Mary Massumi Itoyama

Efeito da Cafeína Sobre Aspectos Reprodutivos e, em Associação com o Íon Estanoso, Sobre a Produtividade em Drosophila Prosaltans

1910000607

Mary Massumi Itoyama

Efeito da cafeína sobre aspectos reprodutivos e, em associação com o íon estanoso, sobre a produtividade em Drosophila prosaltans

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências, no curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

607/93

São José do Rio Preto

1992

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Orientadora:

Profª. Drª. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

unesp

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Á CLEIDE MARTINEZ DE ABREU

Pela incansável transmissão de paz, amor e harmonia.

Pela convivência agradável, sempre com disposição inegualável, tornando o ambiente o mais agradável e cheio de calor humano.

Pela atenção e constante disponibilidade, a qualquer hora, em qualquer momento, em qualquer situação: de alegria, de tristeza, de sobrecarga.

Pela eficiência, perfeição em tudo que tocava.

Pela concessão de muitos pedidos, sendo qual fosse, do mais simples ao mais complicado, do seu alcance ao aquele que lhe parecia impossível.

Pelo esforço e luta em todos os momentos de sua vida, mesmo aqueles que lhe pareciam impossíveis.

Pelo permanente apoio e incentivo, pelo ombro amigo, pelo acolhimento, nos momentos mais difíceis.

Enfim, por tudo. Especialmente pela grande amizade, paciência e carinho, por todos nós.

Somos imensamente gratos por você ter existido entre nós.

DEDICO A:

ANNY E IURY,

MEUS SOBRINHOS

Á CLEIDE MARTINEZ DE ABREU

Pela incansável transmissão de **paz, amor e harmonia.**

Pela **convivência** agradável, sempre com disposição inegualável, tornando o ambiente o mais agradável e cheio de calor humano.

Pela **atenção e constante disponibilidade,** a qualquer hora, em qualquer momento, em qualquer situação: de alegria, de tristeza, de sobrecarga.

Pela **eficiência, perfeição** em tudo que tocava.

Pela **concessão de muitos pedidos,** sendo qual fosse, do mais simples ao mais complicado, do seu alcance ao aquele que lhe parecia impossível.

Pelo **esforço e luta** em todos os momentos de sua vida, mesmo aqueles que lhe pareciam impossíveis.

Pelo **permanente apoio e incentivo,** pelo ombro amigo, pelo acolhimento, nos momentos mais difíceis.

Enfim, por tudo. **Especialmente pela grande amizade, paciência e carinho, por todos nós.**

Somos imensamente gratos por você ter existido entre nós.

AMIGOS DO IBILCE

AGRADECIMENTOS

Ao término desta etapa do trabalho, expresso agora, com palavras, a minha gratidão, ao permanente apoio e incentivo das pessoas que convivem comigo, tornando o ambiente o mais agradável e cheio de calor humano.

À Professora Doutora Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, incansável orientadora deste trabalho, que muito tem contribuído para minha formação científica e pela orientação segura, os quais enriqueceram-me como pessoa, sou imensamente grata.

Aos Professores do Departamento de Biologia, pela transmissão de conhecimentos e experiências e pelo acolhimento e incentivos recebidos, em especial à Professora Maria Tercília V. A. Oliveira.

Às Professoras Doutoras Marina Coleman (Departamento de Botânica) e **Eliana Morielle Versute** (Departamento de Zoologia) pelas valiosas sugestões e principalmente pela amizade.

Ao Professor Antônio José Manzatto, do Departamento de Ciências da Computação e Estatística, deste Instituto, pela valiosa colaboração na análise estatística.

Ao Professor James R. Coleman, pela revisão do Summary e principalmente pelo constante apoio.

Aos colegas de Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, deste Instituto, pela convivência agradável e pelas proveitosas trocas de idéias. Em especial Alba Regina de Abreu Lima Catelani, Ana Silvia Lapenta, Claudia Regina Bonini Domingos, Lilian Madi Ravazzi, Maristela Sanches Bertasso e Satiko Nanya Oyama.

Às amigas Elza Midori Hashimoto e Rosa Sayoko Kawasaki Oyama, pelo constante incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Biologia e Química João Rodriguês dos Santos, Jorge F. Buchidid, Josué Rodrigues dos Santos, Laura Nascimento Pinheiros, Olga Brizotti Pelicer, Paulo Antonio Maziero, Rosana Selestino de Souza, Sebastião Dias Barbosa e Simone Carvalho Fernandes, pela colaboração na parte prática deste trabalho.

às Senhoras Palmira G. Gonçalvez e Bernadete D. Tevisan, responsáveis pela limpeza.

Aos Funcionários do Laboratório de Computação Getúlio A. Salinas, Guilherme Dworak e Romildo Olier Rodriguês.

à Senhora Soraia F. R. Soares, pela atenção e disposição na confecção das Figuras.

às Senhoras Nancy Q. A. Pereira, Onilda A. Oliveira Akazaki, Rosangela B. Simonato e ao Senhor Aguinaldo Lopes, pela atenção e constante disponibilidade.

Aos Funcionários da Biblioteca, pela paciência e dedicação em todos os momentos.

Aos meus Pais Chohati Itoyama e Yukiko k. Itoyama, pelo grande estímulo e permanente apoio.

Aos meus irmãos Newton, Creusa, Dirceu e Celso, **à minha cunhada** Maria Luíza, **aos meus sobrinhos** Anny, Daniela, Diogo, Fabrício e Iury **e aos meus primos** Osvaldo, Mário, Masako, Flávio, André, Sadako, Luis Ide, pela paciência e carinho.

Ao Dr. Luis Carlos Bicudo, pela grande auxílio prestado através de uma valiosíssima xícara de café.

à Senhora Tita (Maria Aparecida de Marchi), pela colaboração na confecção desta Tese.

Aos Professores Doutores Catarina Takahashi, Luis Carlos Gomes Simões, Nívea Dulce Tedesch Conforti Froes e Toshie Kawano , pelas valiosas sugestões durante a análise criteriosa da pro forma desta Tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão das bolsas.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, com palavras encorajadoras, minha eterna gratidão.

Muito Obrigada

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO 1

II. MATERIAIS E MÉTODOS 17
1. Espécie e Linhagem Utilizada 17
2. Manutenção em Laboratório e Meios de Cultura Utilizados .. 17
3. Experimentos 18
3.1. Efeito da cafeína sobre a produtividade em 10 gerações 18
3.2. Efeito da cafeína sobre a produtividade, por casal, das moscas da 10ª. geração e híbridas 19
3.3. Efeito da cafeína sobre a longevidade, após 10 gerações 20
3.4. Efeito da cafeína sobre a oviposição 20
3.5. Efeito da cafeína sobre o tempo e a frequência de acasalamento 21
3.6. Preparações citológicas para estudo do índice mitótico e da morfologia dos cromossomos 22
3.6.1. Preparo das lâminas e lamínulas 22
3.6.2. Obtenção das larvas para o preparo das lâminas .. 23
3.6.3. Obtenção dos gânglios cerebrais 23
3.6.4. Análise das lâminas para índice mitótico 24
3.6.5. Preparo das lâminas de glândula salivar 24
3.7. Análise dos órgãos reprodutores 25
3.8. Efeito combinado da cafeína e íon estanoso sobre a produtividade 25
4. Reagentes Utilizados 26
5. Análise Estatística 26

III. RESULTADOS 28
1. Efeito da Cafeína sobre a Produtividade em Cruzamentos em Massa, em 10 Gerações 28
2. Efeito da Cafeína sobre a Produtividade em Cruzamentos por Casal 45
2.1. Moscas da 10ª. geração 45

2.2. Produtividade em cruzamentos de moscas tratadas da geração F_{10} com moscas controle 49
3. Efeito da Cafeína sobre a Longevidade, após 10 Gerações .. 53
4. Efeito da Cafeína sobre a Oviposição 56
5. Efeito da Cafeína sobre o Acasalamento 61
6. Efeito da Cafeína sobre o índice Mitótico 65
7. Análise Morfológica dos Cromossomos do Aparelho Reprodutor Masculino e Feminino e da Morfologia Externa de Larvas e Moscas adultas 71
8. Efeito Combinado da Cafeína e íon Estanoso sobre a Produtividade 71

IV. DISCUSSÃO 76

V. RESUMO E CONCLUSÕES 94

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS 98

VII. BIBLIOGRAFIA 101

I. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve um crescimento acentuado no interesse em estudar os efeitos de substâncias às quais, voluntária ou involuntariamente, o homem se expõe na alimentação, no trabalho, na medicação e outras circunstâncias.

Tem-se avaliado os efeitos dessas drogas em vários organismos abrangendo bactérias, fungos, plantas e animais, inclusive o homem, quando possível (TIMSON, 1977; LEONARD **et al.**, 1987). Porém, dada a diversidade dessas substâncias e a dificuldade de abordagem de seu modo de ação, muito ainda resta a saber, mesmo sobre as drogas mais estudadas.

A literatura mostra que entre as substâncias ingeridas pelo homem, consideradas de uso mais generalizado e mais extensivamente estudadas, encontra-se a cafeína.

A cafeína (1, 3, 7-trimetilxantina, de fórmula molecular $C_8H_{11}N_4O_2$) é um alcalóide pertencente ao grupo das xantinas trimetiladas presente em mais de 60 espécies de plantas. Quimicamente, estes alcalóides assemelham-se às purinas, xantinas e ácido úrico, os quais são compostos metabolicamente importantes (LEONARD **et al.**, 1987).

Segundo TIMSON (1977) a cafeína é um pó branco ou massa branca constituída por longos cristais aciculares, flexíveis, muito leves, com brilho sedoso. Funde-se entre 235 e 237°C e sublima-se acima de 176°C à pressão atmosférica, sem decomposição. A solubilidade da cafeína, em água, varia com a temperatura. A 0°C ela é de 0,60 g/100 ml de água, a 25°C é de 2,80 g/100 ml de água e a 100°C, de 50 g/100 ml de água. A solubilidade em outros solventes,

como acetona, clorofórmio e etanol a 25ºC, é de, respectivamente, 2,0, 18,2 e 1,5/100 ml do solvente.

A cafeína é consumida não só sob a forma de café (**Coffea arabica**), chás (como o chá da índia, **Camellia sinensis**), ou mesmo guaraná (**Paullinia cupana**) mas, também, como componente de analgésicos, anorectantes e estimulantes ou componentes de misturas estimulantes, como as anfetaminas (BENOWITZ, 1990).

Clinicamente, a cafeína tem efeito estimulador do sistema nervoso central. Ela afeta primeiro o cortex cerebral e depois a medula. Pode afetar, também, a coordenação psicomotora, aumentar a secreção de ácido graxo e pepsina, produzir ação diurética, aumentando o volume urinário e a secreção de sódio, causar efeitos cardiovasculares e efeitos alérgicos (LEONARD **et al.**, 1987).

No homem, a cafeína, é rapidamente absorvida pelo trato gastrintestinal e distribuída pelos vários tecidos, na proporção de seu conteúdo de água. Isto ocorre tanto com as células somáticas, como com as células germinativas (KIHLMAN, 1974).

