

CENTRO UNIVERSITÁRIO DO CERRADO
PATROCÍNIO
Graduação em Ciências Biológicas

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE CARCINOGENICA DO
ANTIBIÓTICO AMOXICILINA TRIHIDRATADA 50%, PELO TESTE
DE DETECÇÃO DE TUMOR EPITELIAL EM *Drosophila melanogaster*

Samanta Pereira

PATROCÍNIO – MG
2017

SAMANTA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE CARCINOGENÉTICA DO
ANTIBIÓTICO AMOXICILINA TRIHIDRATADA 50%, PELO TESTE
DE DETECÇÃO DE TUMOR EPITELIAL EM *Drosophila melanogaster***

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como exigência parcial para obtenção do grau
de Bacharelado em Ciências Biológicas, pelo
Centro Universitário do Cerrado Patrocínio.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Lilian Cristina
Barbosa.

**PATROCÍNIO
2017**



Centro Universitário do Cerrado Patrocínio
Curso de Graduação em Ciências Biológicas

Trabalho de conclusão de curso intitulado “*Avaliação da capacidade carcinogênica do antibiótico amoxicilina trihidratada 50%, pelo teste de detecção de tumor epitelial em Drosophila melanogaster*”, de autoria da graduanda Samanta Pereira, aprovada pela banca examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof.ª Dra. Lillian Cristina Barbosa.

Instituição: UNICERP

Prof. Ms. Francielle Aparecida de Sousa

Instituição: UNICERP

Prof. Esp. Bruno Pereira Diniz

Instituição: UNICERP

Data de aprovação: 22/11/2017

Patrocínio, 22 de Novembro de 2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus por ter me dado forças para seguir meus sonhos e enfrentar cada batalha que surgiu ao longo dessa jornada. Agradecer por ter me dado esperanças quando pensei em desistir.

Aos meus pais e familiares que me apoiaram na decisão de realizar uma graduação e acreditaram no meu potencial.

Quero agradecer também a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Lilian Cristina Barbosa, por ter estado ao meu lado em cada decisão tomada nesse trabalho, por ter me auxiliado no seu desenvolvimento e por me dado a oportunidade de realizar um trabalho de grande importância para o meio científico.

Aos meus companheiros de projeto, Prof^a. Ms. Francielle Aparecida de Sousa que nos auxiliou na aquisição dos materiais e no desenvolvimento do trabalho, as alunas do curso de Medicina Veterinária Lavínia Sales Maranhão e Francielli Lara Machado, que estavam presentes na realização da pesquisa.

Agradeço também a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização dessa pesquisa.

RESUMO

Introdução: Atualmente, a exigência dos consumidores, principalmente externos, quanto à qualidade da carne, tem motivado os suinocultores a investirem geneticamente na qualidade dos animais, no manejo alimentar e em programas de controle de enfermidades, principalmente infecções bacterianas. Na suinocultura moderna, estas infecções têm gerado grande impacto para indústria de suínos em todo o mundo, decorrente da escala de ocorrência crescente e por serem frequentemente observadas em diferentes faixas etárias. No entanto tem sido um desafio o uso de medicamentos veterinários nos programas de saúde desses animais, para prevenção ou tratamento de patógenos. O uso exacerbado e o não cumprimento do período de carência de alguns destes, tem gerado a perda de ação, devido ao surgimento na população de resistência à ação química e problemas de segurança nos alimentos de origem animal (carne). **Objetivo:** Diante do exposto, esse estudo teve como objetivo avaliar a capacidade carcinogênica de doses subletais da Amoxicilina trihidratada 50% (Bactrosina®) de uso veterinário pelo teste de detecção de clones de tumor (*Warts*) em *Drosophila melanogaster*. Ensaio de sobrevivência foi realizado para determinar as concentrações subletais. **Material e métodos:** Larvas de *D. melanogaster* de 3º estágio, descendentes do cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3, Sb¹* e machos *mwh/mwh* foram expostas a concentrações do composto ($2,5 \cdot 10^{-11}$ ng/mL, $5,0 \cdot 10^{-11}$ ng/mL, $1,0 \cdot 10^{-10}$ ng/mL, $2,0 \cdot 10^{-10}$ ng/mL e $4,0 \cdot 10^{-10}$ ng/mL) homogeneizadas em meio de cultura a base de banana. Após tratamento, foram submetidas à avaliação dos diversos compartimentos (olhos, cabeça, asas, corpo, pernas e halteres). **Resultados:** Em resenha dos resultados obtidos com o teste *wts*, onde foi analisado a detecção de tumor epitelial em células somáticas de *D. melanogaster*, em observação da frequência do aparecimento de tumor em várias partes do corpo das moscas, foi evidenciado um resultado negativo para ação carcinogênica. **Conclusão:** Conclui-se que a Amoxicilina trihidratada 50% apresentou um efeito negativo no aparecimento e desenvolvimento do câncer nas condições experimentais utilizadas. Esses estudos são muito importantes para garantir o uso seguro da amoxicilina de grande relevância na clínica e terapêutica veterinária.

