

## ESTUDO CITOGENOTÓXICO DO BIOMARCADOR E-ISODILAPIOL 2KL15 EM *Aedes (Stegomyia) aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE), MANAUS, AMAZONAS

Luiz Henrique Fonseca dos SANTOS<sup>1</sup>

Míriam Silva RAFAEL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsista IC INPA-PIBIC/CNPq; <sup>2</sup>Orientadora, LCGEM-CSAS/INPA

### INTRODUÇÃO

A dengue é a mais importante virose, que acomete os humanos (Kuhn *et al.* 2002; Ross 2010). No Brasil, de acordo o Ministério da Saúde (2015), entre os meses de dezembro de 2014 a janeiro de 2015 foram registrados mais de 591.080 casos da doença. É uma virose causada por um vírus da família Flaviviridae, com os sorotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4). A gravidade dessa enfermidade está nas limitações para o seu tratamento, por ausência de vacina eficiente contra o vírus Dengue e, principalmente, pela ineficácia de controle do *Aedes aegypti*, o seu principal vetor, que é realizado com inseticidas sintéticos (Ross 2010). Diversas espécies de mosquitos de importância epidemiológica apresentam registros de resistência a inseticidas sintéticos (Sharma e Faruqi 1998). Nos últimos anos, dentre as alternativas de controle de mosquitos vetores, várias pesquisas vêm sendo realizadas com compostos naturais a base de plantas, como óleos essenciais e/ou seus derivados (Pohlit *et al.* 2004, Rafael *et al.* 2008). Em mosquitos vetores de doenças, estudos com derivados semissintéticos de óleos essenciais de plantas, com atividade biológica são de fundamental importância, como uma nova possibilidade de controle de vetores de doenças de importância médica. O óleo essencial do dilapiol, um composto extraído da planta pimenta longa (*Piper aduncum*), teve o seu potencial testado no controle de *A. aegypti* (Rafael *et al.* 2008). O semissintético E-isodilapiol 2KL15 foi extraído do dilapiol, como forma de melhorar as propriedades químicas e físicas dessa substância, para otimizar a sua eficiência no controle de insetos (Belzile *et al.* 2000; Pinto 2008). Domingos *et al.* (2013) realizaram bioensaios em *A. aegypti* de Manaus, Amazonas, com os semissintéticos éter etil dilapiol (1KL39-B) e éter n-butil dilapiol (1KL43-C), em concentrações diferentes, para analisar o seu efeito tóxico, genotóxico e de resistência a esses compostos. Os resultados em duas gerações (F1 e F2) de *A. aegypti* mostraram elevados índices de mortalidade e, também, efeitos genotóxicos na forma de anomalias em núcleos interfásicos de neuroblastos e ovócitos, em relação aos indivíduos controle (larvas e adultos). A presente proposta é uma continuação do trabalho de pesquisa com os biomarcadores genotóxicos em mosquitos deste laboratório. Em *A. aegypti*, faz-se necessário o estudo sobre o potencial efeito do semissintético E-Isodilapiol tendo em vista que não existem trabalhos publicados que comprovem seus efeitos genotóxicos, e o nosso objetivo é determinar o efeito citogenotóxico deste composto E-isodilapiol 2KL15 em *A. aegypti*, por duas gerações consecutivas (F1 e F2).

### MATERIAL E MÉTODOS

**Coleta de Materiais** - Exemplares de *A. aegypti* foram coletados no Bairro Centro, Manaus, AM (S 03°08'33.5" W 060°01'13.5"). *Aedes aegypti* foi identificado, pela chave taxonômica de Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994). Foram obtidas duas gerações (F1 e F2), que foram submetidas ao Bioensaio com o bioinseticida E-isodilapiol 2KL15, no Insetário da Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde (CSAS)/INPA, Campus I.

**Bioensaio para obtenção da Geração 1 (F1)** - Na formação de F1 foram utilizadas três concentrações do composto 2KL15 em *A. aegypti*, previamente padronizadas para bioensaios (Lima, comunicação pessoal). Um total de 160 larvas de 3º estágio de *A. aegypti* com cinco réplicas contendo dez larvas cada foram expostas a cada concentração de 2KL15 (20 µg/mL, 40 µg/mL e 60 µg/mL) em DMSO (0,05%), além das amostras controle negativo em água potável e DMSO (0,05%), por 4 horas. Após o bioensaio, 10 larvas de 3º estágio de cada concentração e 10 larvas de cada amostra controle foram reservadas para as preparações citológicas (cromossomos mitóticos). As demais

larvas sobreviventes foram transferidas para vasilhas esmaltadas com água potável e ração comercial, para peixe ornamental, para o seu desenvolvimento até fase a fase adulta. Um total de 10 fêmeas de cada concentração (bioensaio) foi utilizado nas confecções de lâminas, para obtenção de cromossomos meióticos (ovários) e 10 fêmeas de amostras controle.