O metabolismo da cafeína, em mamíferos, processa-se simultaneamente por várias vias. Variações na potencialidade das enzimas do fígado, em diferentes espécies, resultam em diferenças quantitativas em alguns dos metabólitos da cafeína. Há mais do que uma enzima envolvida na biotransformação de cada metabólito, mas, as oxigenases do citocromo P-450 possuem um papel maior no metabolismo primário da cafeína. Segundo STAVRIC & GILBERT (1990), as enzimas N-acetil-transferases são responsáveis por alguns metabólitos adicionais. No conjunto, os metabólitos urinários da cafeína compõem um quadro mais complicado, havendo pelo menos 18 metabólitos identificados na urina de várias espécies, sendo que o padrão de

excreção é quantitativa e qualitativamente diferente entre elas. A cafeína não modificada representa somente 1,0 a 1,6% do metabólito urinário, para homens e macacos. Já os porcos, eliminam cerca de 15% da cafeína administrada.

Alguns dos numerosos metabólitos da cafeína são conhecidos por serem mais ativos biologicamente do que outros (STAVRIC & GILBERT, 1990). Dois dos metabólitos primários da cafeína, paraxantina (1, 7-dimetilxantina) e teofilina (1, 3-dimetilxantina), mostram propriedades farmacológicas e toxicológicas completamente opostas. Enquanto a paraxantina não é biologicamente ativa e é praticamente não tóxica, a teofilina é farmacologicamente muito ativa e potencialmente tóxica. A teofilina é mais ativa do que a cafeína em estímulo cardíaco, dilatação coronária e relaxante do músculo esquelético. Outros metabólitos como a 3-metilxantina e 1-metilxantina possuem atividades farmacológicas importantes. A 3-metilxantina é mais ativa do que a teofilina como um inibidor da fosfodiesterase do AMP cíclico e é menos ativa do que a teofilina como um inibidor do AMP cíclico.

Há indicação de que o metabólito 5-(N-metilformilamina)-6-amino-1,3-dimetiluracil possui efeito toxicológico, podendo, este composto, interagir com o DNA. é encontrado somente em pequenas quantidades na urina humana, enquanto é o maior metabólito encontrado no rato (STAVRIC & GILBERT, 1990).

Segundo TIMSON (1977) o metabólito teobromina (3, 7-dimetilxantina) causa quebra cromossômica e formação de células trinucleadas em **Oedogonium acmandrium**. Portanto é um agente clastogênico e também aneugênico.

Segundo revisão de STAVRIC & GILBERT (1990) a meia vida da cafeína, no homem, é usualmente de quatro a seis horas, mas pode haver considerável variabilidade relacionada com diferentes circunstâncias. Por exemplo, segundo SOMANI & GUPTA (1988) o cigarro diminui a meia vida da cafeína, mas em mulheres grávidas, causa um aumento significativo, dessa meia vida, para mais do que 20 horas, embora a diminuição da função do fígado possa extendê-la por vários dias. Portanto, nesse período, para a espécie humana e para os macacos ocorre a diminuição do metabolismo da cafeína podendo resultar em elevados níveis dessa substância, comparado com o período anterior à gravidez. Após o parto, há retorno ao metabolismo normal.

Estudos em animais (LEONARD **et al.**, 1987) têm indicado que o uso da cafeína durante a gravidez provoca anormalidades esqueléticas, diminuição do crescimento fetal intrauterino e baixo peso ao nascer. Altas doses de cafeína estão associadas com perda fetal e aumento na frequência de malformações congênitas no homem.

Para BRUYERE **et al.** (1988) a cafeína, acumulada na mulher grávida, atravessa a placenta e atinge o feto que não tem as enzimas necessárias para o seu metabolismo, podendo, assim, intoxicá-lo. Entretanto, não foi demonstrado se a droga afeta diretamente o embrião ou se compromete secundariamente seu desenvolvimento, causando um efeito materno, tal como a secreção excessiva de catecolaminas (produtos do metabolismo da cafeína).

Em ratas, TANAKA **et al.** (1987) verificaram baixo peso da placenta e uma redução do peso do cérebro dos fetos, maior do que a do corpo quando há ingestão da cafeína, por um longo período, durante a gravidez. ROSS & PERSAUD (1990) que estudaram o efeito da

cafeína no desenvolvimento de embriões de ratos observaram mais comumente redução no número de brânquias e somitos e formação anormal dos membros anteriores. No desenvolvimento das mandíbulas de ratos jovens, cujas mães foram tratadas pela cafeína, foi constatada redução significativa do peso mandibular, do conteúdo de cálcio, da alcalinidade e da atividade fosfatase ácida (DRISCOLL **et al.** 1990).

NAKAMOTO **et al.** (1989) mostraram que a cafeína afeta o conteúdo de minerais e o próprio crescimento de ossos dos fetos de ratas tratadas durante a gravidez sendo que o cálcio, o magnésio e o zinco diminuíram de 1 a 2 mg no grupo tratado.

Em função desses e outros resultados, a FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (USA) aconselhou as mulheres grávidas a evitar ou usar moderamente comidas ou bebidas contendo cafeína. O comitê sobre nutrição da mulher e da criança pré-escolar, FOOD AND NUTRITION BOARD, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, também recomenda moderação na ingestão da cafeína durante a gravidez (LEONARD **et al.**, 1987).

Por outro lado, há também dados na literatura que sugerem que a cafeína pode dificultar a gravidez (WILCOX **et al.**, 1988). Porém esses resultados não foram confirmados em outro estudo envolvendo a associação entre consumo de café, chá e bebidas cola e tempo para engravidar, realizado por JOESOEF **et al.** (1990). Esses autores analisaram 2817 mulheres férteis e não encontraram nenhuma evidência para um efeito desfavorável da cafeína. Da mesma maneira, verificaram que o consumo de cafeína não estava associado com a infertilidade, em 18181 mulheres inférteis e seus controles.

Efeitos prejudiciais da cafeína, como por exemplo, alterações na duração do período de desenvolvimento embrionário, anomalias no desenvolvimento, redução da fertilidade, alterações

celulares, alterações na estrutura da cromatina, entre outros, foram observados em vários trabalhos e diversos organismos (SEHGAL & SIMÕES, 1976; POLLARD **et al.**, 1987; KAWANO & SIMÕES, 1987).

SEHGAL & SIMÕES (1976) estudaram o efeito de algumas drogas neurotrópicas (cafeína, ácido glutâmico, anafranil, fosfato de codeína e barbiturato de sódio) sobre o desenvolvimento de **Drosophila melanogaster**. O desenvolvimento larval não foi afetado, porém as moscas, na maioria dos casos, eram estéreis, e as fêmeas apresentavam malformações dos ovários. As glândulas salivares de larvas do terceiro estádio eram formadas por células de tamanho menor que o normal. Das drogas estudadas a mais tóxica foi a cafeína.

Já, o estudo do tempo de desenvolvimento, em **D. prosaltans**, realizado por ITOYAMA (1989), mostrou que o tratamento com cafeína nas concentrações 1000 ug e 1500 ug de meio de cultura, altera esse parâmetro, nessas moscas, levando-o a um atraso de um dia, quando comparado com o das moscas controle ou das tratadas com 50 ug/ml e 100 ug/ml da substância.

Atraso no desenvolvimento, em decorrência do consumo de cafeína foi demonstrado também por outros autores. Por exemplo, em larvas de **Telmatoscopus albipunctatus** (DIPTERA, PSYCHODIDAE), SEHGAL **et al.** (1977) verificaram que a cafeína causa forte atraso do desenvolvimento e alta mortalidade. Em outro estudo, POLLARD **et al.** (1987) mostraram que a cafeína causa um retardo no desenvolvimento de fetos de ratos fêmeas e machos.

Malformações associadas à cafeína foram também descritas por KAWANO & SIMÕES (1987). Administrando solução de cafeína, a 0,1%, a embriões de **Biomphalaria glabrata** esses autores observaram

atraso na clivagem de algumas células do embrião, seguida de divisão alterada, causando assimetria nas placas cefálicas, vesícula da cabeça com 13 células (o normal apresenta 12), células supernumerárias nas placas apicais, ocorrência de malformações, tais como monoftalmia dextra ou sinistra, reduplicação de um olho esquerdo ou direito e formação de exogástrula. Por sua vez, BERTRAND **et al.** (1965, in TIMSON, 1977) observaram a ocorrência de ectrodactilia, em descendentes de ratas grávidas tratadas com cafeína, sendo, o efeito, proporcional à dose. Em adultos de **T. albipunctatus** originados de pupas tratadas com cafeína, SEHGAL **et al.** (1977) observaram abdome anormalmente alongado e asas anormais.

SEHGAL **et al.** (1977) também relataram a redução da fertilidade dos adultos de **T. albipunctatus** originados de larvas ou pupas tratadas com cafeína. Redução da produtividade, associada à cafeína, também foi demonstrada por ITOYAMA (1989), em **D. prosaltans.** Em três das quatro concentrações utilizadas (100, 1000 e 1500 ug/ml de meio de cultura) a produtividade foi significativamente menor que a do controle. Na menor concentração utilizada, de 50 ug/ml de meio, a produtividade também foi menor que a do controle, embora a diferença não tenha sido significativa. Além da redução da produtividade, a cafeína determinou um atraso no início da produção de descendentes, quando comparada com o controle. Nesse trabalho, o grau de redução da produtividade foi diretamente proporcional à concentração de cafeína no meio.

ITOYAMA (1989), também estudou o efeito da cafeína na longevidade de moscas virgens e acasaladas. O tratamento com cafeína causou redução significativa desse parâmetro, em fêmeas e machos virgens e nos machos acasalados quando comparados com o respectivo

controle. Fêmeas acasaladas tratadas, porém, mostraram, na maioria dos experimentos, maior longevidade que o controle, sugerindo vantagem do bloqueio reprodutivo parcial, causado pela cafeína.

Resultados da mesma autora, relacionados com a oviposição, mostraram que a cafeína, presente no meio de cultura ao qual as moscas ficaram expostas 12 horas, inibe, de forma direta, a postura de ovos das fêmeas não tratadas previamente e acasaladas, isto é, quanto maior a concentração de cafeína colocada no meio para oviposição, maior a redução do número de ovos. As moscas que se desenvolveram nos meios com cafeína também produziram menor número de ovos, mesmo quando expostas, posteriormente, ao meio sem cafeína. Neste caso, também, a redução está diretamente relacionada com a dose de cafeína do meio de origem das moscas.

Dados da literatura demonstraram que, **in vitro**, há também envolvimento da cafeína na mobilidade de espermatozóides humanos (REES **et al.**, 1990) e de bovinos (SCHOFF & LARDY, 1987; PARK **et al.**, 1989).

Vários são os trabalhos que apontam o efeito da cafeína sobre a atividade enzimática. Segundo POLLARD **et al.** (1987), a cafeína em doses moderadas (30 mg/Kg.d) ou altas (60 mg/Kd.d) causa um decréscimo significativo na atividade da desidrogenase hidroxiesteróide 3B (3B-HSD) e consequente redução na biossíntese de testosterona, em testes fetais em ratas de 18 e 20 dias de gestação. A baixa atividade 3B-HSD persiste no grupo dos adultos que receberam 60 mg. Foram observados ainda efeitos na segunda ninhada, oito semanas após cessado o consumo de cafeína pelas ratas. Nesta segunda geração, os descendentes, em ambas as doses de cafeína, nasceram significativamente menores que os do controle. Por sua vez,

SRINIVASAN **et al.** (1979) mostraram que a cafeína inibe a DNA polimerase dependente do RNA (transcriptase reversa) em vírus oncogênicos de murídeos e aves e BALACHANDRAN & SRINIVASAN (1982) observaram que a cafeína inibe a atividade da DNA polimerase de **Escherichia coli.** No músculo de coelho foi observado que a cafeína inibe completamente a atividade da fosforilase (TIMSON, 1977) e SUTHERLAND & RALL (1958, in LÉGER, 1985) mostraram que as metilxantinas inibem as enzimas fosfodiesterases. Além da cafeína inibir a enzima fosfodiesterase, ela também é um competitivo antagônico dos receptores da adenosina extracelular (YOKOGOSHI **et al.**, 1987).