Palavras-chave: Amoxicilina; carcinogenicidade; *Drosophila melanogaster*; suínos; tumor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fenótipo dos pelos (setas) no corpo da mosca das diferentes progênies.....	18
Figura 2 - Taxa de sobrevivência da progênie resultante do cruzamento <i>mwh/mwh</i> x <i>wts/TM3, Sb¹</i> . Água - Controle negativo (CN); Mitomicina C (MMC)- 33 µg/mL Controle positivo (CP).....	22

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Frequência de tumor epitelial observados em descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor <i>wts</i> de <i>D. melanogaster</i> tratados com diferentes concentrações de Amoxilina (AM) e Mitomicina-C (MMC)	21
--	----

LISTA DE SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
RA	Renite atrófica
IU	Infecção urinária
INCA	Instituto Nacional de Câncer
WTS	Warts
MWH	Multiple wing hairs
S.A.	Sociedade anônima
LTDA	Limitada
SP	São Paulo
MG	Minas Gerais
MMC	Mitomicina C
B.O.D	Biochemical <i>Oxygen Demand</i>
FUCAMP	Fundação Carmelitana Mário Palmério
AM	Amoxicilina
CN	Controle Negativo

LISTA DE SÍMBOLOS

% Porcentagem

°C Graus Celsius

ml Mililitro

kg Quilograma

g Grama

q.s.p Quantidade suficiente para

1° Primeiro (a)

2° Segundo (a)

3° Terceiro (a)

h Horas

cm Centímetros

mM Milímetros

± Mais ou menos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 ARTIGO CIENTÍFICO	14
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
5 CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
ANEXO	32

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura nos últimos anos teve um grande ganho de produtividade, porém tem enfrentado enfermidades e problemas sanitários, que demandam o uso constante de medicamentos. Para que a suinocultura mantenha-se eficiente e competitiva, deve estar alicerçada, sobretudo em três pontos importantes: genética dos animais, disponibilidade de alimentos de qualidade nutricional e estratégias de controle direcionadas ao sistema produtivo como um todo (manejo sanitário estruturado).

Atualmente, a exigência dos consumidores, principalmente externos, quanto à qualidade da carne, tem motivado os suinocultores a investirem geneticamente na qualidade dos animais, no manejo alimentar e em programas de controle de enfermidades, principalmente infecções bacterianas entéricas. Na suinocultura moderna, estas infecções têm gerado grande impacto para indústria de suínos em todo o mundo, decorrente da escala de ocorrência crescente e por serem frequentemente observadas em diferentes faixas etárias (JACOBSON et al., 2005), sendo responsáveis pelas prejuízos econômicos que aproximam de 30% (BURCH, 2000).

Na cadeia produtiva de alimentos, na atual conjuntura, revela o grande interesse dos consumidores quanto à qualidade e a segurança alimentar dos produtos consumidos. Nos produtos de origem animal, nota-se o risco potencial à saúde humana decorrente da presença de contaminação química (resíduos de medicamentos veterinários), o que tem levado os países a estabelecerem normas rígidas que garantam a produção e o consumo de alimentos inócuos. Na tentativa de fornecer melhorias para os animais, toda substância química, biológica, biotecnológica ou preparação manufaturada utilizada com finalidade de prevenção de doenças dos animais, assim como diagnóstico, tratamento e cura, define os produtos veterinário. Lembrando que o uso correto do (s) medicamento (s) deve seguir orientações de um Médico Veterinário, devidamente habilitado para diagnosticar tal patologia e instituir o tratamento correto. O tratamento será eficaz, quando for adotada a correta administração do fármaco, seguindo a dosagem e a duração necessária (FERNANDES et al., 2013).

Segundo Farina e Filho (2010), as penicilinas foram os primeiros antimicrobianos usados na terapêutica; de origem natural ou sintética, são amplamente utilizadas para maioria das infecções. São bactericidas e interferem na síntese da parede celular bacteriana. No

organismo animal, apresenta distribuição ampla, porém com baixa penetração no sistema nervoso central, exceto quando o paciente apresenta um quadro de meningite. Geralmente são bem toleradas; os efeitos adversos mais importantes são as reações de hipersensibilidade. Amoxicilina é um medicamento derivado da ampicilina, que ao ser administrado por via oral, favorece maiores concentrações séricas e teciduais, por favorecer sua absorção.

Os benefícios do uso de fármacos de uso veterinário têm sido usados no controle sanitário e de enfermidades que afetam o rebanho mundial. O controle de infecções é de suma importância, pois melhora o desempenho corpóreo dos animais. Porém, o uso desenfreado de antibióticos, tem sido considerado fator de risco tanto para o meio ambiente quanto para os animais, decorrente da contaminação de recursos hídricos e da resistência de alguns microrganismos aos princípios ativos destes fármacos, por alterações no seu material genético (BILA, 2003).

Segundo a literatura muitas substâncias podem atuar com a molécula de DNA induzindo danos na molécula, levando ao descontrole do ciclo celular, induzindo assim o surgimento do câncer, definido como um conjunto de doenças que apresentam o aspecto em comum de crescimento desordenado, que desencadeia na formação de uma massa de células denominada neoplasia ou tumor (ALVES, 2012).

NEVES (2002) declara que o câncer apresenta uma etiologia muito complicada e sabe-se que diversos aspectos estão associados ao desenvolvimento da grande parte dos tumores malignos. O câncer provém de mutações genéticas onde as células passam a adquirir capacidades especiais, como descontrole na reprodução celular, evasão de apoptose, invasão de outros tecidos e angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) (MARTINEZ et al., 2006).

Os proto-oncogênes e os genes supressores de tumor são de modo abrangente os principais grupos de genes causadores de modificações genéticas relacionadas ao aparecimento de um tumor (BRASIL, 2004). Quando acontecem mutações os proto-oncogênes se tornam oncogênes, que são carcinógenos e atuam na reprodução celular intesa. Os genes supressores de tumor irão ficar inertes por meio da mutação, o que acarretará na perda da sua funcionalidade deixando a célula ausente de proteção para a prevenção do desenvolvimento inapropriado de tais células (RIVOIRE, 2001).

