimutagênico da *Euphorbia tirucalli* utilizando o sistema metionina em *Aspergillus nidulans*. Duas concentrações do látex - 0,1% e 0,2% (v/v) - foram usadas no tratamento por 24 horas de conídios dormentes obtidos de colônias de cinco dias. Os resultados indicaram que o látex da *Euphorbia* tem potencial antimutagênico, pois tanto a concentração de 0,1% quanto a de 0,2% (v/v) do látex resultaram em frequência de mutação significativamente menor que a frequência de mutação espontânea, obtida para o controle nestes experimentos.

Palavras-chave: sistema metionina, *Euphorbia*, antimutagênese.

ABSTRACT. Antimutagenic effect of the *Euphorbia's* latex in *Aspergillus nidulans* methionine system. Folk medicinal plants have been analyzed and assayed to confirm their possible antitumoral and anticarcinogenic properties. Aveloz is a plant of the genus *Euphorbia* (Euphorbiaceae) and it has been popularly used in South America for treating ulcer, cancer, tumor, wart and other diseases. However, some researches have shown opposite effects. Due to these contradictory results, the aim of this work was to test the antimutagenic potential of *Euphorbia tirucalli* latex in *Aspergillus nidulans* methionine system. Two concentrations of the latex were used in conidia treatment: 0.1% and 0.2% (v/v). The treatment was developed by collecting quiescent conidia from five days old colonies in latex solution, during 24 hours. The results have indicated that both concentrations show antimutagenic effect because the mutation frequency of the treated conidia was smaller than mutation frequency of the control.

Key words: methionine system, *Euphorbia*, antimutagenicity.

Introdução

Durante milênios os povos indígenas de todo o mundo vêm utilizando plantas com fins medicinais. Alguns destes conhecimentos se difundiram com o surgimento das civilizações modernas.

Atualmente, os cientistas vêm mostrando interesse em comprovar os potenciais curativos de plantas utilizadas e aprovadas pelo conhecimento popular.

A Carqueja, planta do gênero *Baccharis*, família Asteraceae utilizada popularmente no Brasil em casos de distúrbios gastrointestinais e em toda América Latina por inúmeras funções, despertou o interesse de Gamberini *et al.* (1991), que demonstraram que o tratamento em ratos com o extrato aquoso de *Baccharis triptera* pode aliviar os distúrbios gastrointestinais por ser capaz de reduzir a secreção de ácidos e a hiperatividade gastrointestinal. Abad *et al.* (1999) relataram que o extrato aquoso da

Baccharis genistelloides tem ação anti viral contra dois diferentes vírus: HSV-1 e VSV.

Outra planta popularmente conhecida é a Espinheira Santa, do gênero *Maytenus*, família Celastraceae, que é usada em casos de indigestão, gastrite crônica e úlceras. Souza-Formigoni *et al.* (1991) trataram ratos, com úlceras induzidas por indometacina, com a administração oral e intraperitoneal do extrato aquoso de *Maytenus aquifolium* e *Maytenus ilicifolia* e demonstraram os efeitos anti ulcerogênicos destas duas espécies de plantas.

A Quebra Pedra, planta do gênero *Phyllanthus* da família Euphorbiaceae é popularmente usada para eliminar pedras nos rins e outros problemas relacionados ao sistema urinário. No entanto, algumas pesquisas realizadas com *Phyllanthus* estão direcionadas à busca da cura do câncer. Ferrer *et al.*

(2002) demonstraram que o tratamento da *Salmonella* com extrato aquoso de *Phyllanthus orbicularis* protege a célula bacteriana da oxidação e da mutação causada pela ação das aminas aromáticas e do peróxido de hidrogênio pela ação de algum mecanismo antimutagênico intracelular. Giridharan *et al.* (2002) identificaram e purificaram uma molécula extraída de *Phyllanthus urinaria* testando-a em quatro tipos de células cancerígenas específicas. Os resultados indicaram que a 7'-hydroxy-3',4',5,9,9'-pentamethoxy-3,4-methylene dioxy lignan inibiu a atividade da telomerase como também do *bcl 2* e ativou as caspases 3 e 8 resultando na indução da apoptose.