Alterações causadas pela cafeína, ao nível celular e cromossômico, foram verificadas em vários trabalhos.

Dados de LA PENA **et al.** (1981) mostraram que solução de cafeína a 0,1%, injetada em plantas de centeio, em vários estádios do desenvolvimento da espiga, inibe a citocinese na linhagem germinativa e causa bimeiose em células binucleadas. Durante a divisão celular ocorreram fusões nucleares na linhagem germinativa, dando origem a tetraplóides mononucleados. Foi observado também um decréscimo na frequência de quiasmas.

Foi demonstrado que a cafeína é um potente inibidor da formação da placa celular em células vegetais em divisão, atuando após 80% da placa estar completa (por exemplo BONSIGNORE & HEPLER, 1985; HEPLER & BONSIGNORE, 1990). Sob influência da cafeína, as "ilhas" de vesículas de Golgi que se dispõem na região equatorial da célula não se fundem para formar a placa e parecem ser reabsorvidas.

ESPINO & VASQUEZ (1981) obtiveram plantas poliplóides utilizando cafeína em **Saintpaulia ionantha.**

A cafeína induz trocas entre cromátides-irmãs (TCI) e inibe a proliferação celular em linfócitos periféricos humanos cultivados, **in vitro** (GUGLIELMIN **et al.**, 1982). Tanto o efeito indutor de TCI como o cicloativo mostraram ser dose-dependentes.

Alterações no aspecto da cromatina, tornando-a "dispersa" foram observadas em grãos de pólen de **Pinus** submetidos à força centrífuga em solução de cafeína (TERASAKA & NIITSU, 1987).

SASAKI & NISHIMOTO (1989) observaram que a cafeína induz condensação prematura dos cromossomos na linhagem celular BHK21 durante a fase S, na presença de um inibidor de síntese de DNA. Segundo os autores, este achado sugere que a cafeína causa mudanças na conformação da cromatina.

Também a exposição de linhagens celulares L1210 de murídeo a altas concentrações de cafeína perturba a progressão completa do ciclo celular e resulta em um aumento da sensibilidade do DNA à desnaturação (KUNICKA **et al.**, 1990). Nesse trabalho, a cafeína induziu um decréscimo na estabilidade do DNA afetando as células interfásicas, indiferentemente da sua posição no ciclo, sendo as mudanças, estocásticas, dependentes do tempo e concentração. Populações de células respondem à cafeína de modo muito heterogeneo, com respeito ao grau de desestabilização do DNA.

Foi observado, também, que a cafeína afeta a síntese de DNA (CHAUDHURI & GHOSH, 1982), reduz a frequência de crossing-over simples e duplo (LOPRIENO **et al.**, 1974) e reduz a frequência de trocas cromatídicas (OKOYAMA & KITAO, 1981). Aberrações cromatídicas e cromossômicas (respectivamente, DE MARCO & POLANI, 1981, em **D. melanogaster** e HERNANDEZ **et al.**, 1986, em **Allium cepa**) foram, também, causadas por tratamento com cafeína.

SEHGAL & SIMÕES (1976) observaram que a cafeína altera a politenização dos cromossomos de **D. melanogaster** sugerindo que esse efeito seja devido ao retardo da síntese de DNA.

Sabe-se que o pós-tratamento com cafeína tem efeito potencializador na indução de dano cromossômico e morte celular por agentes mutagênicos físicos e químicos. Por exemplo, TANZARELLA **et al.** (1984) verificaram que tratamento de células de **Xenopus leavis** com mitomicina C e subsequente tratamento com cafeína nas fases S ou G_2 do ciclo celular levam a um aumento na frequência de trocas cromatídicas, especialmente quando o pós-tratamento ocorre na fase S.

A cafeína produz cromossomos pulverizados quando em tratamentos combinados com agentes clastogênicos como a luz ultra-violeta (UV), 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) e mitomicina C (MMC) (NISHI **et al.**, 1983). Do mesmo modo, a combinação de radiação (gama ou ultra-violeta) e pós-incubação com cafeína resulta em cromossomos quebrados, formação de células com micronúcleos, perda de cromossomos sexuais e indução ou aumento das frequências de dominantes letais (por exemplo, em linhagem celular V79 de hamster chinês, CREMER **et al.**, 1980, em **Drosophila**, MENDELSON & SOBELS, 1974 e em ovócitos S14 e espermatozóides maduros de **Musca domestica**, TARGA, 1983). De modo geral, os autores atribuem os resultados à ação parcial da cafeína inibindo o processo de reparo do DNA, na meiose.

Os efeitos mutagênicos da cafeína foram estudados em organismos procariontes e eucariontes com resultados muito variáveis, mas em muitos casos foi considerada um inibidor dos processos de reparo do DNA (McPHEE & LEYDEN, 1985; SASAKI **et al.**,

1989). Em **E. coli**, a cafeína mostrou-se um mutagênico do tipo "frameshift" (McPHEE & LEYDEN, 1985; PONS & MULLER, 1990), mas em **Salmonella typhimurium** a cafeína produziu um bloqueio das mutações devidas à substituição dos pares de bases causada por raios ultravioleta (McPHEE & LEYDEN, 1985).

GRAF & WURGLER (1986) utilizaram preparações de café em diferentes testes mutagênicos em células germinativas e somáticas de **D. melanogaster.** As células germinativas foram analisadas quanto a letais recessivos ligados ao sexo (principalmente, mutações gênicas e pequenas aberrações cromossômicas), quanto a dominantes letais (efeitos citotóxicos e genotóxicos) e quanto à perda de cromossomos sexuais (quebra cromossômica e não disjunção), mas somente efeito citotóxico foi observado no teste para dominante letal. Nenhum efeito genotóxico conclusivo pode ser detectado pelas três técnicas utilizadas. As preparações de café foram também testadas quanto à indução de mutações e recombinações mitóticas, em células somáticas do disco imaginal das asas, pela técnica do SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) sendo que ambas as preparações afetaram as células das asas.

O efeito inibidor da cafeína no reparo do DNA em quebras cromossômicas induzidas em **Drosophila**, por raios X, foi admitido por MENDELSON & SOBELS (1974) para explicar o aumento da frequência de letais dominantes e da perda de cromossomos sexuais, e a diminuição da frequência de translocações. Nesse trabalho, só os machos foram irradiados e cruzados com fêmeas tratadas com cafeína, supondo-se, então, que a cafeína inibe, parcialmente, processos de reparo nos ovócitos, que são necessários para reparar as quebras cromossômicas induzidas nos espermatozóides.

Há muitas indicações de que o efeito potencializador da cafeína depende da fase do ciclo em que as células são tratadas ou expostas e se a cafeína é ministrada na forma de pré ou pós-tratamento. Por exemplo, TARGA (1983) obteve aumento da frequência de letais dominantes em ovócitos S_{14} e espermatozóides maduros de **M. domestica** somente quando a exposição à radiação gama foi feita após um pré-tratamento com dieta contendo 0,2% de cafeína. Concentrações menores dessas substâncias ou seu uso na mesma concentração, mas na forma de pós-tratamento, produziram resultados negativos.

Os efeitos de pós-tratamento com cafeína nas fases S e G_2 sobre as frequências de aberrações cromossômicas induzidas pelo tiotepa (agente alquilante) em pontas de raiz de **Vicia faba** e em linfócitos humanos, **in vitro**, foram analisados por KILHMAN **et al.** (1982). A frequência de aberrações induzidas nos linfócitos em G_0 ou G_1 foi maior quando os tratamentos com cafeína foram dados em G_2. Em células de **V. faba**, porém, as frequências de aberrações só aumentaram fortemente quando as pontas de raiz foram pós-tratadas, com cafeína, durante a fase S.

CLEAVER (1989) por sua vez, verificou que células humanas transformadas pelo SV40 são mais sensíveis à morte por raios Ultra-violeta quando crescem na presença de cafeína depois de submetidas à radiação. BATES **et al.** (1985) mostraram que a cafeína reduz o acúmulo de células em G_2 de linhagens celulares controle e de portadores de Ataxia-telangiectasia (AT), depois depois do tratamento com radiação ionizante.

Micro-irradiação com UV de uma pequena parte do núcleo de hamster chinês, seguida de incubação em cafeína, frequentemente resulta em cromossomos quebrados, na primeira mitose pós-irradiação

(CREMER **et al.**, 1983).

DULOUT **et al.** (1981) analisaram o efeito da cafeína ministrada com trietilelinimelamine (TEM) e adriamicina (ADR), em camundongos. O tratamento combinado de TEM e cafeína mostrou potencialização do efeito da primeira droga, pela segunda, na frequência de falhas, quebras e trocas cromatídicas. Tratamento com ADR e cafeína potencializou o efeito apenas na frequência de fusões cêntricas.

GRANBERG-OHMAN **et al.** (1980) utilizando fenacetina e fenazona, separadas ou combinadas com cafeína, em ratos, encontraram carcinomas e sarcomas em número de sete quando a cafeína foi ministrada separadamente ou juntamente com a fenacetina, em número de 18 quando foi ministrada junto com fenacetina e fenazona, e em número de 16 quando as duas últimas drogas foram ministradas juntas sem cafeína. O grupo da fenacetina sozinha mostrou 19 carcinomas e sarcomas. Os autores atribuem a aparente redução do risco de malignidade da fenacetina, quando ministrada junto com a cafeína, ao aumento da diurese causado pela cafeína. As aberrações tais como falhas (gaps), quebras e desarranjos estruturais foram maiores nos grupos tratados só com fenacetina, quando comparados com o controle.

Pós-tratamento com 2 mM de cafeína ou 2 mM de benzamide aumentou a letalidade de MMNG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) em células V79 de hamster chinês (DAS, 1987). Embora tenham sido obtidas evidências de que o modo de ação das duas substâncias no reparo do DNA é diferente, o resultado quantitativo final foi o mesmo, isto é, houve aumento na letalidade celular.

Células de ratos, tratadas isoladamente com 2-acetilaminofluorene (2-AAF) e fenobarbital (PB) apresentaram

redução da frequência de TCI. A adição de cafeína cancelou o efeito de 2-AAF, mas não do PB, sugerindo que o mecanismo de TCI pode ter diferentes origens (EXILIE-FRIGERE **et al.**, 1984). Já DOZI-VASSILIADES **et al.** (1985) verificaram que, em cultura de linfócitos humanos a vitamina A produziu aumento da taxa de troca entre cromátides-irmãs, em combinação com cafeína, causou sinergismo sobre a indução de TCI e supressão do índice mitótico e em combinação com melfan e cafeína, produziu atraso no ciclo celular e redução do índice mitótico.

KIMURA & AOYAMA (1989) observaram que células de ovário de hamster chinês têm a sua sensibilidade ao brometo de etídeo (corante catiônico intercalante no DNA) reduzida, na presença da cafeína. Os resultados mostraram que havia supressão da absorção do corante que é realizada por meio do sistema de transporte do potássio, sugerindo envolvimento da cafeína com esse sistema. **In vitro**, a cafeína causou uma diminuição na ligação do etídeo ao DNA. Contudo para os autores o efeito da redução da sensibilidade ao etídeo é menos importante do que o efeito no transporte.

