

ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS MICRONUCLEADOS EM CAMUNDONGOS (*Mus domesticus domesticus*), TRATADOS COM ENZICOBA (COBAMAMIDA)

Érica Valentini Pepeliascov Pereira¹
Benedito Lúcio Kroll²
Edislane Barreiros de Souza³

PEREIRA, E.V.P.; KROLL, B.L.; SOUZA, E.B.; Análise da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em camundongos (*Mus domesticus domesticus*), tratados com Enzicoba (cobamamida). *Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama, 8(1), jan./abr.* p.31-37, 2004.

RESUMO: O anabolizante Enzicoba possui como princípio ativo a Cobamamida ou Coenzima da Vitamina B12 que é um cofator presente, em condições fisiológicas, nos tecidos de várias espécies animais (inclusive no homem), que pode interferir nos processos metabólicos da síntese protéica, essencial para o crescimento corpóreo e para o eutrofismo do parênquima hepático. Tal composto estimula o anabolismo celular em todos os níveis do organismo, ativa a síntese protéica e favorece a utilização dos glicídios e lipídios. O presente trabalho avaliou a possível ação mutagênica do Enzicoba, mediante a análise da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em camundongos (*Mus domesticus domesticus*). Os animais foram tratados com dose única de 0,02mg, 0,06mg, 0,08mg e 0,12mg de Enzicoba/18g. do peso vivo do animal. Após 32 horas da administração via intraperitoneal da substância (Enzicoba), os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. As análises tiveram seus valores expressos em frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPMN) em 1000 EP por animal. Os dados foram submetidos ao Teste do Qui-Quadrado (χ^2), análise de variância e Teste de Tukey. Os resultados evidenciaram diferenças significativas de EPMN para o tratamento com baixa dose de Enzicoba (0,02), quando comparado com tratamentos com doses mais altas. Nas condições analisadas o Enzicoba apresentou uma atividade citotóxica e uma baixa clastogenicidade em doses mais elevadas.

PALAVRAS-CHAVE: cobamamida; micronúcleo; clastogênico; mutagênico; Enzicoba; Eritrócitos policromáticos.

ANALYSIS OF THE RATE OF MICRONUCLEATED POLYCHROMATIC ERYTHROCYTES IN MICE (*Mus domesticus domesticus*) TREATED WITH ENZICOBA (COBAMAMIDE)

PEREIRA, E. V. P.; KROLL, B. L.; SOUZA, E. B.; Analysis of the rate of micro-nucleated polychromatic erythrocytes in mice (*Mus domesticus domesticus*) treated with Enzicoba (Cobamamida). *Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama, 8(1), jan./abr.* p.31-37, 2004.

ABSTRACT: Enzicoba, an anabolic substance, has cobamamide or coenzyme B12 as its active principle, which is a cofactor present, under physiological conditions, in tissues of several species (including man) and may interfere in the metabolic processes of protein synthesis, essential for body growth and normal tropism of the hepatic parenchyma. This compound stimulates cellular anabolism at all levels and favors carbohydrate and lipid use. This research evaluated the possible mutagenic action of Enzicoba by means of the analysis of the rate of micronucleated polychromatic erythrocytes in mice (*Mus domesticus domesticus*). The mice were treated with a single dose of 0.02mg; .0.06mg; .0.08mg or 0.12mg of Enzicoba/18g live weight. After 32 hours of the intraperitoneal administration of Enzicoba, the mice were sacrificed by cervical dislocation. The values of the analyses were expressed as rates of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPE) per 1000 PE per animal. The data were subjected to the chi-squared test (χ^2), variance analysis and Tukey's test. The results showed significant differences of MNPE for the small dose treatment with Enzicoba (0.02mg) compared with higher dose treatments. In such conditions, Enzicoba showed a cytotoxic activity and a low clastogenic rate in higher doses.

KEY WORDS: Cobamamide; Micronucleus; Mutagenic; Enzicoba; Polychromatic erythrocytes; Clastogenic

Introdução

O uso de agentes farmacológicos, entre as pessoas, especialmente os atletas, com o objetivo de ganho de massa muscular, tem sido intenso na última década. Muitos destes agentes sintéticos podem acarretar efeitos colaterais, que vão desde náuseas, queda de cabelo, até conseqüências mais graves, como esterilidade, impotência, ginecomastia,

doenças hepáticas, dependência medicamentosa e até mesmo a morte causada por câncer hepático e hematológico. Os anabolizantes esteróides, são substâncias perigosas à saúde e, freqüentemente, são ingeridos em combinação com proteínas e vitaminas, num programa de treinamento com resistência, para o aprimoramento do desempenho nos desportos que exigem força, velocidade e potência. Os esteróides possuem muitos efeitos colaterais e restrições ao uso. Mesmo em

¹Farmacêutica – Mestre em Ciências Fisiológicas, Professora e Coordenadora do Curso de Farmácia da UNIPAR, *Campus-Paranavaí* – PR