Diante do exposto estudos que visem elucidar o mecanismo de ação de compostos que podem alterar o ciclo celular, levando ao surgimento do câncer é de extrema importância.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade carcinogênica de doses subletais de Amoxicilina (Bactrosina[®]) de uso veterinário pelo teste de detecção de clones de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de medicamentos veterinários na sobrevivência da mosca *Drosophila melanogaster*.
- Avaliar a frequência de tumor nos diversos compartimentos da mosca (olhos, cabeça, asas, corpo, pernas e halteres), expostas à diferentes concentrações de medicamentos veterinários, comparando os dados com moscas expostas ao controle negativo (água ultrapura).
- Inferir dados sobre o comportamento da molécula no organismo

3 ARTIGO CIENTÍFICO

AValiação DA CAPACIDADE CARCINOgênICA DO ANTIBIÓTIco AMOXICILINA TRIHIDRATADA 50%, PELO TESTE DE DETECÇÃO DE TUMOR EPITELIAL EM *Drosophila melanogaster*

FRANCIELLE APARECIDA DE SOUSA¹
FRANCIELLI LARA MACHADO²
LAVÍNIA SALES MARANHO³
LILIAN CRISTINA BARBOSA⁴
SAMANTA PEREIRA⁵

RESUMO

Introdução: Atualmente, a exigência dos consumidores, principalmente externos, quanto à qualidade da carne, tem motivado os suinocultores a investirem geneticamente na qualidade dos animais, no manejo alimentar e em programas de controle de enfermidades, principalmente infecções bacterianas. Na suinocultura moderna, estas infecções têm gerado grande impacto para indústria de suínos em todo o mundo, decorrente da escala de ocorrência crescente e por serem frequentemente observadas em diferentes faixas etárias. No entanto tem sido um desafio o uso de medicamentos veterinários nos programas de saúde desses animais, para prevenção ou tratamento de patógenos. O uso exacerbado e o não cumprimento do período de carência de alguns destes, tem gerado a perda de ação, devido ao surgimento na população de resistência à ação química e problemas de segurança nos alimentos de origem animal (carne). **Objetivo:** Diante do exposto, esse estudo teve como objetivo avaliar a capacidade carcinogênica de doses subletais da Amoxicilina trihidratada 50% (Bactrosina®) de uso veterinário pelo teste de detecção de clones de tumor (*Warts*) em *Drosophila melanogaster*. Ensaio de sobrevivência foi realizado para determinar as concentrações subletais. **Material e métodos:** Larvas de *D. melanogaster* de 3º estágio, descendentes do cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3, Sb*¹ e machos *mwh/mwh* foram expostas a concentrações do composto (2,5. 10⁻¹¹ ng/mL, 5,0. 10⁻¹¹ ng/mL, 1,0. 10⁻¹⁰ ng/mL, 2,0. 10⁻¹⁰ ng/mL e 4,0. 10⁻¹⁰ ng/mL) homogeneizadas em meio de cultura a base de banana. Após tratamento, foram submetidas à avaliação dos diversos compartimentos (olhos, cabeça, asas, corpo, pernas e halteres). **Resultados:** Em resenha dos resultados obtidos com o teste *wts*, onde foi analisado a detecção de tumor epitelial em células somáticas de *D. melanogaster*, em observação da frequência do aparecimento de tumor em várias partes do corpo das moscas, foi evidenciado um resultado negativo para ação carcinogênica. **Conclusão:** Conclui-se que a

¹ Professora UNICERP. Mestre e docente do Curso de Medicina Veterinária e Agronomia do UNICERP: francielle@unicerp.edu.br;

² Discente do curso de Medicina Veterinária do UNICERP;

³ Discente do curso de Medicina Veterinária do UNICERP;

⁴ Professora orientadora. Doutora e docente do Curso de Ciências Biológicas, Medicina Veterinária e outros cursos de graduação do UNICERP: lilian@unicerp.edu.br.

⁵ Discente do curso de Ciências Biológicas do UNICERP;

Amoxicilina trihidratada 50% apresentou um efeito negativo no aparecimento e desenvolvimento do câncer nas condições experimentais utilizadas. Esses estudos são muito importantes para garantir o uso seguro da amoxicilina de grande relevância na clínica e terapêutica veterinária.

Palavras-chave: Amoxicilina; carcinogenicidade; *Drosophila melanogaster*; suínos; tumor.

ABSTRACT

Introduction: Consumers' demands, especially on the quality of meat, have motivated swine farmers to invest genetically in animal quality, in food management and in disease control programs, mainly bacterial infections. In modern pig farming, these infections have had a major impact on the pig industry around the world, due to the increasing scale of occurrence and because they are frequently observed in different age groups. However, the use of veterinary drugs in the health programs of these animals for the prevention or treatment of pathogens has been a challenge. The exacerbated use and failure to comply with the lack of some of these, has generated loss of action, due to the appearance in the population of resistance to chemical action and safety problems in animal foods (meat). **Objective:** In view of the above, this study aimed to evaluate the carcinogenic capacity of sublethal doses of 50% Amoxicillin trihydrate (Bactrosina®) for veterinary use by the test of tumor clones (Warts) in *Drosophila melanogaster*. Survival assay was performed to determine sublethal concentrations. **Material and methods:** 3rd stage *D. melanogaster* larvae, offspring of the cross between virgin wts / TM3, sb1 males and mwh / mwh males were exposed to concentrations of the compound ($2,5 \cdot 10^{-11}$ ng/mL, $5,0 \cdot 10^{-11}$ ng/mL, $1,0 \cdot 10^{-10}$ ng/mL, $2,0 \cdot 10^{-10}$ ng/mL e $4,0 \cdot 10^{-10}$ ng/mL) homogenized in banana-based culture medium. After treatment, the various compartments (eyes, head, wings, body, legs and dumbbells) were evaluated. **Results:** In a review of the results obtained with the wts test, where the detection of epithelial tumor in somatic cells of *D. melanogaster* was analyzed, a negative result was observed for the presence of tumor in several parts of the body of the flies. carcinogenic action. **Conclusion:** It was concluded that 50% Amoxiciline trihydrate presented a negative effect on the appearance and development of cancer in the experimental conditions used. These studies are very important to ensure the safe use of amoxicillin of great relevance in clinical and veterinary therapy.

