

## ASPECTOS CITOGENOTÓXICOS DE DERIVADO DO DILAPIOL EM *Aedes (stegomyia) aegypti*, MANAUS, AMAZONAS

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

Míriam Silva RAFAEL<sup>2</sup>

Letícia Cegatti BRIDI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista Iniciação Científica INPA-PIBIC/CNPq;  
<sup>2</sup>Orientadora, LCGEM-CSAS/INPA; <sup>3</sup>Colaboradora.

### INTRODUÇÃO

*Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é um importante vetor de vírus causadores das enfermidades conhecidas como dengue, zika, chikungunya e febre amarela (Guarda *et al.* 2016). Em 2015, foram registrados 1.587.080 casos prováveis de dengue no país (Ministério da Saúde 2016). A dengue é uma doença causada por vírus da família Flaviviridae, gênero *flavivirus*, que apresenta quatro sorotipos virais: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4, transmitidos pelo *A. aegypti*. A gravidade dessa enfermidade está nas limitações para o seu tratamento, por ausência de vacinas contra esses vírus e, principalmente, pela ineficácia de controle do *A. aegypti*, 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 (Pohlitz *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 é 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* foi extraído do dilapiol, como forma de melhorar as propriedades químicas e físicas dessa substância, na sua eficiência para o controle de insetos (Belzile *et al.* 2000; Pinto 2008). Domingos *et al.* (2013) realizaram bioensaios em *A. aegypti* de Manaus, Amazonas, com os semissintéticos derivados do dilapiol, 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 quatro gerações (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> e F<sub>4</sub>) 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 com o *E-isodilapiol* é uma complementação do estudo citogenotóxico realizado em duas gerações (F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>) de *A. aegypti* previamente exposto a esse semissintético em diferentes concentrações. O presente estudo por mais duas gerações (F<sub>3</sub> e F<sub>4</sub>) de *A. aegypti* poderá fornecer dados complementares importantes acerca do efeito genotóxico desse composto, neste importante vetor dos vírus dengue, zika, chikungunya e febre amarela.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os mosquitos procedentes de capturas realizadas no Bairro Centro, Manaus, AM, utilizados nos bioensaios deste projeto foram obtidos a partir de colônias de ovos da geração F<sub>2</sub> de *A. aegypti*, mantidas no insetário

da Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde (CSAS). Após a eclosão dos ovos de F<sub>2</sub>, as larvas de 3<sup>o</sup> estágio (n= 40) de cada geração (F<sub>3</sub> e F<sub>4</sub>) foram expostas ao semissintético E-isodilapiol (20, 40 e 60 µg/ml) divididas em cinco réplicas, durante quatro horas. Após os ensaios genotóxicos foram analisados os efeitos deletérios a nível cromossômico de gânglios cerebrais (cromossomos mitóticos), pelo método de espalhamento (Imai *et al.* 1988), com modificações (Rafael *et al.* 1998). As demais larvas foram transferidas para água potável, até a emergência dos adultos. As fêmeas (n=10) de cada concentração foram utilizadas na confecção de lâminas de ovócitos (cromossomos meióticos). A avaliação da genotoxicidade foi realizada a partir das frequências de anomalias nucleares (interfásicas e mitóticas) encontradas em núcleos de neuroblastos e meióticas (ovócitos). A observação dos núcleos e a análise foram realizadas em microscópio de luz, *Axioplan*, marca *Zeiss*, por meio de objetiva de imersão de 100X. As microfotografias foram capturadas pela câmera *AxioCam MRC*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A genotoxicidade verificada para o composto E-isodilapiol seguiu alguns parâmetros estabelecidos (micronúcleos, brotamentos, células polinucleadas, más-formações, quebras cromossômicas, pontes anafásicas) em neuroblastos e ovócitos (Figura 1).

