

LEITE, KR¹; ANDRADE², JB; CHEN CHEN³, L. Avaliação da atividade mutagênica do *Ginkgo biloba* L. pelo teste do micronúcleo em camundongos In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 2., Depto. de Biologia Geral- ICB, UFG, Goiânia, GO, Brasil.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DO *GINKGO BILOBA* L. PELO TESTE DO MICRONÚCLEO EM CAMUNDONGOS

LEITE, KR¹; ANDRADE, LS²; CHEN CHEN³, L.

Palavras-chaves: *Ginkgo biloba* (EGb 761), mutagenicidade, micronúcleos.

1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

Ginkgo biloba (Ginkgoaceae) é uma árvore de origem chinesa que tem sido extensivamente cultivada na Europa, Austrália, Japão, Coreia e Estados Unidos (Kunitomo *et al.*, 2002). Seu uso medicinal pode ser remontado há 5000 anos, na tradicional medicina chinesa. O extrato padronizado derivado desta planta, denominado Extrato de *Ginkgo biloba* (EGb 761), é atualmente o fitoterápico mais receitado na Inglaterra e França para o tratamento de insuficiência cerebral e doenças vasculares, embora muitos estudos sugiram que pode ser capaz de atuar também na cognição, memória, ansiedade e regulação gênica (Auclair *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005).

Com a finalidade de avaliar o potencial mutagênico do extrato de folhas de *G. biloba*, foi realizado no presente trabalho o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos. A citotoxicidade também foi avaliada pela razão entre eritrócitos policromáticos/ normocromáticos (EPC/ENC).

2- MATERIAL E MÉTODO

2.1-Camundongos

Foram utilizados animais machos *Mus musculus* outbred linhagem (Swiss Webster), obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás, pesando entre 30 e 40 g e faixa etária entre 8 a 12 semanas. Os animais foram aclimatizados por cinco dias antes do experimento para o Laboratório de Radiobiologia de Microrganismos e Mutagênese, onde foram mantidos em gaiolas de plásticos de dimensão de 40x30x16 cm, forradas com serragem trocada diariamente. O ambiente foi controlado em temperatura de 25° ± 2° C com claridade luminosa diurna e alimentados com ração comercial apropriada e água natural *ad libitum*.

2.2- Drogas e Reagentes

Mitomicina C – C₁₅H₁₈N₄O₅ (Bristol-Myers Squibb)

Ciclofosfamida – C₇H₁₅C₁₂N₂O₂P (Genuxal – Asta Médica)

Giemsa (Doles)

Metanol P.A. – CH₄O (Ecibral)

Soro fetal bovino inativado/estéril (Nutricell)

Fosfato de sódio dibásico – Na₂HPO₄·H₂O (Merck)

Fosfato de sódio monobásico – NaH₂PO₄·H₂O (Merck)

2.3-Procedimentos Experimental

Grupos de 5 animais foram tratados, via gavagem, com doses de 50 mg/Kg, 100 mg/Kg e 200 mg/Kg de EGb 761. No controle negativo foi utilizado água destilada esterilizada e no positivo 4mg/kg de MMC, administrada em grupo de 5 animais. Decorridas 24hs após o tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento

cervical e tiveram ambos os fêmures retirados. As epífises dos fêmures foram então cortadas, e a medula óssea aspirada com 1mL de soro bovino fetal (SBF). Após completa homogeneização e centrifugação destes (300xg por 5 minutos), o sobrenadante foi parcialmente descartado, e o precipitado de células homogeneizado com pipeta Pasteur. Uma gota de suspensão celular foi transferida para uma lâmina de vidro, onde foi feito o esfregaço. Após secagem das lâminas, estas foram fixadas em Metanol absoluto durante 5 minutos e coradas em corante Giemsa por 15 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente e secadas per noite. Para cada animal foram confeccionadas 4 lâminas, das quais duas foram utilizadas na contagem.

2.4- Análise citogenética

A análise das lâminas foi realizada em microscópio de luz modelo Olympus BH-2. Para avaliação da atividade mutagênica do extrato foram analisados micronúcleos de eritrócitos policromáticos analisando-se 2000 EPC. Para determinação da atividade citotóxica, foram computados 2000 EPC e determinada simultaneamente freqüência de ENC. As células são visualizadas em objetiva de imersão (1000x), utilizando-se duas lâminas para cada animal, conforme Schmid (1975).