No presente trabalho, objetivou-se dar continuidade ao estudo dos efeitos da cafeína em **D. prosaltans**, ampliando algumas observações para melhor avaliar os efeitos tóxicos dessa substância. Paralelamente, foram realizados experimentos com cafeína e íon estanoso a fim de verificar se ocorre um efeito interativo das duas substâncias.

O íon estanoso é de largo emprego especialmente na indústria alimentícia e na área de saúde. A população ingere íon estanoso inorgânico, presente na comida como resultado do processamento ou da corrosão (leaching) de latas não envernizadas ou

chapas de estanho usadas na embalagem. O íon estanoso é ainda utilizado em pastas dentifrícias sob a forma de fluoreto, e no preparo de radioisótopos para fins médicos (REICKS & RADER, 1990).

A ingestão de íon estanoso em dietas tipicamente ocidentais é de 1 a 38 mg por dia. Parece que, pessoas que ingerem íon estanoso, diariamente, não correm nenhum risco, mas, em ratos, vários trabalhos recentes têm mostrado que 100 a 200 ug de íon estanoso/g na dieta, alterariam o metabolismo de minerais essenciais, tais como cobre e zinco (REICKS & RADER, 1990). Segundo esses autores interações entre minerais, carboidratos e estanho, presentes na comida aumentariam o risco de prejuízo aos mecanismos protetores celulares básicos. Eles observaram efeitos adversos nos ratos, quando administraram dietas contendo 100 ug de estanho/g. Houve um esgotamento do cobre em ratas alimentadas com dietas adequadas desse mineral, aceleração do aparecimento de deficiência de cobre em ratas alimentadas com dieta deficiente e redução da proteção antioxidante nas células do fígado.

Os resultados de trabalhos com íon estanoso não são concordantes quanto à genotoxicidade (efeito genotóxico: KADA **et al.**, 1980, in CUNHA **et al.**, 1991; efeito não-genotóxico: OLIVIER & MARZIN, 1987). Em **E. coli** o tratamento com cloreto estanoso apresentou resultados que indicam a ocorrência de modificações no DNA e, portanto, de atividade genotóxica dessa substância (CUNHA **et al.**, 1991). Assim, se o íon estanoso afeta o DNA e a cafeína prejudica seu reparo, espera-se que a associação das duas substâncias, realizada no presente trabalho, cause um efeito mais acentuado nos organismos em análise que qualquer das drogas separadas.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Espécie e Linhagem Utilizada

Drosophila prosaltans pertence ao grupo e subgrupo saltans, sendo a linhagem utilizada no presente trabalho, procedente de Sangre Grande, Trinidad.

2. Manutenção em Laboratório e Meios de Cultura Utilizados

As moscas utilizadas neste trabalho foram mantidas em câmara de temperatura constante a 20°C ± 1°C e em meio de cultura banana-agar, cuja fórmula é a que segue:

- 1000 ml de água
- 800 g de banana
- 12 g de agar-agar
- 15 g de fermento Fleischmann dissolvido em 15 ml de água
- 20 g de açucar
- 8 ml de solução acoólica de nipagin 7%.

Para os experimentos, a esse meio básico, ao qual denominamos **Controle (C)** adicionamos seis diferentes concentrações de cafeína, descritas a seguir:

- t_o= 50 ug de cafeína por ml de meio de cultura banana-agar
- t_1= 100 ug de cafeína por ml de meio de cultura banana-agar
- t_2= 1000 ug de cafeína por ml de meio de cultura banana-agar
- t_3= 1500 ug de cafeína por ml de meio de cultura banana-agar
- t_4= 2000 ug de cafeína por ml de meio de cultura banana-agar

- t_5= 2500 ug de cafeína por ml de meio de cultura banana-agar

As doses de cafeína utilizadas foram as mesmas do trabalho anterior (ITOYAMA, 1989), escolhidas com base na DL50. Neste experimento foram, porém, acrescentadas duas concentrações, t_4 e t_5, que consideramos relevantes para aprofundamento dos resultados.

As seis concentrações de cafeína foram adicionadas ao meio de cultura banana-agar quente. Este foi distribuído em garrafas de 1/4 de litro ou em tubos. Devido ao fato da cafeína possuir baixa solubilidade em água destilada fria (são necessários 46 ml de água destilada fria para dissolver 1 grama), a cafeína foi dissolvida em água destilada quente, na proporção de 1 g/5,5 ml de água destilada (dados obtidos do índex Merck).

3. Experimentos

3.1. Efeito da cafeína sobre a produtividade em 10 gerações

A produtividade (número de descendentes) das moscas controle e tratadas foi analisada por 10 gerações. Fêmeas e machos virgens foram coletados do estoque e, após seis dias, 10 casais foram colocados em cada garrafa de 1/4 de litro contendo as diferentes concentrações de cafeína, isto é, C, t_0, t_1, t_2, t_3, t_4 e t_5. De cada tipo de meio foram preparadas seis garrafas (cinco para observação da produtividade e uma para reposição de moscas que eventualmente morressem durante o experimento) as quais eram repicadas uma vez, com intervalo de cinco dias, para os respectivos meios de cultura, com descarte dos pais após cinco dias do repique.

Os descendentes, machos e fêmeas, foram contados separadamente, em cada geração, e utilizados para a montagem da próxima geração até a décima.

O objetivo deste experimento foi verificar se ocorrem, entre as gerações, mudanças na produtividade que possam ser atribuídas à seleção para resistência à cafeína ou a efeito acumulativo da mesma.

Os descendentes na décima geração foram também utilizados para a montagem de outros experimentos, descritos a seguir.

3.2. Efeito da cafeína sobre a produtividade, por casal, das moscas da 10ª. geração e híbridas

Foram coletadas moscas virgens (fêmeas e machos) C, t_0, t_1, t_2, t_3, t_4 e t_5, nascidas na 10ª. geração e, após seis dias, montados cruzamentos por casal, em tubos contendo meio de cultura controle, sendo 20 tubos para cada tipo de experimento. No total, foram realizados 140 cruzamentos nos sete experimentos. Esses casais foram transferidos 3 vezes para meio de cultura novo, em intervalos de 3 dias. Os pais foram descartados após 3 dias da última transferência. Os descendentes foram contados separadamente por sexo, diariamente, à medida que foram nascendo.

Paralelamente, foi observada a produtividade de cruzamentos híbridos entre moscas controle e tratadas (fêmeas controle x machos t_0, t_2 e t_5 e machos controle x fêmeas t_0, t_2 e t_5). Os cruzamentos foram feitos em tubos, da mesma forma já descrita.

Pretendeu-se, com este experimento, verificar, após 10 gerações de tratamento e transferência para meio controle, como se comporta a produtividade das moscas criadas em cada concentração de cafeína e se há um efeito diferente da cafeína sobre fêmeas e machos, avaliável em cruzamentos com moscas controle.

3.3. Efeito da cafeína sobre a longevidade, após 10 gerações

Moscas recém-nascidas, controle e tratadas (t_0, t_1, t_2, t_3, t_4 e t_5), da décima geração, foram coletadas, separadas por sexo e colocados 40 fêmeas ou 40 machos em garrafas de 1/4 de litro contendo os mesmos meios de cultura de onde elas nasceram. De cada concentração foram montadas seis garrafas (três para fêmeas e três para machos), totalizando 240 moscas (120 fêmeas e 120 machos) de cada experimento. As moscas foram transferidas semanalmente para meio de cultura novo, de mesmo tipo, até que todas morressem. As garrafas foram observadas diariamente, sendo computado o número de moscas mortas.

Os objetivos deste experimento foram os mesmos descritos para a produtividade, considerando-se, agora, outro parâmetro, a longevidade.

3.4. Efeito da cafeína sobre a oviposição

Para a observação da oviposição foram utilizadas caixas de população de acrílico incolor, medindo 16 cm de lado e de altura, com quatro pés de 3 cm. Apresentam duas aberturas na base, de 6,3 cm de diâmetro, e outra abertura na lateral, de 5,5 cm de diâmetro. As

aberturas da base adaptam-se placas de Petri plásticas contendo os meios de cultura. A abertura lateral serve para introduzir as moscas e para arejamento através de um orifício na rolha que a fecha, envolta em gase. A tampa da caixa é fixada e vedada com fita crepe e pode ser removida para limpeza.

Moscas virgens do estoque foram coletadas, separadas por sexo, e após 6 dias colocados 125 casais em uma garrafa de 1/4 de litro contendo meio de cultura C ou t_5. Após 24 horas estas moscas foram transferidas para as caixas de população contendo placas de Petri com apenas meio de cultura controle. As placas de Petri foram trocadas diariamente, sendo descartadas após a contagem dos ovos, até o 13º dia.

O objetivo deste experimento foi verificar se a baixa oviposição das moscas tratadas, observada em experimento anterior não era apenas um atraso na produção de ovos e não uma redução no número de ovos produzidos.

3.5. Efeito da cafeína sobre o tempo e a frequência de acasalamento

Moscas virgens (fêmeas e machos) do estoque foram coletadas e após seis dias, montados cruzamentos, em massa, em garrafas de 1/4 de litro contendo meio de cultura C ou t_5 para a observação do tempo de pré-cópula (TPC), tempo de cópula (TC), frequência de cópula (FC) e tempo de cópula relativo (TCR).

Moscas virgens dessas garrafas foram coletadas, separadas por sexo e colocadas em número de cinco em cada tubo contendo os respectivos meios de cultura, por seis dias. Após esse período foram

reunidos cinco fêmeas e cinco machos em tubos sem meio de cultura, para observação por uma hora. Foram analisados 130 casais controle e 110 casais t_5.

Esse experimento foi realizado no interior da câmara de temperatura constante, a 20°C ± 1°C.

3.6. Preparações citológicas para estudo do índice mitótico e da morfologia dos cromossomos

O estudo do índice mitótico foi realizado em lâminas de gânglios cerebrais de larvas do terceiro estádio, submetidas ou não ao tratamento com cafeína.

Para estudo de alterações morfológicas foram analisados cromossomos de gânglios cerebrais e das glândulas salivares de larvas de terceiro estádio.

3.6.1. Preparo das lâminas e lamínulas

As lâminas e lamínulas empregadas nas preparações citológicas foram previamente submetidas ao seguinte tratamento: deixadas em Extran-MA 02 neutro (MERCK), por 30 minutos, esfregadas individualmente e colocadas em uma cuba com água, por uma hora, em seguida, lavadas uma a uma em água corrente e colocadas em outra cuba com água destilada, por 30 minutos, sendo posteriormente transferidas para solução sulfocrômica forte, por pelo menos uma hora, e enxaguadas em água corrente por 20 minutos. As lâminas foram ainda colocadas em solução de ácido clorídrico a 0,1 N, por uma hora e enxaguadas em água corrente por 20 minutos. Lâminas e lamínulas

foram então colocadas em dois banhos de água destilada, por uma hora cada, seguindo-se secagem ao ar.

3.6.2. Obtenção das larvas para o preparo das lâminas

Fêmeas e machos virgens do estoque foram coletadas e após seis dias, montados cruzamentos por casal, em tubos, contendo os diferentes tipos de meios de cultura, isto é, C, t_3 e t_5. Esses casais foram transferidos duas vezes para tubos novos contendo os respectivos meios de cultura, de cinco em cinco dias. No último repique os pais foram descartados. Os tubos foram mantidos em câmara de temperatura constante a 20°C ± 1°C, para produção das larvas a serem utilizadas no preparo das lâminas.