Uma planta chamada aveloz pertencente ao gênero *Euphorbia* da família Euphorbiaceae é comumente utilizada como fitoterápico no tratamento de úlceras, cânceres, tumores, verrugas e outras doenças (Betancur-Galvis *et al.*, 2002). No entanto, seu látex muito cáustico mostrou efeito imunossupressor, o contrário do que se espera de uma planta antitumoral (Sugiura *et al.*, 1994). Além disso, como eficiente irritante, a *Euphorbia* pode ser considerada candidata a promotor de câncer (Furstemberger e Hecker, 1986). Uma alternativa que justificaria seu potencial anticancerígeno seria a antimutagenicidade.

Substâncias com potencial antimutagênico aumentam a eficiência dos mecanismos de reparo das mutações causadas por agentes mutagênicos ou provocam a inativação da substância mutagênica. Como consequência, estas substâncias atuam como agentes protetores, diminuindo a frequência de danos ao DNA. Em ambos os casos, no entanto, agem antes da multiplicação desordenada das células, ou seja, da formação do tumor.

O propósito deste trabalho foi testar o possível potencial antimutagênico da *Euphorbia tirucalli*, e para isso foi empregado o sistema metionina em *Aspergillus nidulans*.

Material e métodos

Linhagem

A linhagem de *Aspergillus nidulans* utilizada para o sistema metionina foi a *biAmethG1*, originada de Glasgow (Escócia). Essa linhagem é deficiente para biotina (cromossomo I) e metionina (cromossomo IV). Ela possui duas vantagens: não tem translocações e a mutação *biA1* confere-lhe maior permeabilidade da parede celular.

Os meios de cultura foram preparados segundo Pontercorvo *et al.* (1959), Clutterbuck (1974) e Rocha (1997). O meio seletivo (SM) para análise dos revertentes foi meio mínimo (MM) suplementado com biotina (0,02 µg/mL). O meio para teste de sobrevivência (SMM) foi preparado com a mesma

composição do SM adicionando metionina (50,0 µg/mL).

Foram preparadas duas concentrações de látex em água destilada esterilizada: 0,1% (v/v) e 0,2% (v/v). Ambas as soluções foram filtradas em filtro Millipore.

Conídios de colônias crescidas por 5 dias em meio completo (MC) a 37°C foram coletados em solução 0,01% Tween 80 em 0,09% NaCl, agitados e filtrados em lâ de vidro. Após a estimativa da quantidade de esporos em câmara hematimétrica, a suspensão foi dividida em dois tubos: um tubo para o tratamento com a solução de látex e outro para o controle, com adição de água.

Após 24 horas de tratamento, todos os tubos foram centrifugados e lavados 3 vezes com solução salina.

Para estimativa de sobrevivência foram feitas diluições adequadas e inoculados 0,1mL da suspensão diluída em 10 placas de SMM, para cada tubo (tratamento e controle) e incubados por 3 dias a 37°C. Para análise de revertentes, foi inoculado 0,1mL da suspensão sem diluição em 10 placas de SM para cada tubo (tratamento e controle) e incubados por 5 dias a 37°C.

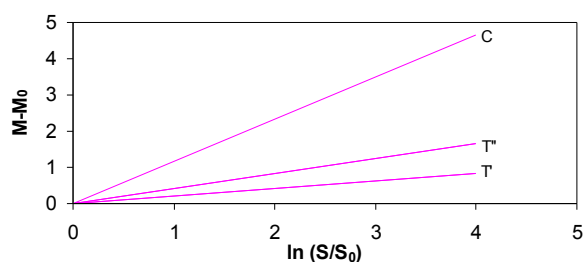
Todo este procedimento foi repetido três vezes independentemente.

Resultados

Observando as Tabelas 1 e 2 para os tratamentos 0,1% e 0,2% (v/v) do látex, respectivamente, nota-se que a frequência de mutação, representada pela razão entre o número de mutantes por mililitro e o número de conídios viáveis por mililitro é menor no tratamento quando comparada com a frequência de mutação do controle para a linhagem *biAmethG1* de *A. nidulans*. A análise estatística, apresentada nas Figuras 1 e 2 determinou que esta diminuição na frequência de mutação é significativa.

Tabela 1. Resultados obtidos no tratamento de conídios dormentes da linhagem *biAmethG1*, com 0,1% (v/v) do látex de *Euphorbia tirucalli*.