Keywords: Amoxicillin; carcinogenicity; *Drosophila melanogaster*; swine; tumor.

INTRODUÇÃO

Os benefícios do uso de fármacos de uso veterinário têm sido usados no controle sanitário e de enfermidades que afetam o rebanho mundial. O controle de infecções é de suma importância, pois melhora o desempenho corpóreo dos animais. Porém, o uso desenfreado de

antibióticos, tem sido considerado fator de risco tanto para o meio ambiente quanto para os animais, decorrente da contaminação de recursos hídricos e da resistência de alguns microrganismos aos princípios ativos destes fármacos, por alterações no seu material genético (BILA, 2003).

Em suínos, a amoxicilina trihidratada (Bactrosina[®]) é especialmente indicada para o tratamento das seguintes infecções, causadas por microrganismos sensíveis ao princípio ativo: meningite estreptocócica; doenças respiratórias e entéricas; rinite atrófica; pleuropneumonia; metrites e infecções gênero-urinárias; infecções da pele; mastites; piobacilose; actinomicose; artrites e infecções das articulações; poliartrite e ruiva ou erisipela suína. E seu período de carência para carnes é de 18 dias (BAYER, 2016).

O composto em estudo (Bactrosina[®]) é um antibiótico de largo espectro, que em função das características físico-químicas, por levar mais tempo para ser metabolizado pelo mecanismo de desintoxicação, tendo uma maior chance de interagir direta ou indiretamente com o material genético, inferindo uma frequência de mutações acima do normal, resultando no surgimento de células neoplásicas, já que o DNA de um organismo exposto a agentes naturais ou artificiais pode apresentar modificações na sua estrutura ou composição química.

A *Drosophila melanogaster*, conhecida popularmente como mosca das frutas é um organismo eucarionte, da ordem Díptera, largamente utilizado pelos pesquisadores, por ser de fácil manutenção em laboratório, ter um ciclo reprodutivo curto, fornecer um grande número de indivíduos por progênie e apresentar reações metabólicas semelhantes às dos mamíferos, o que permite certo grau de extrapolação para humanos (GRAF, 2006). Além dessas características, apresenta um excelente banco de informações sobre mutações, ecologia e comportamento (FONSECA; PEREIRA, 2004) apud (ORSOLIN e NEPOMUCENO, 2009).

O homem, em sua vida moderna, mantém uma constante interação com agentes químicos, físicos e biológicos. Para tanto, surge à necessidade de se testar agentes químicos, sintéticos e naturais, que estão em grande número em nosso meio ambiente, quanto a possíveis efeitos carcinogênicos e/ou mutagênicos. Agentes químicos ambientais são importantes fatores tanto em termos de desenvolvimento como de prevenção do câncer. Nesse contexto, a avaliação do potencial carcinogênico da amoxicilina torna-se importante visto que se trata de fármaco amplamente utilizado.

Levando-se em consideração tais aspectos este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade carcinogênica de doses subletais de produtos formulados de uso veterinário pelo teste de detecção de clones de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*.

MATERIAI E MÉTODOS

Agentes químicos e meio de cultura

Amoxicilina (Bactrosina[®]) (CAS 61336-70-7) da marca Bayer, localizada em São Paulo (SP), Brasil. O produto comercializado contém 17,22g de amoxicilina trihidratada/100ml.

Mitomomicina C (CAS 50-07-7) na formulação em pó liofilizado foi fabricado por Kyowa Hakko Kirin Co. Ltda. Shizuoka (Japão), embalado por Bristol-Myers Squibb S.r.l Sermoneta-Latina-Itália e importado por Bristol-Myers Squibb Farmacêutica S.A.

Teste de detecção de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*

Linhagens de *Drosophila melanogaster*

Para desenvolvimento do teste de detecção de tumor epitelial, foram utilizadas duas linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*: linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e linhagem *warts* (*wts*,3-100).

1) Linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3): mantida em homozigose recessiva para o marcador *mwh*, que se encontra localizado no cromossomo 3, na posição distal ao centrômero (*mwh*, 3-0,3). Quando expresso em homozigose recessiva o gene *mwh*, apresenta fenótipo de pelos múltiplos nas asas da mosca, diferente do fenótipo selvagem (um único pelo por célula).

2) Linhagem *warts* (*wts*,3-100): possui o marcador *wts* no cromossomo 3, que é conservado em homozigose na presença do balanceador cromossômico TM3, Sb¹. O marcador *wts*, quando expresso em condição selvagem, atua como um gene supressor de tumor.

Essas linhagens foram mantidas em estoque, em frascos contendo ¼ litro contendo meio de cultura a base de banana (1230 mL de água; 16,5 g de ágar; 234 g de banana; 37,5 g de fermento biológico e 1,5 g de nipagin em pó) em estufa B.O.D (SOLAB) em ciclos luz/escuro (12h:12h) na temperatura de 25 ± 2°C e 65 ± 5% de umidade relativa.

Cruzamento

O cruzamento foi realizado entre machos *mwh/mwh* e fêmeas virgens da linhagem *wts*. Serão geradas duas progênes desse cruzamento: a progênie MH, trans-heterozigoto marcado (*mwh+/+wts*) e a progênie BH, heterozigoto balanceado (*mwh+/+TM3, Sb¹*). No Teste de Detecção de Tumor epitelial (teste *wts*), apenas a progênie MH é analisada. A identificação é feita mediante a expressão do balanceador cromossômico TM3, Sb¹, aos quais as moscas apresentam fenotipicamente pelos curtos e espessos no seu corpo, sendo assim diferente da progênie MH, que apresenta fenótipo de pelos longos e finos, conforme **Figura 1**.