²Docente da UNOESTE - SP

³Docente da UNESP de Assis - SP

Endereço para correspondência: Érica Valentini Pepeliascov Pereira, Av. Lázaro F. Vieira, 709 - Jd. Progresso - Paranavaí-PR - 87.701-240 - e-mail: valentini@unipar.br

condições em que o uso é necessário, como em alguns tipos de anemia, distrofia muscular e osteoporose, o uso dos anabolizantes só é feito com prescrição médica, onde muitas vezes os médicos até optam por outros tratamentos. (<http://www.fisioculturismo.com.br/diretorio/anabolizantes>)

Existem vários anabolizantes que são vendidos legalmente em casas de produtos naturais, farmácias e lojas de esportes. Entre eles as Coenzimas B12 vendidos nas farmácias com os nomes comerciais de Cobavital, Coenzima B12 e Enzicoba, com a informação de que são produtos naturais e, em geral não possuem efeitos colaterais nem restrições ao seu uso. A procura de anabólicos naturais, de suplemento alimentar, à venda no mercado, para promover a rehidratação durante e, sobretudo, após o esforço físico, têm sido uma prática comum nos dias de hoje, especialmente, entre os atletas que, pela modalidade e/ou intensidade do desporto que praticam, podem utilizar este recurso na suplementação alimentar e melhora na sua condição física.

O Cobavital, Cobaglobal e Enzicoba estão disponíveis no mercado como suplementos alimentares, para ganho de peso, pois aumenta o apetite e, é um anabólico natural, sem contra indicações expressos nos produtos.

A cobamamida é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B (vitaminas B12), que age como coenzima na síntese dos ácidos nucleicos, influenciando favoravelmente o metabolismo e estimulando os processos anabólicos, é o princípio ativo do Enzicoba, Cobavital, Cobactim, Cobaglobal e Enzivital. (<http://www.farmasa.com.br/pages/bulario/enzicoba.htm>).

A composição química da cobamamida é 5,6 – dimetil – benzomedazol –cobamamida, com uma estrutura muito semelhante à da cianocobalamina e hidroxicobalamina (<http://www.farmasa.com.br/pages/bulario/enzicoba.htm>).

A cobamamida é um cofator presente em condições fisiológicas nos tecidos de várias espécies animais, inclusive no homem e, possui a propriedade de atuar em processos metabólicos da síntese protéica, realizados, principalmente no fígado, essencial para o desenvolvimento corpóreo e atrofismo do parênquima hepático. Difere de outros anabolizantes hormonais (esteróides) por não possuírem substâncias androgênicas. A cobamamida estimula o anabolismo celular em todos os níveis do organismo, ativa a síntese protéica, favorece a utilização de glicídios e lipídios e, possui notável efeito sobre o sistema hematopoético. É indicada no tratamento de convalescenças, astenia, distrofias, atrasos de crescimento e desenvolvimento, anorexia, profilaxia e deficiência de vitamina B12, anemia megaloblástica, difilobotríase, distúrbios neurológicos associados com anemia maligna, síndrome de má absorção, como espru, doenças causadas por deficiência de vitamina B12 ou distúrbios metabólicos, como: anemia na gravidez, anemia pós - gastrectomia, anemia nutricional, anemia devido a insuficiência hepática, leucopenia devido à radiação, neuralgia, mialgia, artralgia, neurite periférica, paralisia de nervos periféricos, distúrbios nervosos centrais.

Preparações orais administradas por longos períodos podem produzir danos neurológicos permanentes. Consta como cuidados especiais não fumar ou ingerir bebidas alcoólicas durante o tratamento (<http://www.farmasa.com.br/pages/bulario/enzicoba.htm>).

Ao longo dos últimos anos, têm sido identificadas e caracterizadas substâncias presentes na dieta alimentar humana que provocam algum tipo de lesão no material genético ou celular e, muitas vezes as mutações podem levar ao desenvolvimento do câncer. Cerca de 90% de todos os cânceres são causados por fatores ambientais, tais como o fumo, a dieta, o estado nutricional e a exposição ocupacional (IARC, 1990). Por conta disso, estudos que avaliam o potencial mutagênico de diferentes substâncias são extremamente importantes. O presente trabalho procurou avaliar, mediante o teste de eritrócitos policromáticos micronucleados, o possível efeito mutagênico do anabolizante natural, Enzicoba.

Anabolizantes naturais

Cobalaminas

As fontes naturais da cobalamina são as proteínas animais, tais como carne, pescado, gema de ovo e laticínios. Indivíduos vegetarianos podem desenvolver deficiência desta vitamina. Esta deficiência, porém, só aparece após muitos anos, pois a maior parte da vitamina B12 é reabsorvida na circulação entero-hepática e a depleção dos locais de armazenamento no organismo, principalmente no fígado, é gradual (KOROLKOVAS, 1999/2000).

Os preparados de cobalaminas são clinicamente úteis no tratamento de anemia perniciosa, anemia macrocítica nutricional e alguns casos de espru tropical ou não - tropical, vale dizer, estados de deficiência de vitamina B12. As preparações de vitaminas B12 são administradas de preferência por via intramuscular e subcutânea profunda. Preparações orais administradas durante períodos prolongados usados na anemia perniciosa com complicações neurológicas podem causar danos permanentes. Danos neurológicos irreversíveis ocorrem quando o paciente com anemia perniciosa deixa de receber ou recebe em intervalos irregulares, a vitamina B12 (KOROLKOVAS, 1999/2000).