Experimento	Grupos	Número de conídios viáveis x 10 ⁵ /mL	Número de mutantes /mL	Número de mutantes / 10 ⁵ conídios viáveis
1	Controle	54,7	12	0,219
	Tratamento	291,7	15	0,051
2	Controle	136,9	58	0,423
	Tratamento	199,1	76	0,381
3	Controle	61,9	74	1,195
	Tratamento	96,5	48	0,497
Média	Controle	84,5		0,820
	Tratamento	205,7		0,413

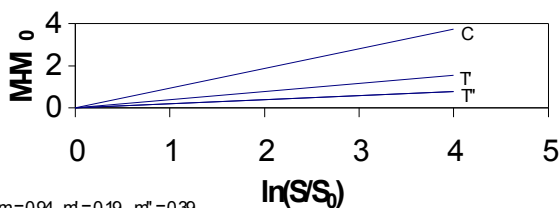


$$m = 1,16 \quad m' = 0,21 \quad m'' = 0,41$$

Figura 1. Análise estatística dos resultados da Tabela 1, segundo Munson e Goodhead (1977), modificado por Rodrigues e Rocha (2000) e por Zonetti e Rocha (2000), mostrando que a inclinação da reta C (m), que representa a mutação espontânea, é visivelmente maior que as inclinações das retas T' e T'' (m' e m''), que representam a mutação em presença do látex a 0,1% (v/v) de *E. tirucalli*. Esta observação indica que as diferenças entre os valores encontrados de frequência de mutação para o tratamento e para o controle são significativas.

Tabela 2. Resultados obtidos no tratamento de conídios dormentes da linhagem *biAlmethG1*, com 0,2% (v/v) do látex de *Euphorbia tirucalli*.

Experimento	Grupos	Número de conídios viáveis x 10 ⁵ /mL	Número de mutantes / mL	Número de mutantes / 10 ⁵ conídios viáveis
1	Controle	61,9	74	1,195
	Tratamento	208,8	67	0,320
2	Controle	79,5	131	1,649
	Tratamento	273,6	153	0,560
3	Controle	172,9	61	0,352
	Tratamento	200,2	55	0,274
Média	Controle	104,8		1,065
	Tratamento	227,5		0,385



$$m = 0,94 \quad m' = 0,19 \quad m'' = 0,39$$

Figura 2. Análise estatística dos resultados da Tabela 2, segundo Munson e Goodhead (1977), modificado por Rodrigues e Rocha (2000) e por Zonetti e Rocha (2000), mostrando que a inclinação da reta C (m), que representa a mutação espontânea, é visivelmente maior que as inclinações das retas T' e T'' (m' e m''), que representam a mutação em presença do látex a 0,2% (v/v), o que demonstra que as diferenças encontradas entre as frequências de mutação para o tratamento e para o controle são significativas.

Discussão

Para a determinação da antimutagenicidade do látex da *Euphorbia* foi utilizado o sistema metionina no fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. Este teste tem sido utilizado para avaliação do potencial mutagênico de inúmeros agentes físicos e químicos (Lilly, 1965; Scott *et al.*, 1982; Rocha e Azevedo, 1986; Zonetti e Rocha, 2000).

Em 2000, Rodrigues e Rocha propuseram uma adaptação deste teste para determinar potencial antimutagênico, adaptando o teste estatístico de Munson e Goodhead (1977). Segundo este trabalho, a substância em análise é considerada antimutagênica

se a inclinação da reta calculada com os valores da mutação espontânea for maior que a inclinação da reta calculada com os valores da mutação induzida.

Analisando os presentes resultados, observou-se que o látex de *Euphorbia tirucalli* aumentou a sobrevivência dos conídios, o que foi o primeiro indício de proteção (Tabelas 1 e 2). A frequência de mutantes foi significativamente menor no tratamento para ambas as concentrações do látex (Tabelas 1 e 2 e Figuras 1 e 2). Estas análises indicam o potencial antimutagênico do látex de *Euphorbia tirucalli* preparado nas concentrações 0,1% e 0,2% (v/v) pelo tratamento de conídios dormentes, no sistema metionina em *Aspergillus nidulans*.

Como os resultados do presente trabalho foram obtidos analisando a frequência de mutação espontânea, sem utilização de nenhum agente mutagênico, é provável que sua proteção ocorra preventivamente, ativando mecanismos celulares de prevenção de mutações, entre os quais, os sistemas de reparo.