Figura 1: Fenótipo dos pelos (setas) no corpo da mosca das diferentes progênes.

Fonte: Cortesia do Laboratório de Genética (LABGEN) da Universidade Federal de Uberlândia (2015).

Tratamento

A coleta de ovos do cruzamento *mwh+/+mwh* x *wts+/TM3, Sb¹* ocorreu durante um período de 8 horas em frascos contendo meio de cultura a base de ágar (4%) e fermento biológico suplementado com sacarose. Após 72 ± 4 horas, as larvas de 3º estágio foram lavadas com água ultrapura MiliQ (Millipore) e coletadas com auxílio de peneira de malha fina. Em seguida as larvas foram mantidas em tratamento crônico (48 horas) até completar o processo da metamorfose. As larvas foram colocadas em *vials* (2,5 cm de diâmetro por 8 cm

de comprimento) contendo 1,5 g de purê de batatas (Yoki® Alimentos S.A) e 5 mL de solução de Amoxicilina (Bactrosina®) (CAS 61336-70-7) nas concentrações de $2,5 \cdot 10^{-11}$ ng/mL, $5,0 \cdot 10^{-11}$ ng/mL, $1,0 \cdot 10^{-10}$ ng/mL, $2,0 \cdot 10^{-10}$ ng/mL e $4,0 \cdot 10^{-10}$ ng/mL.

O teste *wts* foi acompanhado de controle negativo, água ultrapura e controle positivo, mitomicina C (MMC) na concentração de 0,1 mM. Esta concentração foi baseada em estudos de recombinação mitótica em *Drosophila melanogaster* (TSUDA e TAKEDA, 1987) e ensaios de carcinogênese (ORSOLIN e NEPOMUCENO, 2009; ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2012).

Análise do material biológico

Após o termino da metamorfose os adultos eclodidos do cruzamento *mwh+/-mwh* x *wts+/-TM3, Sb¹* foram fixados em etanol 70% (v/v) e posteriormente analisados sob lupa estereoscópica em placa de petri com glicerina, com auxílio de pinças entomológicas. Os resultados desta análise foram registrados em um diagrama padrão expressando os números de tumores observados em cada parte do corpo das moscas: cabeça, olhos, corpo, pernas, asas e halteres, separadamente para cada concentração testada.

Infraestrutura

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética da UNICERP, em parceria com Fundação Carmelitana Mário Palmério (FUCAMP), que disponibilizou alguns materiais necessários ao experimento.

Análise estatística

As diferenças estatísticas entre a frequência de tumores epiteliais nas concentrações testadas e os controles (negativo e positivo) foram calculadas usando o teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney, utilizando o nível de significância $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A **Tabela 1** mostra a frequência de clones de tumor por segmento da *Drosophila melanogaster* induzidos pela MMC e da Amoxicilina trihidratada 50% (Bactrosina®) em diferentes concentrações. Pode-se observar que o grupo controle negativo não apresentou frequência alta de tumores, conforme o esperado. Esta discreta indução de tumores observados no grupo tratado com água ocorre devido à predisposição genética do organismo teste.

Observa-se também que o grupo controle positivo, MMC, apresentou uma frequência alta de tumores em vários segmentos do corpo da *D. melanogaster* mostrando assim sua eficácia na indução de clones de tumores. Já o grupo tratamento AM nas suas diferentes concentrações apresentou frequência de tumores bem próxima ao grupo controle negativo. Os testes estatísticos mostram que houve uma diferença significativa dos grupos controle negativo e AM quando comparados ao grupo tratado com MMC. Esses dados sugerem a ausência do efeito carcinogênico da Amoxicilina.

Esses dados são muito importantes, pois mostrou o uso seguro da AM, nas condições experimentais utilizadas, uma vez que a AM é uma substância de grande relevância na clínica e terapêutica veterinária.

A **Figura 2** mostra a taxa de sobrevivência da progênie resultante do cruzamento *mwh/mwh* x *wts/TM3*.

Tabela 1. Frequência de tumor epitelial observados em descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor *wts* de *D. melanogaster* tratados com diferentes concentrações de Amoxicilina (AM) e Mitomicina-C (MMC)

Tratamento (mM)	Número de indivíduos	Número de tumores analisados (total de tumores)						
		Olhos	Cabeça	Asas	Corpo	Pernas	Halteres	Total
Controle negativo	150	0,003 (01)	0,000 (00)	0,020 (06)	0,096 (29)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,120 (36)
MMC 0,1	130	0,138 (18)*	0,115 (15)*	2,138 (278)*	0,823 (107)*	0,300 (39)*	0,046 (06)*	3,561 (463)*
AM 2,5.10 ⁻¹¹	150	0,000 (00)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,001 (15)*	0,000 (00)	0,000 (00)	0,001 (15)*
AM 5,0.10 ⁻¹¹	150	0,000 (00)	0,002 (03)	0,013 (02)*	0,153 (23)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,180 (27)
AM 1,0.10 ⁻¹⁰	150	0,000 (00)	0,000 (01)	0,000 (00)	0,266 (40)	0,000 (01)	0,000 (00)	0,280 (42)
AM 2,0.10 ⁻¹⁰	150	0,000 (00)	0,000 (00)	0,000 (01)	0,086 (13)*	0,046 (07)*	0,000 (00)	0,140 (21)*
AM 4,0. 10 ⁻¹⁰	150	0,000 (00)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,146 (22)	0,053 (08)	0,000 (00)	0,200 (30)

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância ($P \leq 0,05$).

* Valores considerados diferentes do controle negativo ($P \leq 0,05$). MMC, Mitomicina C; AM: Amoxicilina.