As cobalaminas de interesse terapêutico são: cianocobalamina, cobamamida, hidroxicobalamina, injeção de fígado e vitamina B12 com concentrado de fator intrínseco. A cobamamida é freqüentemente utilizada como agente anabólico, como estimulante do anabolismo celular. A injeção de fígado é considerada obsoleta e não deve ser usada por causar reações alérgicas. A cianocobalamina (vitamina B12) é essencial para o processo de maturação dos glóbulos vermelhos na medula óssea. Na carência dessa vitamina, glóbulos vermelhos imaturos são lançados na corrente sanguínea, ocasionando a anemia perniciosa ou anemia megaloblástica. A vitamina B12 com concentrado de fator intrínseco é mal absorvida, desenvolvendo refratariedade, provocando sensibilização, motivos estes em que seu uso não é recomendado. A hidroxicobalamina, tem as mesmas propriedades e indicações da cianocobalamina, mas devido ao fato de ligar-se com mais firmeza às proteínas séricas, tem ação mais prolongada, que a cianocobalamina, por esta razão é considerada, como vitamina B12, natural de ação prolongada (KOROLKOVAS, 1999/2000).

As cobalaminas são essenciais ao crescimento normal, nutrição e desempenho de diversos processos fisiológicos, tais como, a síntese de proteínas e da molécula de DNA, pois constituem (a vitamina B12 e o folato) as

coenzimas necessárias à síntese de bases nitrogenadas (purinas) (MILLER *et. al.*, 1981).

A vitamina B12 ou cianocobalamina foi isolada pela primeira vez por COHN *et. al.* em 1928 Apud MILLER *et. al.* (1981), pelo método de precipitação alcoólica de extratos aquosos do fígado. Segundo MILLER *et. al.* (1981), essa vitamina, ingerida com a alimentação (proteínas animais), constitui o chamado fator extrínseco de Castle. Esse fator transforma os complexos de vitamina B12 existente nos alimentos em uma forma adequada à absorção, mas o mecanismo exato de tal ação é ainda desconhecido. A carência de vitamina B12 ou de folato pode ser causada por deficiência alimentar, insuficiência de absorção intestinal e aumento das necessidades metabólicas.

O emprego da vitamina B12 é aconselhado no tratamento de diversas afecções neurológicas não relacionadas como anemia perniciosa, especialmente de natureza dolorosa, assim como para estimular o apetite e o desenvolvimento físico de crianças que apresentam déficit ponderal ou estatural (MILLER *et. al.*, 1981).

Material e Métodos

Foram utilizados dez camundongos (*Mus domesticus domesticus*), distribuídos em quatro grupos experimentais. Um camundongo foi utilizado para o controle negativo e um para o controle positivo do experimento junto ao Laboratório, num total de 42 animais. Camundongos com aproximadamente 7 semanas de vida, foram alojados no Biotério com temperatura e luminosidade controladas.

TABELA 1 - Reúne os quatro grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de Enzicoba (Cobamamida) administradas, via intraperitoneal, a cada 18g. do peso vivo do camundongo e, sacrificados 32 horas após o tratamento.

Grupo	Número de animais/ grupo	Número de dose	Concentração da dose
1	10	Única	0,02 mg/18g. p.v.a.
2	10	Única	0,06 mg/18g. p.v.a.
3	10	Única	0,08 mg/18g. p.v.a.
4	10	Única	0,12 mg/18g. p.v.a.

A Tabela 1 reúne os grupos experimentais testados no presente trabalho, com o número de animais analisados e a dose testada de Enzicoba (Cobamamida)/18g. do p.v.a.

Para os controles positivo e negativo da técnica de micronúcleos em eritrócitos policromáticos, foram utilizados um camundongo para cada controle, tratados com uma única dose de ciclofosfamida (Genuxal), na proporção de 0,9 mg/18g. do p.v.a. e, com dose única de 0,5 mL de solução fisiológica, respectivamente. Os animais foram sacrificados 32 horas após a injeção intraperitoneal.

Os animais dos grupos experimentais e do controle positivo e negativo mantidos no Biotério, após os procedimentos experimentais, foram sacrificados por deslocamento cervical, e a medula dos ossos longos - fêmur, retirada.

O protocolo experimental deste trabalho foi

aprovado pelo comitê de ética da UNESP.

O método empregado para a o teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos foi de acordo com a técnica de HEDDLE (1973) e SCHIMID (1975).

Análise dos Dados

Os resultados foram expressos em frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em 1000 EP por animal.

Os dados foram submetidos à análise estatística com o Teste do Qui-Quadrado (X^2), Análise da Variância (com um critério de classificação) e Teste de Tukey, segundo BERQUÓ *et. al.* (1981).

Resultados

No presente trabalho analisou-se 42 animais (camundongos) sendo distribuídos em quatro grupos experimentais, como objetivo de avaliar os efeitos mutagênicos e citotóxicos do anabolizante Enzicoba, mediante o teste de Micronúcleo em eritrócitos policromáticos.