3.6.3. Obtenção dos gânglios cerebrais

Larvas do terceiro estádio tardio, C, t_3 e t_5, foram dissecadas para obtenção dos gânglios cerebrais, em solução fisiológica de Demerec (DEMEREC & KAUFMANN, 1945) cuja fórmula é a que segue):

- NaCl ..... 7,50 g
- KCl ..... 0,35 g
- CaCl ..... 0,25 g
- H_2O ..... 1000 ml

Os gânglios eram retirados e transferidos para a lâmina contendo uma gota de orceína lacto-acética onde eram deixados por 1 minuto e posteriormente lavados em ácido acético (solução aquosa a

45%) e colocados no ácido lático (solução aquosa 50%), aí permanecendo por dois minutos. Posteriormente, a lâmina era coberta com a lamínula e submetida a esmagamento. A lutagem foi realizada com esmalte incolor.

As lâminas foram guardadas no Freezer e analisadas em microscópio Zeiss Standard Júnior (883) quanto ao índice mitótico e morfologia.

3.6.4. Análise das lâminas para índice mitótico

A análise das lâminas dos gânglios cerebrais das larvas C, t_3 e t_5 foi realizada da seguinte maneira: de cada concentração foram preparadas 10 lâminas, sem distinção de sexo e analisados, em teste cego, em média 6 campos microscópicos, distintos, de cada lâmina, totalizando 100 células pelo menos (em processo de divisão e em intérfase). O número de células interfásicas e em divisão foram computados, separadamente por campo.

3.6.5. Preparo das lâminas de glândula salivar

As larvas foram dissecadas em solução fisiológica de Demerec, transferidas para lâmina contendo uma gota de orceína lacto-acética. O restante do procedimento foi igual ao descrito para gânglios cerebrais.

3.7. Análise dos órgão reprodutores

Fêmeas e machos adultos tratados foram dissecados em solução fisiológica de Demerec e seus tratos reprodutivos observados comparativamente aos de indivíduos controle. A análise foi feita ao microscópio estereoscópico e ao microscópico, esta última em lâminas preparadas com partes do aparelho reprodutor.

As análises de cromossomos e órgãos reprodutores foram realizados na quinta geração de tratamento para evitar o acúmulo de trabalho com moscas da 10ª. geração.

3.8. Efeito combinado da cafeína e íon estanoso sobre a produtividade

Na realização destes experimentos foram utilizados além do meio controle, de banana-agar, os seguintes meios, variáveis quanto à sua composição:

t_4= 2000 ug de cafeína por ml de meio de cultura

Sn_1= 500 ug de íon estanoso por ml de meio de cultura

Sn_2= 2000 ug de íon estanoso por ml de meio de cultura

$Sn_1 + t_4$= 500 ug de íon estanoso + 2000 ug de cafeína por ml de meio

$Sn_2 + t_4$= 2000 ug de íon estanoso + 2000ug de cafeína por ml de meio

Os detalhes da técnica deste experimento são os mesmos descritos para o experimento com cafeína (item 3.1).

4. Reagentes Utilizados

Foi utilizada a cafeína anidra, P.A. (1,3,7-trimetilxantina) - Reagen - Quimibrás Indústrias Químicas S.A., Brazilian Industry e o íon estanoso ($SnCl_2.H_2O$) da Reagente Baker Analyzed (EUA), Química Moura Brasil S.A. (Brasil).

5. Análise Estatística

A análise estatística dos dados deste trabalho envolveu:

A. Para dados de produtividade em cruzamentos em massa

1. Estatísticas Descritivas sobre os dados de produtividade.
2. Análise de Variância (ANOVA) para os dados transformados (raiz quadrada).

B. Para dados de produtividade em cruzamentos por casal e híbridos da 10ª. geração

1. Análise exploratória de dados e ajuste de modelo linear.
2. Análise de variância aplicada a dados transformados (raiz quadrada).

C. Para dados de longevidade

1. Análise de sobrevivência (COX, 1972; SOARES & BARTMAN, 1983).
2. Teste de Cox-Mantel (COX, 1972)

D. Para dados do efeito combinado da cafeína e íon estanoso

1. Análise exploratória de dados
2. Análise de Variância para dados transformados (raiz quadrada) e ajuste do modelo linear (NETER & WASSERMAN, 1974; PERES & SALDIVA, 1983).

III. RESULTADOS

1. Efeito da Cafeína sobre a Produtividade em Cruzamentos em Massa, em 10 Gerações

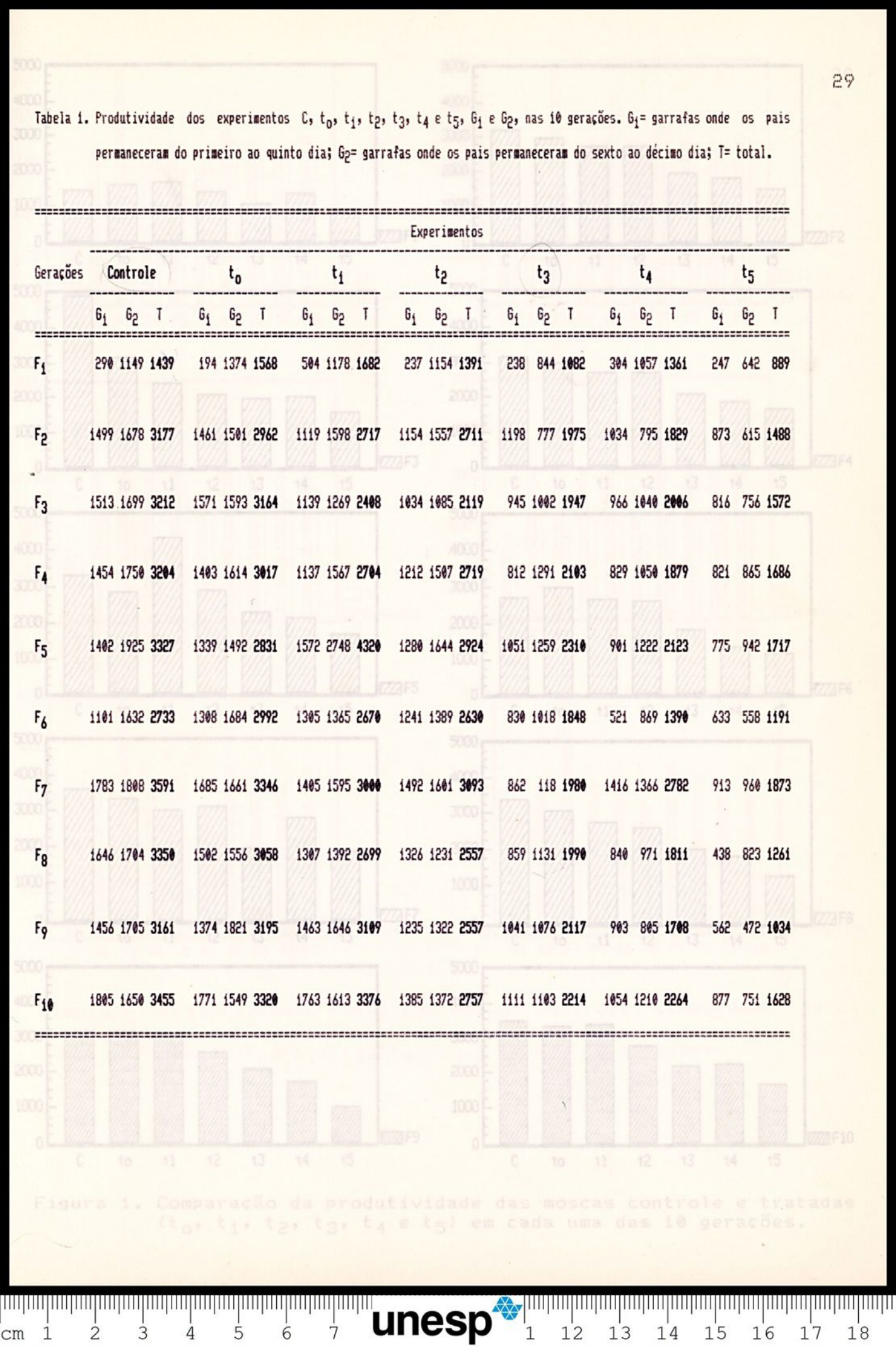
A produtividade das moscas controle e tratadas com diferentes concentrações de cafeína, isto é, t_0= 50 ug/ml, t_1= 100 ug/ml, t_2= 1000 ug/ml, t_3= 1500 ug/ml, t_4= 2000 ug/ml e t_5= 2500 ug/ml, foi analisada em 10 gerações consecutivas. Em cada geração, os descendentes, machos e fêmeas, foram separados, contados e utilizados para a montagem da próxima geração. Os resultados, por tipo de experimento, geração e garrafa estão apresentados na Tabela 1.

Podemos observar na Tabela 1 e Figura 1 que, à vista dos números, a produtividade das moscas controle foi maior que a das moscas dos outros meios, em todas as gerações. Constituem exceção: a primeira, na qual a produtividade foi menor que a dos meios t_0 e t_1, a quinta em que foi menor que a do meio t_1, a sexta em que foi menor que a do meio t_0 e a nona em que a produtividade do meio C foi semelhante à dos meios t_0 e t_1. As menores produtividades foram obtidas em todas as garrafas que continham o meio t_5. Uma comparação da produtividade total de cada experimento, por geração, com a produtividade do controle é apresentada na Figura 2.

A representação gráfica da produtividade, na Figura 3, mostra, novamente, que essa característica nas moscas controle é superior à dos outros experimentos e que, de modo geral a produtividade é inversamente proporcional à concentração de cafeína no meio de cultura, isto é, quanto maior a concentração de cafeína

Tabela 1. Produtividade dos experimentos C, t_0, t_1, t_2, t_3, t_4 e t_5, G_1 e G_2, nas 10 gerações. G_1= garrafas onde os pais permaneceram do primeiro ao quinto dia; G_2= garrafas onde os pais permaneceram do sexto ao décimo dia; T= total.