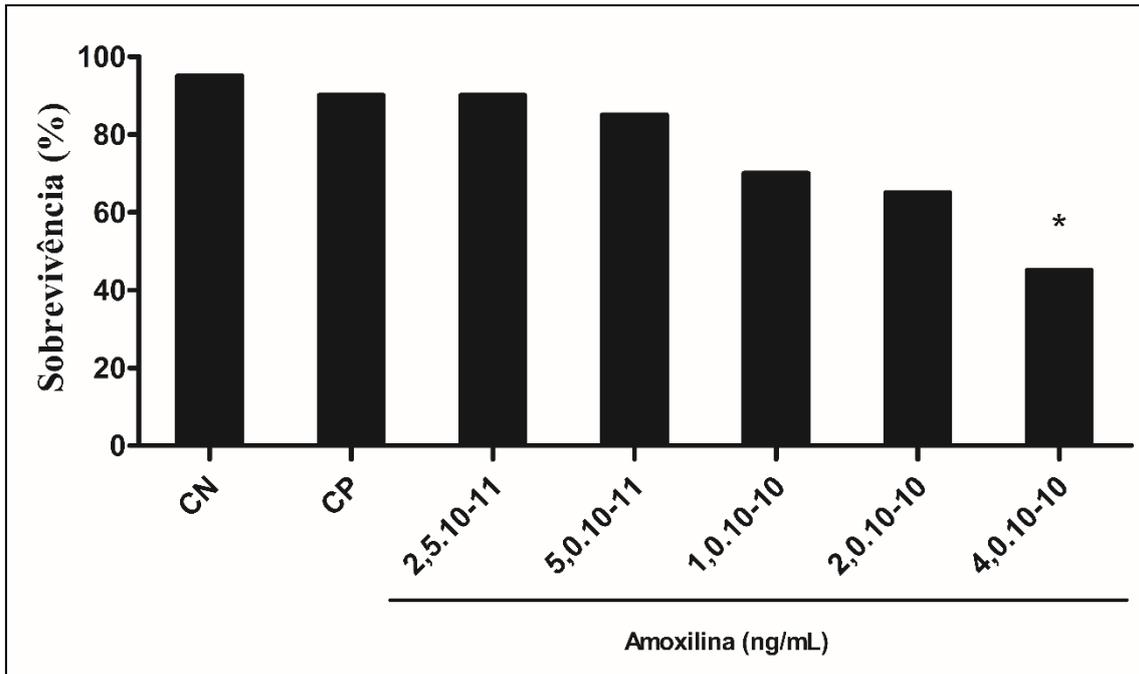


Figura 2: Taxa de sobrevivência da progênie resultante do cruzamento *mwh/mwh* x *wts/TM3*, Sb¹. Água - Controle negativo (CN); Mitomicina C (MMC)- 33 µg/mL Controle positivo (CP).

* Diferença estatisticamente significativa na sobrevivência de *Drosophila melanogaster* de acordo com o teste do Chi- quadrado para razões de amostras independentes.

A *Drosophila melanogaster* é considerada um eficiente organismo teste para avaliação de efeitos carcinogênicos e anticarcinogênicos, isso mediante a alta capacidade de detectar alterações nos genes de controle do ciclo de divisão celular e também por apresentar grande similaridade genômica com o ser humano (FARIA, 2006) apud (NEPOMUCENO E SILVA, 2011).

O composto em estudo (Bactrosina[®]) é um antibiótico de largo espectro, que em função das características físico-químicas, por levar mais tempo para ser metabolizado pelo mecanismo de desintoxicação, tendo uma maior chance de interagir direta ou indiretamente com o material genético, inferindo uma frequência de mutações acima do normal, resultando no surgimento de células neoplásicas, já que o DNA de um organismo exposto a agentes naturais ou artificiais pode apresentar modificações na sua estrutura ou composição química.

No entanto, o cenário mundial atual da produção de alimentos revela o grande interesse dos consumidores quanto à qualidade e a segurança do alimento a ser consumido. O potencial risco à saúde humana da presença de resíduos de medicamentos veterinários nos produtos de origem animal tem forçado os países a estabelecerem normas rígidas que garantam o consumo de alimentos seguros.

O DNA de um organismo é considerado uma molécula estática, decorrente da exposição de suas bases nitrogenadas a agentes naturais ou artificiais (agentes químicos, físicos ou biológicos), que estimula alterações de estrutura ou composição química, induzindo efeitos adversos às células. Isso decorrente da ação direta nos processos de replicação e transcrição gênica, além de induzirem possíveis mutações e aberrações cromossômicas, que resulta em processos cancerosos e morte celular (COSTA; MENK, 2000).

Logo, há algumas décadas, o estudo da genética tornou-se essencial para compreender a fisiopatogenia de doenças, visto que os conhecimentos genéticos fornecem base para a compreensão das funções biológicas celulares do organismo, controladas a partir da expressão de genes codificadores de proteínas e enzimas funcionais e para a compreensão da ação de produtos gênicos (LOURO et al., 2002).

Os proto-oncogênes e os genes supressores de tumor são de modo abrangente os principais grupos de genes causadores de modificações genéticas relacionadas ao aparecimento de um tumor (BRASIL, 2004). Quando acontecem mutações os proto-oncogênes se tornam oncogênes, que são carcinógenos e atuam na reprodução celular intensa. Os genes supressores de tumor irão ficar inertes por meio da mutação, o que acarretará na perda da sua funcionalidade deixando a célula ausente de proteção para a prevenção do desenvolvimento inapropriado de tais células (RIVOIRE, 2001).

A definição de câncer é um conjunto de doenças que apresentam o aspecto em comum de crescimento desordenado, que desencadeia na formação de uma massa de células denominada neoplasia ou tumor (ALVES, 2012).