A análise das células feita em Microscópio binocular Olympus BH2, com aumentos de 40x e 100x para a visualização dos eritrócitos policromáticos. Foram analisados, para os grupos tratados com Enzicoba, em teste cego, 40.000 células, sendo 1000 por animal. A fotodocumentação dos eritrócitos policromáticos obtidos foi realizada com filmes Tmax (ISO/100) da Kodak do Brasil. A Figura 01 apresenta os eritrócitos policromáticos com e sem micronúcleos.

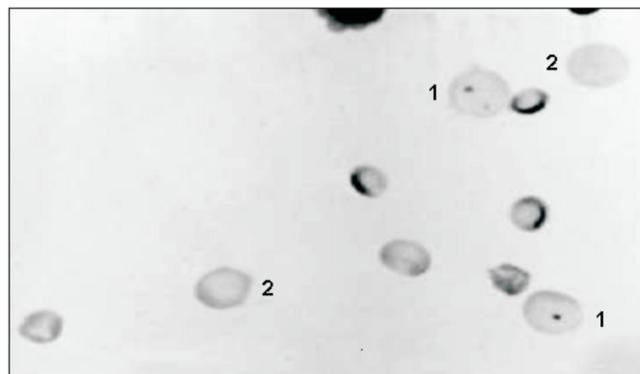


FIGURA 01: Foto de Eritrócitos policromáticos micronucleados (1) e eritrócitos policromáticos sem micronúcleos (2).

Um camundongo tratado com ciclofosfamida constituiu o controle positivo da técnica. Os resultados da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em 1000 células analisadas foi de 36/1000. O controle negativo, camundongo tratado com soro fisiológico, teve seus resultados expressos em 2/ 1000 eritrócitos policromáticos micronucleados.

As Tabelas de 2 a 5 reúnem as frequências observada (Fo) e esperada (Fe) de eritrócitos policromáticos com micronúcleo numa análise de 1000 EP em cada camundongo tratado com 0,02; 0,06; 0,08 e 0,12 mg de Enzicoba/ 18 gramas do peso vivo do animal, respectivamente.

Os resultados obtidos foram submetidos as análises estatísticas, com o Teste do Qui - Quadrado (X^2) (Tabelas

de 2 a 5), Análise da Variância, inteiramente ao acaso, comparando as médias os tratamentos, desvio padrão, coeficiente de variação e valor de F (Tabela 6) e aplicação do Teste de Tukey (Tabela 7) comparando as quatro médias

TABELA 2: Reúnem as freqüências observada (Fo) e esperada (Fe) de Eritrócitos Policromáticos com Micronúcleo numa análise de 1000 EP em cada camundongo tratado com 0,02 mg de Enzicoba/ 18 gramas do peso vivo do animal.

Animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
Fo	03	02	05	07	06	05	04	08	06	05	51
Fe	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	51

($\alpha = 5\%$; G1 = 9; $X^2 = 5,667$; $0,70 > P > 0,80$)

TABELA 4: Reúnem as freqüências observada (Fo) e esperada (Fe) de Eritrócitos Policromáticos com Micronúcleo numa análise de 1000 EP em cada camundongo tratado com 0,08 mg de Enzicoba/ 18 gramas do peso vivo do animal.

Animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
Fo	06	13	16	19	11	07	14	15	08	12	121
Fé	12,1	12,1	12,1	12,1	12,1	12,1	12,1	12,1	12,1	12,1	121

($\alpha = 5\%$; G1 = 9; $X^2 = 12,965$; $0,10 > P > 0,20$)

TABELA 6: Análise de variância, inteiramente ao acaso, comparando as médias dos quatro tratamentos com Enzicoba, com diferentes doses, em 40 camundongos.

Causas da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F
Tratamentos	3	479.4750	159.8250	18.78*
Resíduo	36	306.3000	8.5083	
Total	39	785.7750		

* Significativo; Desvio Padrão = 2,9169; Média Geral = 10,8250; Coeficiente de Variação = 26,95
Erro padrão da média = 0,9224

TABELA 7: Aplicação do teste de Tukey para comparação das médias dos tratamentos com Enzicoba, em diferentes doses, em 40 camundongos.

Tratamento	Média	Significância
Camundongos tratados com dose única de 0,02 mg/18g. p.v.a.	5.1000	S
Camundongos tratados com dose única de 0,06 mg/18g. p.v.a.	11.7000	NS
Camundongos tratados com dose única de 0,08 mg/18g. p.v.a.	12.1000	NS
Camundongos tratados com dose única de 0,12 mg/18g. p.v.a.	14.4000	NS

(S = significativo; NS = não significativo; DMS = 3,5144; $\alpha = 5\%$)

Discussões

Segundo o procedimento original (HEDDLE, 1973; SCHIMID, 1975), os micronúcleos contados em eritrócitos jovens, são corpúsculos contendo DNA Feulgen – positivo no citoplasma, com um diâmetro de 1/20 a 1/5 do eritrócito (Figura 01). Os eritroblastos ao expelirem seus núcleos, transformando-se em eritrócitos, mantém no citoplasma, os micronúcleos, facilmente reconhecidos. Num período de 10 a 24 horas, os eritrócitos jovens são policromáticos (coram-se de azul e não em vermelho). Se os micronúcleos forem contados apenas nesse tipo de célula, significa que foram formados na mitose anterior, na presença de uma substância mutagênica. Como o período entre a última divisão e a formação do eritrócito policromático (EP) é de 8 a 12 horas, micronúcleos induzidos pelo agente, só serão encontrados

dos tratamentos realizados, duas a duas, nos 40 animais analisados.