Gerações	Experimentos																	
	Controle			t_0			t_1			t_2			t_3			t_4			t_5		
	G_1	G_2	T	G_1	G_2	T	G_1	G_2	T	G_1	G_2	T	G_1	G_2	T	G_1	G_2	T	G_1	G_2	T
F_1	290	1149	1439	194	1374	1568	504	1178	1682	237	1154	1391	238	844	1082	304	1057	1361	247	642	889
F_2	1499	1678	3177	1461	1501	2962	1119	1598	2717	1154	1557	2711	1198	777	1975	1034	795	1829	873	615	1488
F_3	1513	1699	3212	1571	1593	3164	1139	1269	2408	1034	1085	2119	945	1002	1947	966	1040	2006	816	756	1572
F_4	1454	1750	3204	1403	1614	3017	1137	1567	2704	1212	1507	2719	812	1291	2103	829	1050	1879	821	865	1686
F_5	1402	1925	3327	1339	1492	2831	1572	2748	4320	1280	1644	2924	1051	1259	2310	901	1222	2123	775	942	1717
F_6	1101	1632	2733	1308	1684	2992	1305	1365	2670	1241	1389	2630	830	1018	1848	521	869	1390	633	558	1191
F_7	1783	1808	3591	1685	1661	3346	1405	1595	3000	1492	1601	3093	862	118	1980	1416	1366	2782	913	960	1873
F_8	1646	1704	3350	1502	1556	3058	1307	1392	2699	1326	1231	2557	859	1131	1990	840	971	1811	438	823	1261
F_9	1456	1705	3161	1374	1821	3195	1463	1646	3109	1235	1322	2557	1041	1076	2117	903	805	1708	562	472	1034
F_{10}	1805	1650	3455	1771	1549	3320	1763	1613	3376	1385	1372	2757	1111	1103	2214	1054	1210	2264	877	751	1628



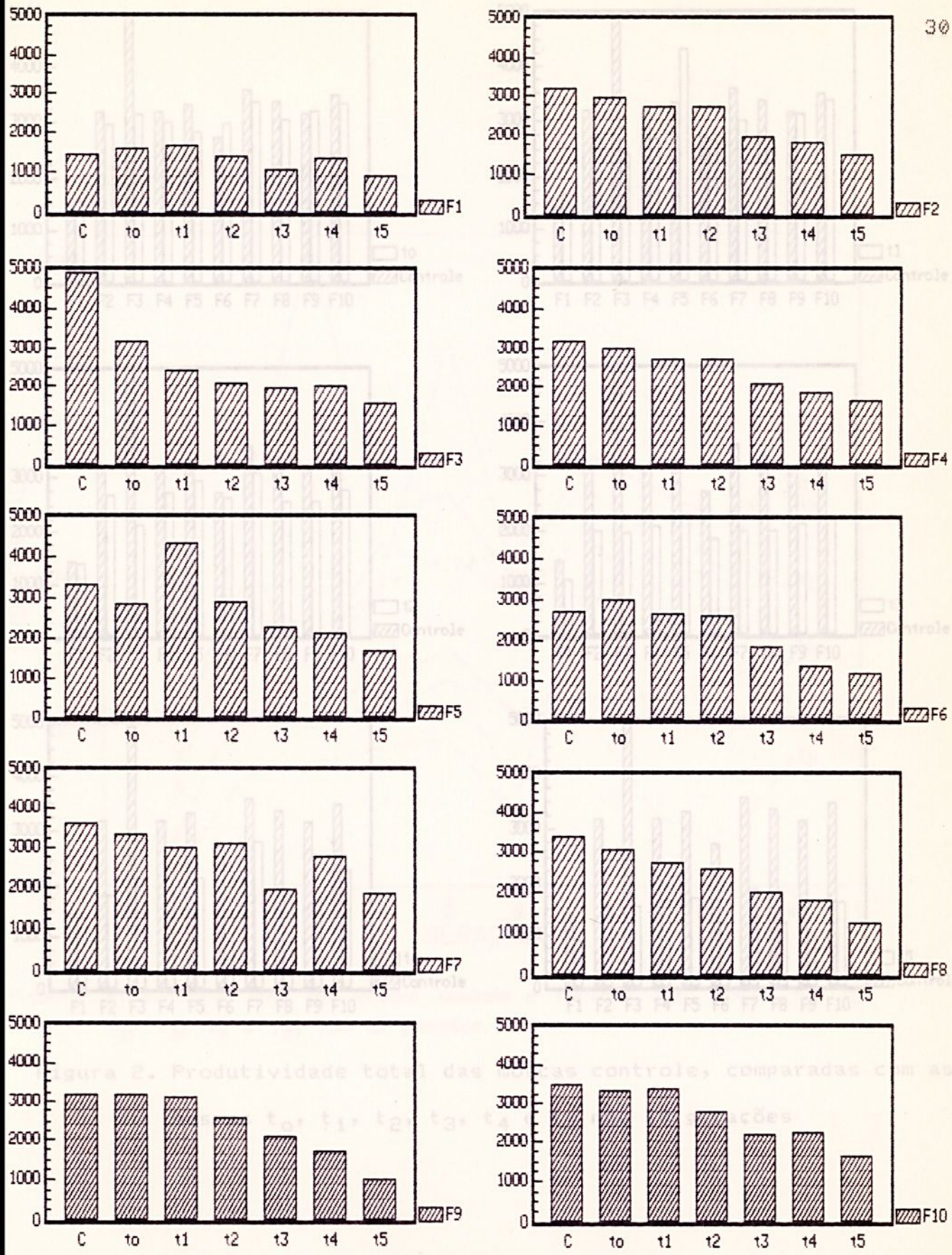


Figura 1. Comparação da produtividade das moscas controle e tratadas (t_0, t_1, t_2, t_3, t_4 e t_5) em cada uma das 10 gerações.

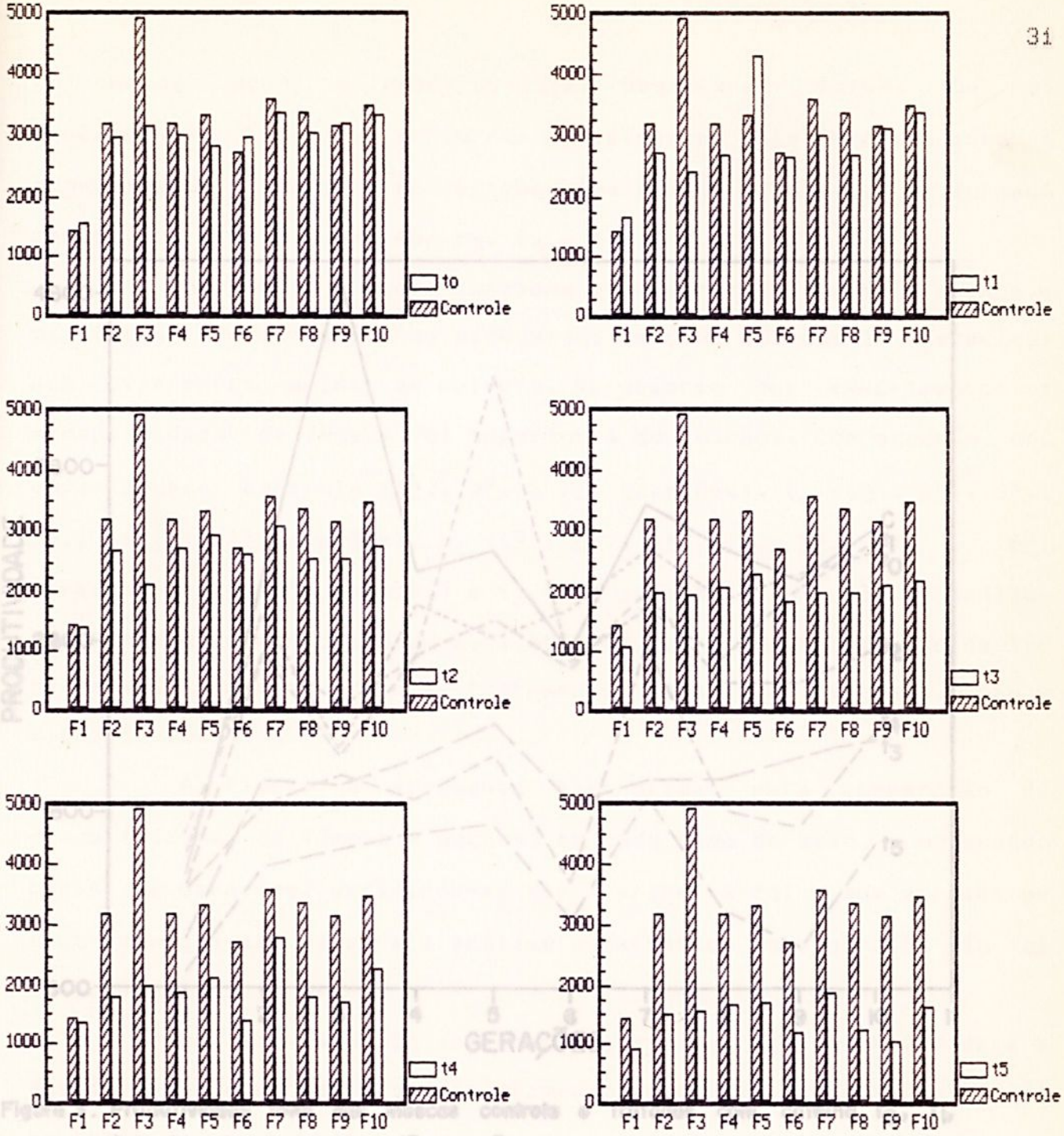


Figura 2. Produtividade total das moscas controle, comparadas com as moscas t_0, t_1, t_2, t_3, t_4 e t_5 nas 10 gerações

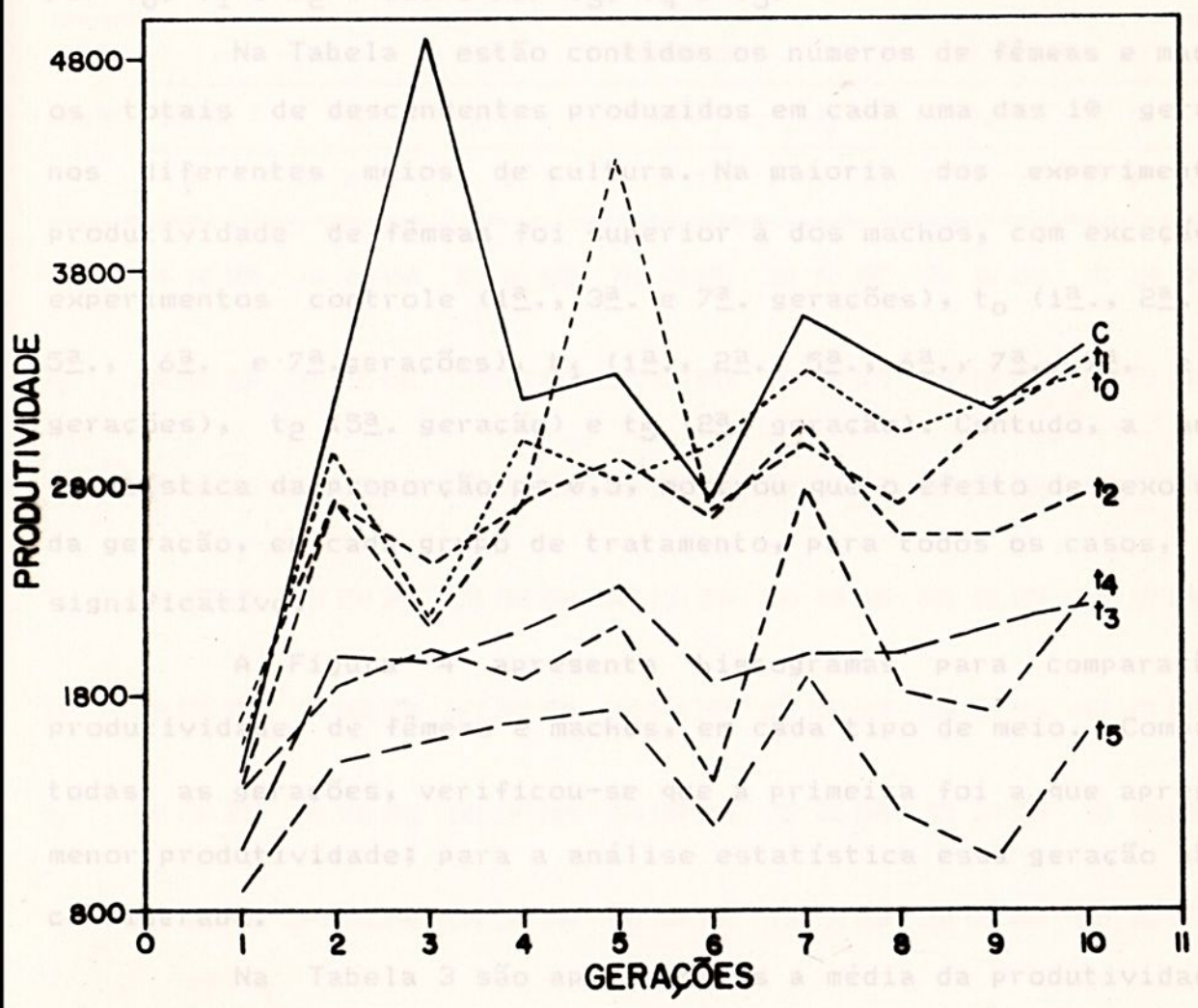


Figura 3. Produtividade total das moscas controle e tratadas com cafeína, t_0, t_1, t_2, t_3, t_4 e t_5, nas 10 gerações.

no meio, menor a produtividade. Observa-se, porém, que os experimentos tratados podem ser divididos em dois grupos quanto à proximidade do número de descendentes nas 10 gerações. Um formado por t_0, t_1 e t_2 e outro por t_3, t_4 e t_5.