2.5-Análise estatística

Na análise da atividade mutagênica da plana, os resultados da freqüência da EPCMN induzidos com diferentes doses do extrato do EGb 761 foram comparados com o do grupo controle negativo (H₂O destilada) pelo t-Student, considerando como significativos valores de P<0,05. Na avaliação da citotoxicidade da planta, a relação EPC/ENC com diferentes doses do extrato foi comparada com a do grupo controle negativo utilizando-se um teste qui-quadrado. Foram considerandos significativos os valores de P<0,05.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

Tab. 1. Efeito da administração de EGb761 e controles em medula óssea de camundongos.

Tratamento	Eritrócitos policromáticos micronucleados			EPC/ENC	
	Dados Individuais ^a	No.	%	$\bar{x} \pm s$	
MMC i.p.	30, 36, 31, 42, 33	172	8,60	$34,4 \pm 4,82^b$	$0,483 \pm 0,110^c$
Água p.o.	8, 5, 9, 4, 7	33	1,65	$6,6 \pm 2,07$	$0,980 \pm 0,233$
50 mg/Kg p.o.	9, 9, 5, 8, 7	38	1,90	$7,6 \pm 1,67$	$1,120 \pm 0,073$
100 mg/Kg p.o.	8, 6, 8, 8, 4	34	1,70	$6,8 \pm 1,78$	$0,971 \pm 0,125$
200 mg/Kg p.o.	3, 9, 7, 8, 7	34	1,70	$6,8 \pm 2,28$	$0,987 \pm 0,254$

^a Em 2000 eritrócitos policromáticos por animal.

^b Estatisticamente diferente do controle negativo (água destilada) pelo teste t-student. *P < 0,05.

^c Estatisticamente diferente do controle negativo (água destilada) pelo teste qui-quadrado. *P < 0,05.

A avaliação da atividade mutagênica do EGB 761 foi realizada, no presente trabalho, pelo teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos *Mus musculus*. Este teste é capaz de detectar quebras de cromossomos ou perda de cromossomos inteiros, que irão caracterizar o micronúcleo na célula eritrocitária (anucleada)

Pela tabela, pôde-se verificar que os resultados obtidos na dose de 50 mg do EGb 761 apresentaram uma média de 6,8 EPCMC/2000. Pôde-se observar que com essa dose a quantidade de EPCMN obtida foi similar à encontrada no controle negativo de água destilada (6,8 EPCMN/2000). Do mesmo modo, nas doses de 100mg/kg e 200mg/Kg encontrou-se, respectivamente, médias de 6,6 EPCMN e 7,6 EPCMN.

Estes resultados não demonstraram uma diferença significativa ($P>0,05$) da média de EPCMN/2000 em relação ao controle negativo (H_2O destilada) ($x = 6,8$). Assim, pôde-se demonstrar que o EGb 761 não apresentou ação genotóxica nas doses utilizadas.

Sabe-se que a relação entre EPC e ENC pode indicar a toxicidade de uma substância no ensaio. A razão entre a frequência de EPC e ENC descreve quando a substituição dos EPC originados dos eritroblastos é deprimida. Pelos resultados obtidos, verificou-se que não houve um decréscimo estatisticamente significativo da relação EPC/ENC quando comparado ao controle negativo em todas as doses ($P>0,05$). Assim, foi demonstrado que o extrato do EGb 761 não exibiu atividade tóxica em todas as doses utilizadas.

4. CONCLUSÃO / COMENTÁRIOS FINAIS

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que o EGb-761 não exibiu atividade mutagênica e citotóxica em medula óssea de camundongos nas condições experimentais executadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUCLAIR, K., GAUDINEAU, C., BECKERMAN, R., WELBOURN, S., and Inhibition of human P450 enzymes by multiple constituents of the Ginkgo biloba extract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 318, p. 1072–1078, 2004.

CHEN, B., CAI, J., SONG, S-S., WANG, X., CHEN, Z. Effects of ginkgo biloba extract on cation currents in rat ventricular myocytes. *Life Sciences*, v. 76, p. 1111–1121, 2005

KUNITOMO, M., SHINOZUKA, K., UMEGAKI, K., KUBOTA, Y., TANAKA, N., MIZUNO, H., YAMAUCHI, J., NAKAMURA, K., KUNITOMO, M. Feeding of Ginkgo biloba extract (GBE) enhances gene expression of hepatic cytochrome P-450 and attenuates the hypotensive effect of nicardipine in rats. *Life Sciences*, v.70, p.2783–2792, 2002.

SCHMID, W. 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res.*, 31: 9-15.

FONTE DE FINANCIAMENTO - CNPq, FUNAPE e UFG.

¹—Voluntário de iniciação científica. Instituto de Ciências Biológicas - DBG -UFG
Laboratório de Radiobiologia de Microrganismos e Mutagênese,
kaiosmv@yahoo.com.br

²—Mestranda

³—Orientadora /Instituto de Ciências Biológicas /DBG -UFG, chenlee@icb.ufg.br