TABELA 3: Reúnem as freqüências observada (Fo) e esperada (Fe) de Eritrócitos Policromáticos com Micronúcleo numa análise de 1000 EP em cada camundongo tratado com 0,06 mg de Enzicoba/ 18 gramas do peso vivo do animal.

Animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
Fo	11	09	13	19	11	09	11	14	08	12	117
Fe	11,7	11,7	11,7	11,7	11,7	11,7	11,7	11,7	11,7	11,7	117

($\alpha = 5\%$; G1 = 9; $x^2 = 7,701$; $0,50 > P > 0,70$)

TABELA 5: Reúnem as freqüências observada (Fo) e esperada (Fe) de Eritrócitos Policromáticos com Micronúcleo numa análise de 1000 EP em cada camundongo tratado com 0,12 mg de Enzicoba/ 18 gramas do peso vivo do animal.

Animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
Fo	18	14	15	15	15	12	13	14	16	12	144
Fé	14,4	14,4	14,4	14,4	14,4	14,4	14,4	14,4	14,4	14,4	144

($\alpha = 5\%$; G1 = 9; $X^2 = 2,111$; $0,98 > P > 0,99$)

cerca de 10 horas após o tratamento. Além disso, o intervalo mínimo dentro do qual os micronúcleos podem ser detectados corresponde à duração de 10 a 24 horas, período em que se têm a condição de policromático (RABELLO-GAY *et al.*, 1991).

Recomenda-se usar animais entre 7 e 12 semanas de idade, cinco para cada dose e, contar 1000 eritrócitos policromáticos por animal. Outra possibilidade é contar um total de 2000 eritrócitos, isto porque, a passagem de eritrócito policromático a maduro, normocromático, é um processo contínuo, a decisão de contar um eritrócito em transição como jovem ou adulto, é mais ou menos subjetiva. Nos controles e após tratamentos que não afetam a proliferação da medula, a relação entre policromáticos e normocromáticos é aproximadamente 1:1. A análise de 2000 eritrócitos reduz o número de decisões subjetivas. Quando a proliferação normal

das células da medula estiver prejudicada, por exemplo, com antimetabólitos, a contagem deve ser restrita à população de policromáticos, pois nessas circunstâncias a medula é invadida por sangue periférico e a relação 1:1 é distorcida em favor das células vermelhas maduras (RABELLO-GAY, *et. al.*, 1991).

Se um composto está sendo testado pela primeira vez, deve-se usar um esquema de dois tratamentos, a 0 e 24 horas e, colher a amostra com 48 horas após o primeiro tratamento (SALAMONE *et. al.*, 1980). Assim, os eritrócitos policromáticos presentes, representam células tratadas 24 e 48 horas antes da coleta. O efeito do tratamento duplo geralmente é aditivo. Protocolos com 3, 4 ou mais tratamentos, induzem efeitos tóxicos e diminuem a frequência de EP.

Segundo SALAMONE *et. al.* (1980), os animais devem ser tratados a 0 e 24 horas e as coletas feitas a 48, 72 e 96 horas. Se um aumento significativo na frequência de células com micronúcleos for observado, repetir o experimento na coleta que deu a resposta máxima.

Depois de cada tratamento, há um particular intervalo do tempo durante o qual o eritrócito RNA - positivo micronucleado, se induzidos, podem estar presentes visto que os micronúcleos são formados durante a divisão das células eritropoéticas nucleadas, mas corado nos eritrócitos anucleados maduros. O micronúcleo não pode aparecer precocemente após o tratamento de enucleação. No rato, este tempo mínimo entre o tratamento e o aparecimento dos micronúcleos são de aproximadamente 5 horas (MAC GREGOR *et. al.*, 1987). Para a maioria dos produtos químicos, aumentos substanciais nas frequências dos micronúcleos não tem sido mais encontrados antes de 9 -12 horas, após tratamento. A extensão de vida do eritrócito RNA - positivo dentro da medula óssea, esta entre 10 e 30 horas nos camundongos e ratos, os eritrócitos RNA - positivos micronucleados formados remanescerão na medula óssea pelo menos 10 -12 horas (MAC GREGOR *et. al.* 1987).

Devido as diferenças entre agentes do teste um tempo depois do tratamento no qual o pico de frequência do micronúcleo ocorre, é importante que duas ou mais amostras sejam feitas se somente um ou dois tratamentos forem realizados. O intervalo entre amostras deve ser mais curto do que o tempo onde faria exame de uma população de células clastogênicas afetadas na eritropoiese. Este período de tempo é aproximadamente 24 a 36 horas nos camundongos e ratos. Desde que um agente clastogênico possa afetar mais do que um único ciclo celular do eritroblasto, o período onde EP micronucleados são observáveis pode ser mais longo que 24 - 36 horas (MAC GREGOR *et. al.*, 1987). Entretanto, a frequência de EP micronucleados não é geralmente constante durante este período, mas ascende para um máximo e então declina. Uma vez que é desejável provar tão próximo como possível o tempo da frequência de EP micronucleados, é recomendado que o tempo entre amostras não exceda aproximadamente 32 horas.