Na Tabela 2 estão contidos os números de fêmeas e machos e os totais de descendentes produzidos em cada uma das 10 gerações, nos diferentes meios de cultura. Na maioria dos experimentos a produtividade de fêmeas foi superior à dos machos, com exceção dos experimentos controle (1ª., 3ª. e 7ª. gerações), t_0 (1ª., 2ª., 3ª., 5ª., 6ª. e 7ª.gerações), t_1 (1ª., 2ª., 5ª., 6ª., 7ª., 9ª. e 10ª. gerações), t_2 (5ª. geração) e t_5 (2ª. geração). Contudo, a análise estatística da proporção p= 0,5, mostrou que o efeito de sexo dentro da geração, em cada grupo de tratamento, para todos os casos, não é significativo.

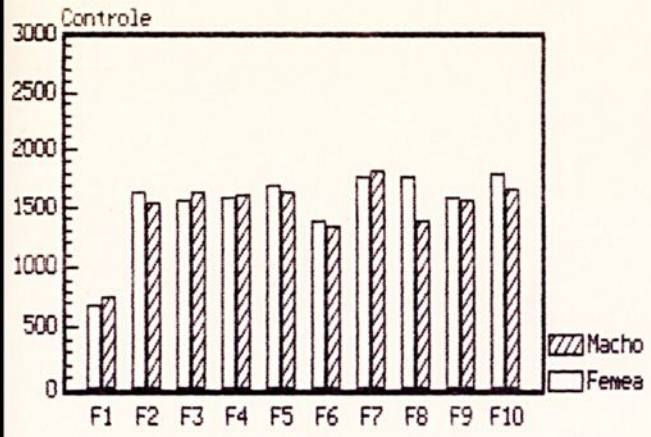
A Figura 4 apresenta histogramas para comparação da produtividade de fêmeas e machos, em cada tipo de meio. Comparando todas as gerações, verificou-se que a primeira foi a que apresentou menor produtividade; para a análise estatística essa geração não foi considerada.

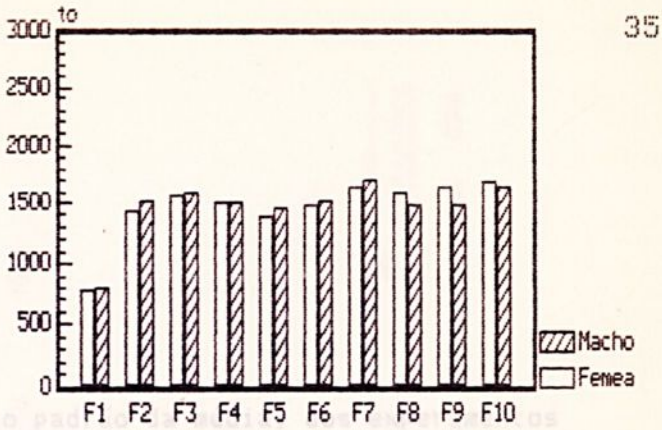
Na Tabela 3 são apresentados a média da produtividade e o desvio padrão da média dos experimentos controle e tratados, nas 10 gerações.

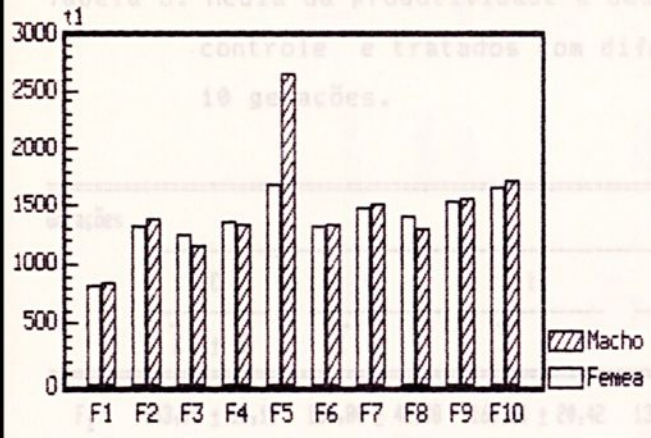
A Figura 5 é uma representação visual dos resultados obtidos com os dados transformados, para comparação dos tratamentos, fixando-se a geração, e aplicando a ANOVA e as comparações múltiplas de Tuckey. A análise dessa Figura mostra um número variável de três a seis grupos, por geração, sendo que os tratamentos dentro de cada grupo não diferem significativamente entre si. A comparação

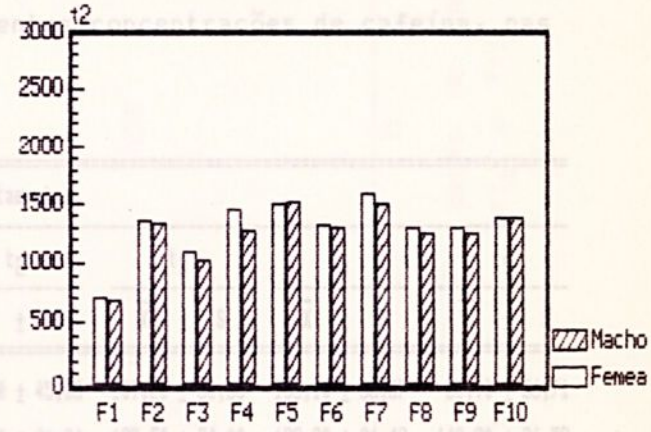
Tabela 2. Número de fêmeas (F) e machos (M) e total (T) das moscas controle e tratadas, nas 10 gerações.

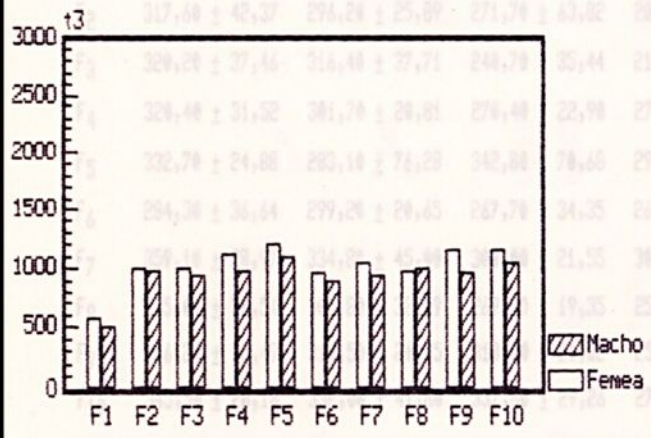
Gerações	Experimentos																	
	Controle			t_0			t_1			t_2			t_3			t_4			t_5		
	F	M	T	F	M	T	F	M	T	F	M	T	F	M	T	F	M	T	F	M	T
F_1	690	749	1439	767	801	1568	833	849	1682	711	680	1391	571	511	1082	700	661	1361	471	418	889
F_2	1628	1549	3177	1441	1521	2962	1323	1394	2717	1375	1336	2711	995	980	1975	940	889	1829	729	759	1488
F_3	1577	1635	3212	1566	1598	3164	1242	1166	2408	1098	1021	2119	1006	941	1947	1060	946	2006	853	719	1572
F_4	1601	1603	3204	1511	1506	3017	1371	1333	2704	1455	1264	2719	1113	990	2103	1023	856	1879	944	742	1686
F_5	1702	1625	3327	1376	1455	2831	1673	2647	4320	1493	1431	2924	1217	1093	2310	1210	913	2123	1018	699	1717
F_6	1386	1347	2733	1480	1512	2992	1321	1349	2670	1328	1302	2630	953	895	1848	881	509	1390	709	482	1191
F_7	1776	1815	3591	1643	1703	3346	1470	1530	3000	1586	1507	3093	1048	932	1980	1447	1335	2782	1021	852	1873
F_8	1760	1590	3350	1583	1475	3058	1404	1295	2699	1302	1255	2557	992	998	1990	934	877	1811	647	614	1261
F_9	1598	1563	3161	1635	1560	3195	1543	1566	3109	1307	1250	2557	1168	949	2117	938	770	1708	523	511	1034
F_{10}	1787	1668	3455	1679	1641	3320	1660	1716	3376	1380	1377	2757	1160	1054	2214	1142	1122	2264	821	807	1628

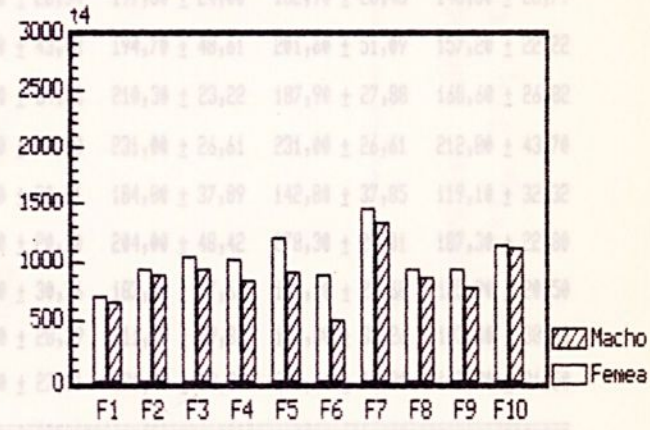












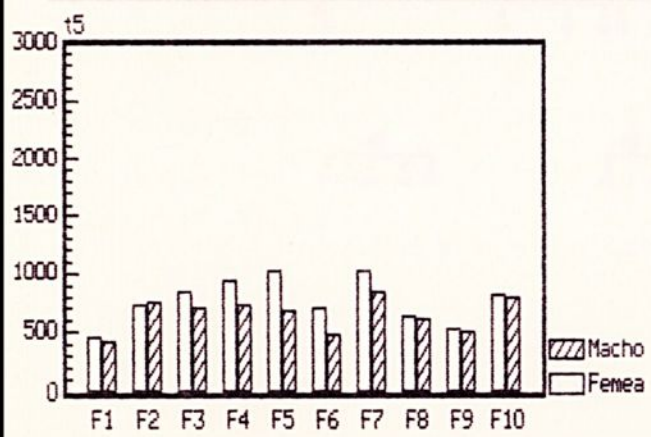


Figura 4. Produtividade total de fêmeas e machos das moscas controle e tratadas, nas 10 gerações.