NEVES (2002) declara que o câncer apresenta uma etiologia muito complicada e sabe-se que diversos aspectos estão associados ao desenvolvimento da grande parte dos tumores malignos. O câncer provém de mutações genéticas onde as células passam a adquirir capacidades especiais, como descontrole na reprodução celular, evasão de apoptose, invasão de outros tecidos e angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) (MARTINEZ et al., 2006).

No Brasil, os dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) mostram que para cada ano surgem novos casos de câncer, sendo essa patologia apontada como segunda causa de morte, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares.

Sendo assim estudos que visem elucidar o mecanismo dos tumores são de extrema importância.

Os dados desse trabalho mostraram que nas condições experimentais utilizadas a AM mostrou-se o uso seguro em relação à indução de tumores. No entanto, sabe-se que estudos

utilizando condições experimentais diferentes são de extrema importância para melhor elucidar os efeitos adversos dessa substância.

CONCLUSÕES

- Foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de medicamentos veterinários na sobrevivência da mosca *Drosophila melanogaster*.
- O grupo controle negativo e tratamento AM não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na frequência de clones de tumor por segmento da *Drosophila melanogaster*.
- O grupo controle negativo e tratamento AM apresentaram diferenças estatisticamente significativas na frequência de clones de tumor por segmento da *Drosophila melanogaster*, quando comparados como o controle positivo MMC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. M. Avaliação do efeito anticarcinogênico do látex do avelós (*Euphorbia tirucalli*), por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. **Revista PERQUIRÊRE**, Patos de Minas, v. 9, n. 2, p. 125-129, dez. 2012.

BAYER, Saúde Animal. **Bactrosina®**. Disponível em: <<https://saudeanimal.bayer.com.br/pt/bovinos/produtos/visualizar.php?codProduto=bactrosina>>. Acesso em: 08 abr 2017.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no Meio Ambiente. **Química nova**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Incidência, mortalidade e sobrevida do câncer da infância no município de São Paulo**. São Paulo, SP: Brasil, 2004.

BURCH, D. G. S. Controlling diarrhoea in growing pigs - the grey scour syndrome. **Pig Journal**, Inglaterra, v.45, p.131-149, 2000.

COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia: ciência e desenvolvimento**, São Paulo, v.3, n.12, 2000.

FARIA, M. I. **Efeito anticarcinogênico da graviola (*Annona muricata*) por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster***. 2006. Monografia de Graduação Curso de Ciências Biológicas, Centro Universitário de Patos de Minas, Patos de Minas, 2006.

FARINA, S. S.; FILHO, S. B. **Penicilinas**. Formulário Terapêutico Nacional, 2010. Disponível em: < <http://www.medicinanet.com.br/conteudos/conteudo/2622/penicilinas.htm>>. Acesso em: 02 abr 2017.

FERNANDES, M. A. M; MONTEIRO, A. L. G.; E SANTOS, C. D. **Uso responsável de medicamentos veterinários na produção animal - Parte I**. Disponível em: < <https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-e-caprinos/uso-responsavel-de-medicamentos-veterinarios-na-producao-animal-parte-i-82934n.aspx>>. Acesso em: 02 abr 2017.

FONSECA, C. A; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Informa**. Anápolis, v.16, n. 7-8, 2004.

GRAF, U. The Actual Situation of SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) in *D.melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v.6, n.2, 2006.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Incidência de câncer no Brasil Estimativa 2012**. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>>. Acesso em 02 abr 2017

JACOBSON, M. et al. The prevalences of *Brachyspira* spp. and *Lawsonia intracellularis* in Swedish piglet producing herds and wild boar population. **Journal of Veterinary Medicine**, Blackwell Verlag, Berlin, v.52, p.386-391, 2005.

LOURO, I. D; LLERENA Jr., J. C.; MELO, M. S. V.; ASHTON-PROLLA, P.; CNFORTI, N. F. **Genética Molecular do Câncer**. 2.ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

MARTINEZ, M. A. R et al. Molecular genetics of non-melanoma skin cancer. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 5, p. 405-419, 2006.

NEVES, F. J. **Mortalidade por câncer de cólon e reto e perfil de consumo alimentar em capitais brasileiras**. 2002. 125 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Mestrado em Saúde Pública). Fundação Oswaldo Cruz, São Paulo.

ORSOLIN, P. C.; NEPOMUCENO, J. C.. Potencial carcinogênico do açafrão (*Curcuma Longa L*) identificado por meio do teste para detecção de clones de tumor em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**. Patos de Minas, v. 6, p. 55-69, out. 2009.

ORSOLIN, P. C.; SILVA-OLIVEIRA, R. G.; NEPOMUCENO, J. C. Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**. 50,2598-2604,2012.

RIVOIRE, W. A et al. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 2, p. 179-84, 2001.

SILVA, L. M.; NEPOMUCENO, J. C. Efeito modulador da polpa da graviola (*Annona muricata*) sobre a carcinogenicidade da mitomicina C, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. **PERQUIRERE**. Patos de Minas, vol. 1, n. 8, p. 80-94, jul. 2011.

TSUDA, H.; TAKEDA, N. Effect of tumor promoter TPA on spontaneous and mitomycin C induced mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**. 189: 375-379, 1987.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A amoxicilina é um antibiótico muito utilizado no tratamento de várias infecções. Na medicina veterinária é amplamente utilizada em suínos. No entanto observa-se que de um modo geral os medicamentos utilizados para o tratamento de doenças, muitos deles não apresentam testes citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e ou carcinogênico antes de serem lançados no mercado.

Muitos deles podem induzir mutações que podem afetar genes necessários para a sobrevivência das células ou genes envolvidos no controle da multiplicação celular. Essa alteração pode levar a um descontrole na proliferação de células, com o consequente aparecimento de tumores.