Baseado nas considerações acima as programações seguindo da amostragem são recomendadas para experimentos com camundongos e ratos. Se um tratamento for empregado, um mínimo de três amostras devem ser obtidos entre 20 e 72 horas após o tratamento. Se dois tratamentos forem empregados, um mínimo de duas amostras devem ser

obtidas entre 20 – 48 horas após a última dose. Se somente forem feitos exames em duas amostras, utilizar tempo de aproximadamente 20 – 48 horas depois da última dose, o que seria mais apropriado para detectar a indução de micronúcleos, na maioria dos produtos químicos conhecidos atualmente. Se mais de dois tratamentos diários forem empregados por um período de três ou mais dias consecutivos, deve ser suficiente uma única amostra obtida aproximadamente 18 – 24 horas depois da última dose (MAC GREGOR *et. al.*, 1987)

O tempo no qual o animal deve ser sacrificado, após o tratamento, varia conforme o metabolismo da droga. Por exemplo, após uma única injeção intraperitoneal, a frequência máxima de MN na medula ocorre aproximadamente após 36 horas no caso da Mitomicina C, 72 horas no caso do Dimetil – benzo - antraceno (SALAMONE *et. al.*, 1980), ciclofosfamida e colchicina, o pico é ao redor de 30 horas (YAMAMOTO & KIKUCHI, 1981).

No presente trabalho, testou-se o tempo ideal para o sacrifício dos animais tratados com Enzicoba. Os animais foram sacrificados, com 24 e 32 horas após o tratamento, onde observou-se que o maior índice na frequência de células micronucleadas foi no animal sacrificado com 32h de exposição à droga. A análise de 1000 eritrócitos policromáticos em cada tempo de tratamento evidenciou um aumento significativo dos micronúcleos com 32 horas.

A Cobamamida após a administração intramuscular de 100, 500 e 1000 ug, permanecem no organismo, depois de 72 horas nas concentrações de 41, 114 e 125 ug, respectivamente (<http://www.farmasa.com.br/pages/bulario/enzicoba.htm>).

A Ciclofosfamida é um agente alquilante, utilizado no tratamento de neoplasias em geral. Este agente inibe a replicação do DNA e a transcrição do RNA através do cruzamento inter e intra - cadeias (ROESER *et. al.*, 1978). Como sua mutagenicidade e clastogenicidade é amplamente conhecida, utiliza – se esta substância para realizar os experimentos de controle positivo.

Animais tratados com ciclofosfamida foram sacrificados com 32 horas, o que constituiu o grupo controle positivo da técnica junto ao laboratório, bem como, animais tratados com soro fisiológico, o controle negativo. Os resultados, para o controle positivo, quanto à frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em 1000 células analisadas foi igual à 36. O controle negativo, teve seus resultados expressos em média de 2/1000 eritrócitos policromáticos micronucleados. Segundo RABELLO – GAY *et. al.* (1991), a taxa espontânea de eritrócitos policromáticos com micronúcleos é baixa e consistente, cerca de 3 por 1000.

É importante que cada laboratório determine a frequência de micronúcleos nas células de animais tratados com substâncias controle, relativo à frequência espontânea em animais não tratados, de modo que todo o efeito deste solvente (água destilada, soro fisiológico), seja conhecido e, que substâncias conhecidas capazes de induzir o micronúcleo na medula óssea, deve ser incluída em cada experimento para confirmar que todas as características do protocolo foram realizadas corretamente. (MAC GREGOR *et. al.*, 1987).

O agente e a dose devem ser escolhidos para produzir um resultado moderado ou fraco. Isto fornece uma

melhor avaliação de sensibilidade do teste do que o uso de uma dose elevada de um clastogênico potente do qual se possa de qualquer forma, sempre ser detectado, indiferente de ser ou não ótima a sensibilidade do teste (MAC GREGOR *et. al.*, 1987).

Os resultados da análise do X^2 , referentes aos grupos experimentais, tratados com dose única de Enzicoba de 0,02 mg ($X^2 = 5,667$; $0,70 > P > 0,80$) (Tabela 2) e 0,06 mg/18g do p.v.a. ($X^2 = 7,701$; $0,50 > P > 0,70$) (Tabela 3) não foram significativos. Resultados não significativos também foram observados para os tratamentos com doses únicas de 0,08 mg/18g p.v.a. ($X^2 = 12,965$; $0,10 > P > 0,20$) (Tabela 4) e 0,12 mg/18g p.v.a. ($X^2 = 2,111$; $0,98 > P > 0,99$) (Tabela 5).