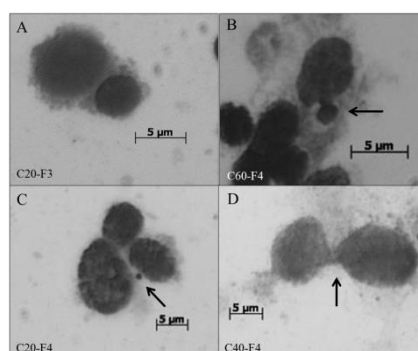


Figura 1. Preparações citológicas de neuroblastos (A e B) e de ovócitos (C e D) de *Aedes aegypti* (Gerações F<sub>3</sub> e F<sub>4</sub>) corados com Giemsa (pH 5,8) e orceína-lacto-acética (2%). A – célula binucleada (20 µg/mL); B – brotamento (seta) (60 µg/mL); C – micronúcleo (seta) (20 µg/mL); D – núcleos segmentados (seta) (40 µg/mL). Aumento: 1000 e 1600x.

A comparação das anormalidades nucleares de *A. aegypti* foi comparada nas gerações F<sub>3</sub> e F<sub>4</sub>, incluindo dados prévios de F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>. Nas quatro gerações de *A. aegypti*, ocorreu aumento estatisticamente significativo da frequência das anormalidades nucleares de neuroblastos de indivíduos expostos ao E-isodilapiol (20 µg/mL, 40 µg/mL e 60 µg/mL), em comparação ao grupo controle (p<0,05), segundo o teste de *Tukey* (Gráfico 1A). Porém, quando foram comparados apenas os indivíduos entre cada concentração das quatro gerações, não houve diferença significativa nas frequências das alterações nucleares. Por outro lado, de F<sub>1</sub> até F<sub>2</sub> foi observado um aumento significativo na frequência de núcleos interfásicos de ovócitos comparados aos indivíduos controle. Nas gerações F<sub>3</sub> e F<sub>4</sub>, no entanto, a comparação entre as concentrações do composto não apresentou variação significativa na frequência anormalidades em núcleos interfásicos (Gráfico 1B).

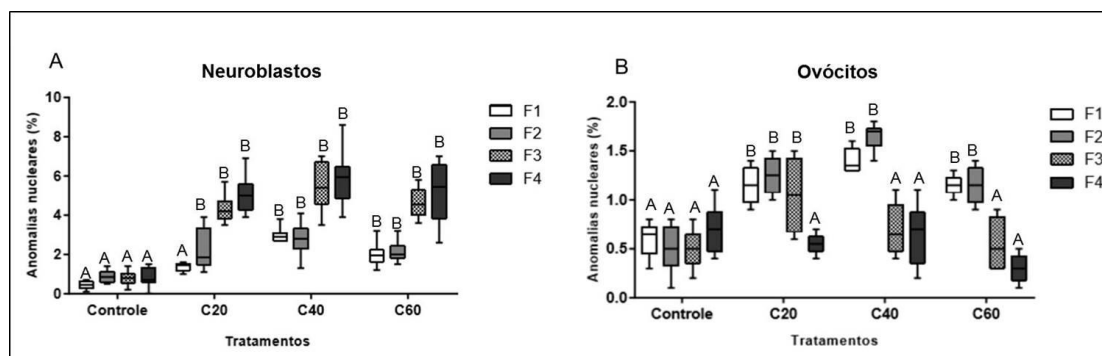


Gráfico 1. Frequência de anomalias nucleares em gânglios cerebrais (A) e ovócitos (B) de *Aedes aegypti* submetidos a tratamento com E-isodilapiol em quatro gerações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> e F<sub>4</sub>. As letras diferentes (A e B) indicam variação significativa entre as frequências (%), segundo teste Tukey (p<0,05). Enquanto que as letras que se repetem indicam variação não significativa, Tukey (p>0,05).

Os resultados deste trabalho estão de acordo com os de Rafael *et al.* (2008) e Domingos, *et al* (2014), que verificaram com o dilapiol e os compostos 1KL39-B e 1KL43-C um aumento significativo de anormalidades em neuroblastos e ovócitos em quatro gerações. Porém, estes autores não registraram nesse mosquito a ocorrência significativa de células em apoptose.

No presente estudo, células de neuroblastos e ovócitos mostraram núcleos metafásicos (normais), quebras cromossômicas em metafase, anáfase (normal) e micronúcleos em metafase (Figura 2).