Este trabalho vem corroborar a relevância do estudo das propriedades das plantas medicinais. A antimutagenicidade encontrada no sistema metionina em *Aspergillus nidulans* é uma indicação para que sejam realizados novos testes, empregando diferentes organismos. Se for confirmado o potencial antimutagênico do látex da *Euphorbia*, poderemos justificar cientificamente sua utilização na medicina popular, com o cuidado de respeitar as concentrações para evitar o efeito cáustico do látex em concentrações maiores.

Além disso, os resultados do presente trabalho também abrem caminho para uma série de novas pesquisas, para extração e purificação da molécula responsável pela propriedade antimutagênica da *Euphorbia tirucalli*, como fizeram Giridharan *et al.* (2002) em *Phyllanthus urinaria*, uma outra planta da família Euphorbiaceae.

Referências

- ABAD, M.J. *et al.* Antiviral activity of some South American medicinal plants. *Phytother. Res.*, Chichester, v. 13, n. 2, p. 142-146, 1999.
- BETANCUR-GALVIS, L.A. *et al.* Cytotoxic and antiviral activities of colombian medicinal plant extracts of the *Euphorbia* genus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 97, n. 4, p. 541-546, 2002.
- CLUTTERBUCK, A.J. *Aspergillus nidulans*. In: KING, R.C. (ed.). *Handbook of Genetics*. New York: Plenum Publishing, 1974, p.447-510.
- FERRER, M. *et al.* Antimutagenic mechanisms of *Phyllanthus orbicularis* when hydrogen peroxide is tested using *Salmonella* assay. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v. 517, p. 251-254, 2002.
- FURSTENBERGER, G.; HECKER, E. On the active principles of the spurge family (Euphorbiaceae). XII. Highly unsaturated irritant diterpene esters from *Euphorbia*

- tirucalli* originating from Madagascar. *J. Nat. Prod.* Washington, DC, v. 49, n. 3, p. 386-397, 1986.
- GAMBERINI, M.T. *et al.* Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera*, Mart. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 86 Suppl 2, p.137-139, 1991.
- GIRIDHARAN, P. *et al.* Novel substituted methylenedioxy lignan suppresses proliferation of cancer cells by inhibiting telomerase and activation of c-myc and caspases leading to apoptosis. *Br. J. Cancer*, London, v. 87, n. 1, p. 98-105, 2002.
- LILLY, L.J. An investigation of the suitability of the suppressors of *meth1* in *Aspergillus nidulans* for the study of induced and spontaneous mutation. *Mut. Res.*, Amsterdam, v.2, p. 192-95, 1965.
- MUNSON, R. J.; GOODHEAD, D.T. The relation between induced mutation frequency and cell survival – a theoretical approach and examination of experimental data for eukariotes. *Mut. Res.*, Amsterdam, v. 42, p. 145-160, 1977.
- PONTECORVO, G. *et al.* The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.*, San Diego, v. 5, p. 141-238, 1959.
- ROCHA, C.L.M.S.C. *Caracterização citológica, genética e molecular de um mutante para conidiogênese em Aspergillus nidulans*. 1997. (Tese de doutorado) - EASALQ/Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.
- ROCHA, C.L.M.S.C.; AZEVEDO, J.L. Use of the *methG1* reversion of *Aspergillus nidulans* for the detection of mutagenicity of the pyrrolizidine alkaloid integerrimine. *Rev. Bras. Genet.*, Ribeirão Preto, v. 9, p. 393-405. 1986.
- RODRIGUES, S. B. *Caracterização do efeito antimutagênico do cogumelo Lentinula edodes*. 2002. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2002.
- SCOTT, B.R. *et al.* *Aspergillus nidulans*: Systems and results of tests for induction of mitotic segregation and mutation. II. Haploid assay systems and overall response of all systems. *Mut. Res.*, Amsterdam, v. 98, p. 49-94, 1982.
- SOUZA-FORMIGONI, M.L. *et al.* Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. *J. Ethnopharmacol*, Clare, v. 34, n. 1, p. 21-27, 1991.
- SUGIURA, M. *et al.* Cryptic dysfunction of cellular immunity in asymptomatic human immunodeficiency virus (HIV) carriers and its actualization by an environmental immunosuppressive factor. *In Vivo*, Athens, v. 8, n. 6, p. 1019-1022, 1994.
- ZONETTI, P.C., ROCHA, C.L.S. Mutagenicity of Benlate in *methG1* system in *Aspergillus (=Emericella) nidulans*. *Cytologia*, Tokyo, v. 65, p. 403-408, 2000.

Received on July 27, 2004.

Accepted on December 14, 2004.