As freqüências de células micronucleadas, em animais tratados com Enzicoba revelaram um aumento de EPMN em relação à dose administrada. Camundongos tratados com dose única de 0,02 mg de Enzicoba 18 g. p.v.a. apresentaram freqüência baixa de EPMN (5,1%) quando comparada com as demais doses de 0,06 mg (11,7%); 0,08 mg (12,1%) e 0,12 mg (14,4%). Diferença pequena na freqüência de EPMN foi observada entre as doses de 0,06 mg (11,7%) e 0,08 (12,1%). Os resultados indicam que doses mais elevadas apresentam maior freqüência de micronúcleos, ou seja, quanto maior a dose maior o número de células micronucleadas.

A maioria das substâncias testadas, apresentam o chamado “Efeito Dose”, onde o aumento da freqüência de EPMN esta relacionado com o aumento da dose administrada e, isto indica que o agente em teste, interfere com a divisão nos eritroblastos da medula óssea, de tal forma que os fragmentos cromatídicos ou cromossomos não foram incorporados no núcleo da célula filha. Uma freqüência elevada de células micronucleadas sugere fortemente que um destes tipos de danos ocorreu, o que não é possível afirmar com os resultados obtidos no presente trabalho, pois a freqüência de EPMN, sob as circunstâncias de tratamento empregadas e, quando comparadas ao controle positivo, não foi demasiadamente elevada.

Estudos com o anabolizante hormonal Deca-Durabolin (OLIVEIRA *et. al.*, 2000), em diferentes doses testadas, evidenciaram que a indução da freqüência de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos é dependente da dose e do tempo de exposição do animal a mesma, sugerindo que quanto maior a dose, maior a freqüência de células micronucleadas. No entanto, outras substâncias, como Óleo de Copaíba (SENA & CHEN, 1998), em doses elevadas causam uma diminuição na freqüência de micronúcleos, isto devido à inibição da divisão celular, em decorrência da alta toxicidade do óleo. Outras substâncias, como inseticida (Azadrin) (PEÑA *et. al.*, 1995) causam alterações no diâmetro dos micronúcleos, ou seja, quanto maior o tempo de exposição ao inseticida, maior o micronúcleo. Isto é, um forte indicativo da clastogenicidade e dos danos mitóticos provocados pela droga.

Os resultados da Análise da Variância mostraram-se significativos nos parâmetros abordados (dosagens administrativas nos camundongos) ($F = 18,78$) (Tabela 6).

A aplicação do Teste de Tukey (Tabela 7) permitiu comparar as médias dos diferentes tratamentos. Os resultados revelaram que a média do tratamento com

dose única de 0,02 mg de Enzicoba/18g. p.v.a. é diferente das médias dos tratamentos com dose única de 0,06 mg; 0,08 mg e 0,12 mg. As médias dos tratamentos com as dosagens de 0,06 mg; 0,08 mg e 0,12 mg não apresentaram diferenças significativas (Tabela 7). A existência de diferença significativa de células micronucleadas, para os tratamentos com dose única baixa (0,02 mg) e doses únicas mais elevadas (0,06 mg; 0,08 mg e 0,12 mg) indicam que existe atividade citotóxica e, uma baixa clastogenicidade do Enzicoba, em doses elevadas, quando comparada com outras substâncias, como o quimoterápico cisplatina (LUIZ, 2002); anticonvulsivantes, como Fenobarbital (CÂNDIDO, 2001) e carbamazepina (PRATES, *et. al.*, 1997); anabolizante Deca-Durabolin (OLIVEIRA, 2000) e o controle positivo (animais tratados com ciclofosfamida). Os dados também sugerem que não ocorreu uma inibição da divisão celular, pois não houve diminuição na freqüência de micronúcleos em doses mais elevadas. Estes resultados corroboram com a hipótese do “Efeito Dose”. As informações obtidas, pelo Teste de Tukey, permitiram também inferir que não houve uma maior indução da freqüência de células micronucleadas à medida que se aumentou a dose única de 0,06 mg para 0,08 mg e para 0,12 mg de Enzicoba (Tabela 7).

O teste do micronúcleo deve ser usado em conjunto com outros testes, em protocolo combinado que permita a comparação de vários métodos sob idênticas condições experimentais (CONNOR *et. al.*, 1979). Muitas vezes o teste do micronúcleo não é suficientemente sensível, quando substâncias que dão resultados positivos são detectados em doses muito próximas da dose máxima que pode ser testada, isto é, perto da dose que mata o animal (RABELLO-GAY *et. al.*, 1991).

Estudos que envolvam outros testes, como o teste de aberrações cromossômicas, o teste do micronúcleo em cultura de linfócitos ou em células esfoliadas, bem como, outras concentrações do Enzicoba e, outros organismos, permitam identificar o dano genotóxico nos tecidos, alvo da substância, e poderão elucidar com mais precisão o seu efeito clastogênico e, a dose máxima tolerada.