**Bioensaio para obtenção da Geração 2 (F2)** - Os ovos obtidos da geração F1, previamente expostos a cada concentração de 2KL15 (20 µg/mL, 40 µg/mL e 60 µg/mL) em DMSO (0,05%), além das amostras controle negativo em água potável e DMSO (0,05%), por 4 horas, foram colocados para eclodir, a fim de formar a geração F2. As larvas ao atingirem o 3º estágio foram expostas a 2KL15 (20 µg/mL, 40 µg/mL e 60 µg/mL) em DMSO (0,05%), e alimentadas com ração para peixe. Ao atingirem a fase adulta, casais foram transferidos para gaiolas, para cruzamento e oviposição. Os adultos foram alimentados com solução açucarada (machos) e as fêmeas com sangue de *hamster* (*Mesocricetus aureatus*). Copos plásticos foram preenchidos com água em 1/3 de seu volume e revestidos internamente com papel filtro, para deposição dos ovos pelas fêmeas. Após o bioensaio, 10 larvas de 3º estágio de cada concentração e 10 larvas de cada amostra controle foram reservadas para as preparações citológicas.

**Preparações Citológicas** - Larvas de 3º estágio (n=10) e fêmeas adultas (n=10) de cada bioensaio (F1 e F2) foram utilizadas nas preparações citológicas. Foram extraídos cérebros de larvas (cromossomos mitóticos) e ovários de fêmeas adultas (cromossomos meióticos), pelo método de espalhamento (Imai *et al.* 1988), com modificações (Rafael *et al.*, 1998).

**Avaliação da genotoxicidade** - A avaliação da genotoxicidade foi a partir das frequências de anomalias nucleares (interfásicos e metafásicos) em núcleos de neuroblastos e de ovócitos. Os núcleos mitóticos e meióticos, assim como as anomalias encontradas, foram registrados com auxílio de um contador mecânico hematológico de células (*Blood Cell Counter, DigiTimer*), sob microscópio de luz *Axioplan Zeiss*, por meio de objetiva de imersão 100x e optovar 1x, 1,25x e 1,6x. As microfotografias realizadas pela câmera *AxioCam MRcA*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Anormalidades nucleares (interfásicos e metafásicos)** - Os gânglios cerebrais de larvas de 3º estágio e ovócitos de fêmeas adultas expostos ao E-isodilapiol a 20µg/mL, 40µg/mL, 60µg/mL e seus controles negativo foram analisados quanto à frequência de anormalidades nucleares (Figura 1). Registraram-se a presença de células com formação de micronúcleo, brotamento celular, núcleos segmentados, células polinucleadas, núcleos interfásicos (normal), e pontes telofásicas.

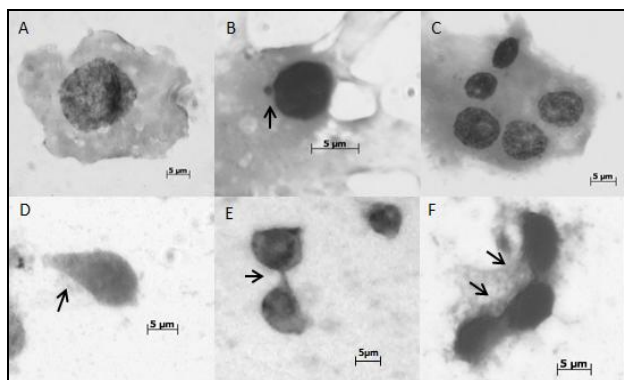


Figura 1. Preparações citológicas de neuroblasto (B, D e E) e de ovócito (A, C e F) corados com Giemsa (pH 5,8) e orceína-lacto-acética (2%). A-núcleo interfásico normal; B-micronúcleo; C-célula polinucleada; D-brotamento (seta); E-ponte telofásica (seta); F-núcleos segmentados (seta). Aumento: 1000 e 1600x.

Observaram-se em núcleos metafásicos de neuroblastos e ovócitos de *A. aegypti* expostos ao E-isodilapiol a 20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL (Figura 2), a presença de núcleos interfásicos (normais), pontes anafásicas e quebras cromossômicas.