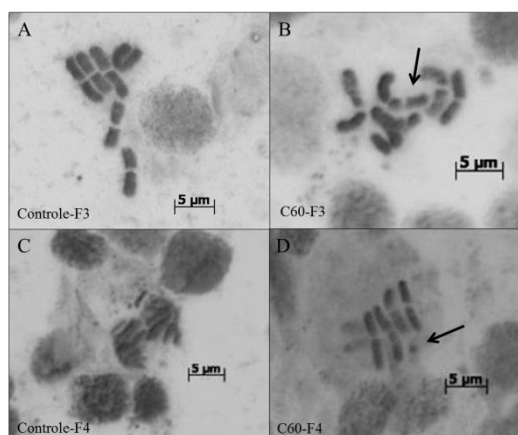


Figura 2. Neuroblastos (A, B e D) e ovócitos (C) de *Aedes aegypti* corados com Giemsa (pH 5,8) eorceína-lacto-acética (2%). A – núcleo metafásico (normal) (Cotrole); B – quebra cromossômica (seta) (C60 µg/mL); C – anáfase (normal) (Controle); D – micronúcleo em metafase (seta). Aumento: 1000 e 1600x.

A utilização de extratos e substâncias isoladas de plantas tem se tornado uma nova alternativa aos inseticidas sintéticos para o controle populacional dos insetos (Guarda *et al.*, 2016). Neste estudo, avaliaram-se o potencial genotóxico e mutagênico do semissintético E-isodilapiol em *A. aegypti*, por 4 gerações. A ação genotóxica dos derivados do dilapiol, o 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*, de Manaus, AM, por quatro gerações (Domingos *et al.* 2014). Esses autores registraram a presença de anormalidades nucleares interfásicas e metafásicas e relacionaram o aumento na frequência de anomalias diretamente proporcional 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 nas gerações ao longo do período de exposição ao mesmo tratamento.

Neste estudo, as anomalias genotóxicas em *A. aegypti* tratado com E-isodilapiol (20 µg/mL, 40 µg/mL e 60 µg/mL), por 4 horas foram observadas entre os tratamentos e entre as gerações F<sub>3</sub> e F<sub>4</sub>, porém ocorreu um aumento significativo dessas alterações apenas em neuroblastos. Em ovócitos de F<sub>3</sub> e F<sub>4</sub> foram registradas células em apoptose, o que não ocorreu nas gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>, previamente analisadas. A indução de apoptose por lesão do material genético celular pode ser ocasionada por estímulos de compostos químicos, radioativos ou vírus (Batista 2008). O composto E-isodilapiol em *A. aegypti* pode ter ocasionado danos ao seu DNA, cujo mecanismo de reparo de DNA pode ter sido comprometido devido à toxicidade desse produto, que pode ter ocasionado a indução da morte celular por apoptose, nas gerações F<sub>3</sub> e F<sub>4</sub>. Nesse sentido, os resultados deste trabalho não suportam os de Rafael et al. (2008) e Domingos, et al (2014), que verificaram com o dilapiol e os compostos 1KL39-B e 1KL43-C um aumento significativo de anormalidades em neuroblastos e ovócitos nas quatro gerações analisadas, mas não registraram a ocorrência significativa de células em apoptose.

## CONCLUSÃO

Os efeitos citogenotóxicos (micronúcleos, brotamentos, células mono e polinucleadas e outras má-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 E-isodilapiol diretamente no campo, fazem-se necessários considerando a importância de combate ao *A. aegypti*, principal transmissor dos vírus dengue, zika, chikungunya e da febre amarela.

## REFERÊNCIAS

- Batista, L.F.Z. 2008. Mecanismos de indução de apoptose pela presença de danos ao DNA: um estudo sobre o papel de p53 na resistência de células de glioma a agentes quimioterápicos. Tese. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 159p.
- Belzile, A.-S.; Majerus, S.L.; Podeszfski, C.; Guillet, G.; Durst, T.; Arnason, J.T. 2000. Dilapiol Derivatives as Synergists: Structure-Activity Relationship Analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 66: 33-40.
- 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 dillapiol for the control of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mutation Research*, 772: 42-54.
- Guarda, C.; Lutinski, J.A.; Roman-Junior, W.A.; Busato, M.A. 2016. Atividade larvicida de produtos naturais e avaliação da susceptibilidade ao inseticida temefós no controle do *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) *Interciencia*, 243-247.
- 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.
- M.S. 2016. *Boletim Epidemiológico*, 7: 1 (Portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/22/BE-dengue-SE-52-20-01-15.pdf). Acesso em 19/05/2016.

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.D.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.