Conclusões

Os resultados do presente trabalho permitiram chegar às seguintes conclusões:

Houve diferença significativa para o tratamento com baixa dose de Enzicoba (0,02 mg/18 g. p.v.a.) quando comparado com tratamentos com doses mais altas de Enzicoba (como 0,06 mg; 0,08 mg e 0,12 mg/ 18 g. p.v.a.);

Não houve maior indução na freqüência de células micronucleadas com o aumento das doses de Enzicoba de 0,06 mg para 0,08 mg e para 0,12 mg/18 g. p.v.a, nos tratamentos realizados;

A freqüência de eritrócitos policromáticos micronucleados apresentou valores mais baixos em animais tratados com dose única de 0,02 mg de Enzicoba/18 g. p.v.a. e, valores mais altos em animais tratados com dose única de 0,12 mg de Enzicoba/18 g. p.v.a;

Nas condições analisadas, o Enzicoba apresentou uma atividade citotóxica e uma baixa clastogenicidade em doses mais elevadas, portanto, nas doses testadas a cobamamida

não apresentou efeito mutagênico para o camundongo.

Referências

BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P.; GODLIEB, G. L. D. *Bioestatística*. São Paulo: EBU, 1981.

CÂNDIDO, K. T. *Avaliação do potencial mutagênico do fenobarbital mediante o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos (Mus musculus)*. 2001. 86 f. Dissertação (Mestrado)- Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2001.

CONNOR, T. H. et al. A combined testing protocol approach for mutagenicity testing. *Mutation Res*, v. 64, p. 19-26, 1979.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Res*, v. 18, p. 187-190, 1973.

IARC - Cancer: Causes, occurrence and control. Tomatis, L. (Ed.). *IARC Scientific Publications*, Lyon, v. 100, 1990.

KOROLKOVAS, A. *Dicionário terapêutico Guanabara*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

LUIZ, D. C. G. *Avaliação dos efeitos mutagênicos e clastogênicos da cisplatina em ratos prenhes, da linhagem Wistar, mediante o teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos*. 2002. 93 f. Dissertação (Mestrado)- Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2002.

MAC GREGOR, J. T. et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Res*, v. 189, p. 103-112, 1987.

MILLER, O. et al. *Farmacologia clínica e terapêutica*. 12. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1981.

OLIVEIRA, D. G. et al. Efeito clastogênico do Deca - Durabolin em ratos, mediante a análise do micronúcleo em eritrócitos policromáticos *Plural*, Assis, v.1, p. 91-100, 2000.

PEÑA, L. F. M.; CANEVARI, R. A.; CÓLUS, I. M. de S. Determinação da frequência de micronúcleos em peixes nativos submetidos ao inseticida Azodrin através de Bioensaios. *Brazilian Journal of Genetics*, supplement, v. 18, n. 3, p. 358, 1995.

PRATES, R.; NITTA, H. E.; FERRARI, I. Estudo do potencial mutagênico de duas drogas antiepiléticas-Carbamazepina (CZB) e Oxicarbazepina (Oxi) pelo teste do micronúcleo de medula óssea de camundongos. *Genetics and molecular Biology*, v. 20, n. 3, p. 119, 1997.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. *Mutatgênese, carcinogênese, teratogênese: critérios e métodos de avaliação*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991. 241 p.

ROESER, H. P.; STOCKS, A.; SMITH, A. Testicular damage due to cytotoxic drugs and recovery after cassation of therapy. *Aust. N. Z. J. Med.* v. 8, p. 250-254, 1978.

SALOMONE, M. et al. Towards an improved micronucleus test. Studies on 3 model agents, Mytomycin C, Cyclophosphamide and Dimethyl - benzanthracene. *Mutation Res.* v. 74, p. 347-356, 1980.

SCHMID, W. The micronucleus test. *Mutation Res.* v. 31, p. 9-15, 1975.

SENA, M. A.; CHEN, C. L. Avaliação da mutagenicidade do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desfon) em eritrócitos de medula. *Genetics and Molecular Biology*, v. 21, n. 3, suplement, p. 145, Sep. 1998..

YAMAMOTO, K. L.; KIKUCHI, Y. Studies on micronuclei time response and on the effects of multiple treatments of mutagens on induction of micronuclei. *Mutation Res.* v. 90, p. 163-173, 1981.

Recebido para publicação em: 09/09/03

Received for publication on: 09/09/03

Aceito para publicação em: 05/02/05

Accepted for publication on: 05/02/05

PÓS-GRADUAÇÃO UNIPAR

2006

CIÊNCIAS HUMANAS

Campus Umuarama

- Especialização em Docência do Ensino Superior: Fundamentos e Práticas Educativas
- Especialização em Educação Especial
- Especialização em Educação Física Escolar
- Especialização em Língua Inglesa com Ênfase em TESOL
- Especialização em Língua Portuguesa e Literatura Brasileira
- Especialização em Práticas de Laboratório para o Ensino de Ciências:
Níveis Fundamental e Médio

Campus Toledo

- Especialização em Pedagogia da Educação Física e do Esporte na Escola
- Especialização em Psicopedagogia

Campus Guaíra

- Especialização em Educação Especial: Formação Integrada
- Especialização em Psicopedagogia Clínica e Institucional

Campus Cascavel

- Especialização em História Regional: Olhares Sobre o Paraná
- Especialização em Língua Inglesa com Ênfase em TESOL
- Especialização em Língua Portuguesa e Literatura Brasileira

Campus Francisco Beltrão

- Especialização em História do Brasil



QUEM PENSA FAZ.

www.unipar.br