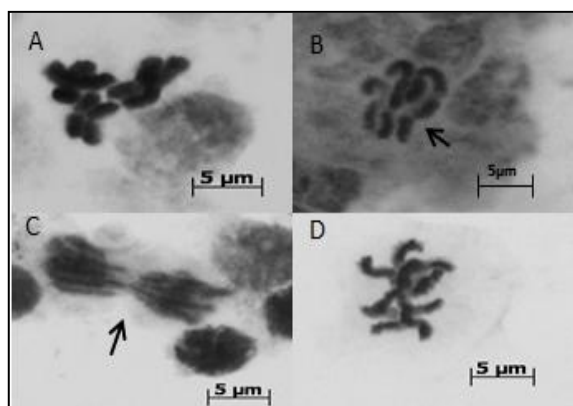


Figura 2. Núcleos em divisão celular de neuroblastos (A e C) e de ovócitos (B e D) de *Aedes aegypti* corados com *Giemsa* (pH 5,8) e orceína-lacto-acética (2%). A e D – núcleo metafásicos (normal); B – quebra cromossômica (seta); C – ponte anafásicas (seta). Aumento: 1000 e 1600x.

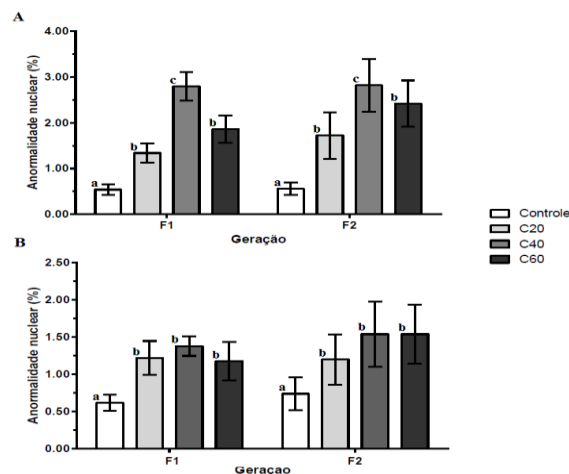


Figura 3. Frequência de anomalias nucleares em gânglios cerebrais (A) e ovócitos (B) de *Aedes aegypti* (Gerações F1 e F2) submetidos a tratamento com isodilapiol em duas gerações F1 e F2. As letras diferentes (a, b e c) indicam variação significativa entre as frequências (%), segundo teste *Tukey* ( $p < 0,05$ ). Enquanto que as letras iguais indicam a variação não significativa, *Tukey* ( $p > 0,05$ ).

**Avaliação da genotoxicidade** - A análise estatística da frequência dos parâmetros genotóxicos (%) analisados nos núcleos interfásicos (brotamentos, micronúcleos e más-formações) e nas demais fases da divisão celular cromossômica e micronúcleos de *A. aegypti* foi avaliada pelos métodos estatísticos da ANOVA e pelo teste de *Tukey* (*One-way ANOVA, GraphPad Prism version 6.00*), conforme a Figura 2, para verificar se ocorreu variação entre as três concentrações do E-Isodilapiol (20 µg/mL, 40 µg/mL e 60 µg/mL) em relação às amostras controle.

A frequência média de anomalias variou significativamente quando comparada ao controle negativo. A Figura 3 (A- neuroblastos e 1B- ovócitos) mostra a frequência de anormalidades nucleares (%) para células ( $n=2000$ ). As letras de a – c mostram semelhança (letras iguais), sem variação significativa segundo ANOVA e teste de *Tukey* ( $p > 0,05$ ), ou diferença (letras diferentes), com variação significativa dos tratamentos 20µg/mL, 40µg/mL e 60µg/mL do 2KL-15 + DMSO em relação ao controle negativo (água + DMSO).

Rafael *et al.* (2008) evidenciaram em larvas e pupas de *A. aegypti* a ação genotóxica do dilapiol, um composto básico da síntese do E-Isodilapiol, em núcleos de neuroblastos e ovócitos. Os autores também registraram um acúmulo dos efeitos genotóxicos em núcleos interfásicos (micronúcleo e brotamento) e núcleos em metafase (quebras cromossômicas e outras más formações) nas gerações F1, F2, F3 e F4 de *A. aegypti*, por tratamentos com o dilapiol a 200 e 400 µg/mL por 72 horas. Essas características, também, foram observadas em *A. aegypti* tratado com o E-isodilapiol, utilizados neste trabalho. Porém, esses resultados foram mais expressivos em relação ao dilapiol a 400 e 200 µg/mL.

A ação genotóxica dos derivados do dilapiol, 1KL39-B (50, 70 e 80 µg/mL) e 1KL43-C (20, 25 e 30 µg/mL), também foi testada em larvas e fêmeas adultas do *A. aegypti*, Manaus, AM, por quatro gerações consecutivas (Domingos *et al.* 2014). Esses autores registraram a presença de anormalidades nucleares interfásicas e metafásicas em *A. aegypti* e relacionaram o aumento na frequência de anomalias ao aumento das concentrações dos produtos testados em larvas, por 4 horas. Além disso, verificaram que os danos gerados ao genoma do mosquito se acumulavam ao longo de várias gerações de exposição ao mesmo tratamento.