Sendo assim, estudos que mostrem atividades genotóxicas, mutagênicas e ou carcinogênicas dos compostos, são de extrema importância. O uso de técnicas confiáveis e eficientes para esses estudos mostram de que maneira a molécula de DNA pode ser afetada. É preciso ressaltar que mesmo que um composto tenha eficácia comprovada, ele não pode comprometer a integridade da molécula de DNA.

Os resultados encontrados no presente trabalho mostraram que a AM não apresentou efeito indutor de tumores nos indivíduos utilizados, sugerindo que ela mantém a estabilidade do DNA nas condições experimentais utilizadas. Esses dados são de grande relevância, uma vez que a amoxicilina é muito utilizada tanto em humanos quanto na medicina veterinária. No entanto estudos adicionais para garantir o uso seguro pela população são ainda necessários.

5 CONCLUSÕES

- Foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de medicamentos veterinários na sobrevivência da mosca *Drosophila melanogaster*.
- O grupo controle negativo e tratamento AM não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na frequência de clones de tumor por segmento da *Drosophila melanogaster*.
- O grupo controle negativo e tratamento AM apresentaram diferenças estatisticamente significativas na frequência de clones de tumor por segmento da *Drosophila melanogaster*, quando comparados como o controle positivo MMC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. M. Avaliação do efeito anticarcinogênico do látex do avelós (*Euphorbia tirucalli*), por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. **Revista PERQUIRÊRE**, Patos de Minas, v. 9, n. 2, p. 125-129, dez. 2012.

BAYER, Saúde Animal. **Bactrosina®**. Disponível em: <<https://saudeanimal.bayer.com.br/pt/bovinos/produtos/visualizar.php?codProduto=bactrosina>>. Acesso em: 08 abr 2017.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no Meio Ambiente. **Química nova**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Incidência, mortalidade e sobrevida do câncer da infância no município de São Paulo**. São Paulo, SP: Brasil, 2004.

BURCH, D. G. S. Controlling diarrhoea in growing pigs - the grey scour syndrome. **Pig Journal**, Inglaterra, v.45, p.131-149, 2000.

COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia: ciência e desenvolvimento**, São Paulo, v.3, n.12, 2000.

FARIA, M. I. **Efeito anticarcinogênico da graviola (*Annona muricata*) por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster***. 2006. Monografia de Graduação Curso de Ciências Biológicas, Centro Universitário de Patos de Minas, Patos de Minas, 2006.

FARINA, S. S.; FILHO, S. B. **Penicilinas**. Formulário Terapêutico Nacional, 2010. Disponível em: <<http://www.medicinanet.com.br/conteudos/conteudo/2622/penicilinas.htm>>. Acesso em: 02 abr 2017.

FERNANDES, M. A. M; MONTEIRO, A. L. G.; E SANTOS, C. D. **Uso responsável de medicamentos veterinários na produção animal - Parte I**. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-e-caprinos/uso-responsavel-de->

medicamentos-veterinarios-na-producao-animal-parte-i-82934n.aspx>. Acesso em: 02 abr 2017.

FONSECA, C. A; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Informa**. Anápolis, v.16, n. 7-8, 2004.

GRAF, U. The Actual Situation of SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) in *D.melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v.6, n.2, 2006.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Incidência de câncer no Brasil Estimativa 2012**. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>>. Acesso em 02 abr 2017

JACOBSON, M. et al. The prevalences of *Brachyspira* spp. and *Lawsonia intracellularis* in Swedish piglet producing herds and wild boar population. **Journal of Veterinary Medicine**, Blackwell Verlag, Berlin, v.52, p.386-391, 2005.

LOURO, I. D; LLERENA Jr., J. C.; MELO, M. S. V.; ASHTON-PROLLA, P.; CNFORTI, N. F. **Genética Molecular do Câncer**. 2.ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

MARTINEZ, M. A. R et al. Molecular genetics of non-melanoma skin cancer. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 5, p. 405-419, 2006.

NEVES, F. J. **Mortalidade por câncer de cólon e reto e perfil de consumo alimentar em capitais brasileiras**. 2002. 125 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Mestrado em Saúde Pública). Fundação Oswaldo Cruz, São Paulo.

ORSOLIN, P. C.; NEPOMUCENO, J. C.. Potencial carcinogênico do açafrão (*Curcuma Longa L*) identificado por meio do teste para detecção de clones de tumor em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**. Patos de Minas, v. 6, p. 55-69, out. 2009.

ORSOLIN, P. C.; SILVA-OLIVEIRA, R. G.; NEPOMUCENO, J. C. Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**. 50,2598-2604,2012.

RIVOIRE, W. A et al. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 2, p. 179-84, 2001.

SILVA, L. M.; NEPOMUCENO, J. C. Efeito modulador da polpa da graviola (*Annona muricata*) sobre a carcinogenicidade da mitomicina C, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. **PERQUIRERE**. Patos de Minas, vol. 1, n. 8, p. 80-94, jul. 2011.

TSUDA, H.; TAKEDA, N. Effect of tumor promoter TPA on spontaneous and mitomycin C induced mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**. 189: 375-379, 1987.

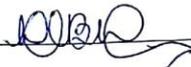
ANEXO

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DEPÓSITO DE TCC

Pelo presente termo eu, Lilion Cristina Barbosa,
 professor desta IES e orientador do TCC com título:
Análise da capacidade carcinogênica do anti-
 lítico amoxicilina trihidrato 50% pelo desenvolvido pelo
teste de detecção de tumor epitelial em *Urospila melanogaster*
 discente Janata Pereira

_____ AUTORIZO o depósito do TCC por ele desenvolvido e por mim
 orientado, por entender que o mesmo encontra-se apto e em condições de submissão à
 Banca Pública de Apresentação e Defesa de TCC.

Patrocínio, 22 de Novembro de 20 17.



Professor Orientado