No presente estudo, o aumento das anomalias genotóxicas em *A. aegypti* foi observado entre os tratamentos e não entre as gerações. Considerando que todas as gerações receberam tratamentos específicos do E-Isodilapiol (20 µg/mL, 40 µg/mL e 60 µg/mL), durante o mesmo tempo de exposição (4 horas), essas anomalias podem estar associadas ao alto nível de toxicidade das concentrações testadas nas larvas, ocasionando más-formações e morte celular, especialmente nas células de neuroblastos de larvas tratadas com 40 µg/mL, pois apresentaram maior nível de más-formações nucleares.

## CONCLUSÃO

Os efeitos citogenotóxicos (micronúcleos, brotamentos, células mono e polinucleadas e outras más-formações) foram observados em *A. aegypti* tratado com o composto E-Isodilapiol, evidenciaram que este mosquito é susceptível a esses semissintéticos.

Estudos mais aprofundados acerca dos mecanismos específicos de ação desse composto diretamente no campo fazem-se necessários considerando a importância de combate do *A. aegypti*, principal transmissor da dengue.

## REFERÊNCIAS

- Belzile, A.S.; Majerus, S.L.; Podeszinski, C.; Guillet, G.; Durst, T.; Arnason, J.T. 2000. Dilapiol Derivatives as Synergists: Structure-Activity Relationship Analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 66: 33-40.
- Consoli, R.A.G.B. Lorenço-de-Oliveira, R.L.D. 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil, 225 pp.
- Domingos, P.R.C; Pinto, A.C. Santos, J.M.M; Rafael, M.S. 2014. Insecticidal and genotoxic potential of two semi-synthetic derivatives of dillapiole for the control of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mutation Research*, 772: 42-54.
- Imai, H.T.; Taylor, R.W.; Crosland, M.W.J.; Crozier, R.H. 1988. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn. J. Genet.*, 63:159-185.
- Kuhn, R.J.; Zhang, W.; Rossmann, M.G.; Pletnev, S.V.; Corver, J.; Lenches, E.; Jones, C.T.; Mukhopadhyay, S.; Chipman, P.R.; Strauss, E.G.; Baker, T.S.; Strauss, J.H. 2002. Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. *Cell*, 108: 717-725.
- Ministério da Saúde. 2015. Boletim Epidemiológico, 7: 1 (Portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/22/BE-dengue-SE-52-20-01-15.pdf). Acesso em 19/03/2015.
- Ministério da Saúde. 2014. Guia de vigilância epidemiológica/Fundação Nacional de Saúde, Brasil.
- Pinto, A.C.S. 2008. *Desenvolvimento de substâncias semi-sintéticas e bioativas a partir de 4-nerolidilcatechol e dilapiol*. Tese de Doutorado. Biotecnologia, área de Saúde, Universidade Federal do Amazonas, 296p.
- Pohlit, A.M.; Quignard, E.L.J.; Nunomura, S.M.; Tadei, W.P.; Hidalgo, A.De F.; Pinto, A.C.Da S.; Dos Santos, E.V.M.; De Moraes, S.K.R.; Saraiva, R.De C.G.; Ming, L.C.; Alecrim, A.M.; Ferraz, A.De B.; Pedroso, A.C. Da S.; Diniz, E.V.; Finney, E.K.; Gomes, E.De O.; Dias, H.B.; De Souza, K.Dos S.; De Oliveira, L.C.P.; Don, L.De C.; Queiroz, M.M.A.; Henrique, M.C.; Dos Santos, M.; Lacerda Júnior, O. da S.; Pinto, P.De S.; Silva, S.G.; Graça, Y.R. 2004. Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. *Acta Amazonica*, 34(1): 97 – 105.
- Rafael, M.S.; Tadei, W.P. 1998. Metaphase karyotypes of *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root and *A. (N) nuneztovari* Galbadón (Diptera: Culicidae). *Genetics and Biology*, 21(4): 351- 354.
- Rafael, M.S.; Hereira-Rojas, W.J.; Roper, J.J.; Nunomura, S.M.; Tadei, W.P. 2008. Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. *Genetics and Molecular Research*, 7(3): 772-781.
- Ross, T.M. 2010. Dengue Virus. *Clin Lab Med.*, 30: 149-160.
- Sharma, N.; Faruqi, S. 1998. Larvicidal activity of *Gliricidia sepium* against mosquito larvae of *Anopheles stephansi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Pharm. Biol.*, 36(1): 3-7.