Tabela 3. Média da produtividade e desvio padrão da média, dos experimentos controle e tratados com diferentes concentrações de cafeína, nas 10 gerações.

Gerações	Tratamentos						
	C	t_0	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5
	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$
F_1	143,90 ± 16,15	166,80 ± 42,08	168,20 ± 20,42	139,10 ± 45,83	109,20 ± 50,56	136,10 ± 36,67	88,90 ± 56,71
F_2	317,60 ± 42,37	296,20 ± 25,89	271,70 ± 63,82	281,10 ± 26,34	197,50 ± 24,00	182,90 ± 26,43	148,80 ± 26,79
F_3	320,20 ± 37,46	316,40 ± 37,71	240,70 ± 35,44	214,90 ± 43,08	194,70 ± 48,61	201,60 ± 51,09	157,20 ± 22,22
F_4	320,40 ± 31,52	301,70 ± 20,81	270,40 ± 22,90	271,90 ± 34,25	210,30 ± 23,22	187,90 ± 27,88	168,60 ± 26,82
F_5	332,70 ± 24,88	283,10 ± 76,28	342,80 ± 70,68	292,40 ± 27,88	231,00 ± 26,61	231,00 ± 26,61	212,80 ± 43,70
F_6	284,30 ± 36,64	299,20 ± 20,65	267,70 ± 34,35	263,00 ± 20,21	184,80 ± 37,89	142,80 ± 37,85	119,10 ± 32,32
F_7	359,10 ± 28,97	334,80 ± 45,00	300,00 ± 21,55	308,30 ± 20,10	204,00 ± 48,42	278,30 ± 29,01	187,30 ± 22,80
F_8	335,00 ± 30,54	305,80 ± 32,59	269,90 ± 19,35	255,70 ± 30,76	187,40 ± 37,64	181,10 ± 23,68	125,90 ± 20,50
F_9	316,20 ± 35,49	319,50 ± 20,45	310,90 ± 21,82	255,70 ± 28,39	211,70 ± 29,82	162,80 ± 35,26	103,40 ± 38,86
F_{10}	345,50 ± 28,18	332,00 ± 41,60	337,60 ± 29,26	275,70 ± 27,81	221,40 ± 23,82	226,40 ± 17,30	162,80 ± 21,50

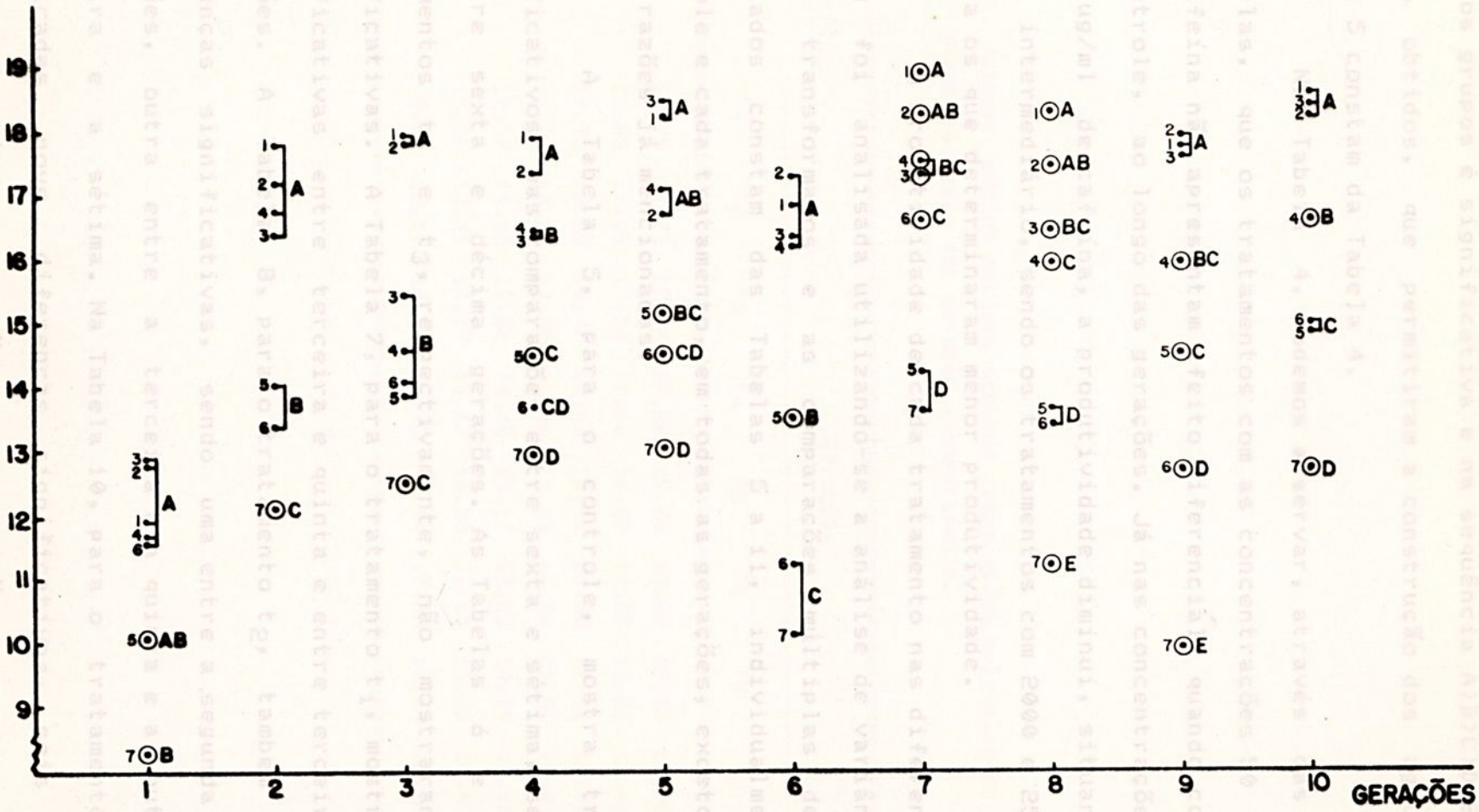


Figura 5. Grupos obtidos através das comparações múltiplas de TUKEY, dentro de cada geração, nos diferentes experimentos. 1=controle; 2=t_0, 3=t_1, 4=t_2, 5=t_3, 6=t_4 e 7=t_5

entre os grupos é significativa e na sequência A>B>C>D>E. Os valores médios obtidos, que permitiram a construção dos agrupamentos da Figura 5 constam da Tabela 4.

Na Tabela 4, podemos abservar, através das comparações múltiplas, que os tratamentos com as concentrações 50 e 100 ug/ml de cafeína não apresentam efeito diferencial, quando comparados com o controle, ao longo das gerações. Já nas concentrações de 1000 e 1500 ug/ml de cafeína, a produtividade diminui, situando-se a um nível intermediário, sendo os tratamentos com 2000 e 2500 ug/ml de cafeína os que determinaram menor produtividade.

A produtividade de cada tratamento nas diferentes gerações também foi analisada utilizando-se a análise de variância para os dados transformados e as comparações múltiplas de Tukey. Os resultados constam das Tabelas 5 a 11, individualmente para o controle e cada tratamento, em todas as gerações, exceto a primeira, pelas razões já mencionadas.

A Tabela 5, para o controle, mostra três valores significativos nas comparações entre sexta e sétima, sexta e oitava e entre sexta e décima gerações. As Tabelas 6 e 9, para os tratamentos t_0 e t_3, respectivamente, não mostraram alterações significativas. A Tabela 7, para o tratamento t_1, mostra diferenças significativas entre terceira e quinta e entre terceira e décima gerações. A Tabela 8, para o tratamento t_2, também mostra três diferenças significativas, sendo uma entre a segunda e terceira gerações, outra entre a terceira e a quinta e a outra entre a terceira e a sétima. Na Tabela 10, para o tratamento t_4, foram verificadas nove diferenças significativas, seis das quais envolveram a sétima geração: na comparação com a segunda, terceira,

Tabela 4. Valores médios obtidos segundo comparações múltiplas de Tuckey, para a produtividade, por geração e experimento.

Experimentos	Gerações									
	F_1	F_2	F_3	F_4	F_5	F_6	F_7	F_8	F_9	F_{10}
C	11,98	17,78	17,86	17,88	18,23	16,83	18,43	18,28	17,75	18,57
t_o	12,83	17,19	17,76	17,36	16,68	17,29	18,26	17,46	17,86	18,19
t_1	12,95	16,38	15,47	16,43	18,42	16,33	17,31	16,42	17,62	18,36
t_2	11,64	16,75	14,58	16,46	17,08	16,20	17,55	15,96	15,97	16,58
t_3	10,12	14,03	13,86	14,48	15,17	13,53	14,19	13,62	14,51	14,86
t_4	11,56	13,49	14,09	13,67	14,50	11,85	15,66	13,43	12,68	15,03
t_5	8,33	12,15	12,51	12,95	13,64	10,22	13,66	11,18	9,96	12,73

Tabela 5. Valores das comparações múltiplas de Tukey para produtividade das moscas controle, nas 10 gerações, para DMS= 2,82 (diferença significativa a 1%**) e DMS= 2,38 (diferença significativa a 5%*).

	Gerações							
	3	4	5	6	7	8	9	10
2	0.11	0.14	0.63	1.74	1.62	0.71	0.05	1.11
3		0.03	0.52	1.85	1.51	0.60	0.16	1.00
4			0.49	1.88	1.48	0.57	0.19	0.97
5				2.37	0.99	0.08	0.68	0.48
6					3.36**	2.45*	1.69	2.85*
7						0.91	1.67	0.51
8							0.76	0.40
9								1.16

Tabela 6. Valores das comparações múltiplas de Tukey para produtividade das moscas t_o, nas 10 gerações, para DMS= 4,15 (diferença significativa a 1%**) e DMS= 3,51 (diferença significativa a 5%*).

	Gerações							
	3	4	5	6	7	8	9	10
2	0.81	0.23	0.73	0.13	1.51	0.38	0.95	1.41
3		0.58	1.54	0.68	0.70	0.43	0.14	0.60
4			0.96	0.10	1.28	0.15	0.72	1.18
5				0.86	2.24	1.11	1.68	2.14
6					1.38	0.25	0.82	1.28
7						1.13	0.56	0.10
8							0.57	1.03
9								0.46

Tabela 7. Valores das comparações múltiplas de Tukey para produtividade das moscas t_1, nas 10 gerações, para DMS= 3,87 (diferença significativa a 1%**) e DMS= 3,27 (diferença significativa a 5%*).

	Gerações							
	3	4	5	6	7	8	9	10
2	1.29	0.07	2.89	0.07	1.31	0.05	1.74	2.79
3		1.36	4.18**	1.22	2.60	1.34	3.03	4.08**
4			2.82	0.14	1.24	0.02	1.67	2.72
5				2.96	1.58	2.84	1.15	0.10
6					1.38	0.12	1.81	2.86
7						1.26	0.43	1.48
8							1.69	2.74
9								1.05

Tabela 8. Valores das comparações múltiplas de Tukey para produtividade das moscas t_2, nas 10 gerações, para DMS= 3,61 (diferença significativa a 1%**) e DMS= 3,05 (diferença significativa a 5%*).

	Gerações							
	3	4	5	6	7	8	9	10
2	3.06*	0.41	0.45	0.78	1.15	1.13	1.12	0.25
3		2.65	3.51*	2.28	4.21**	1.93	1.94	2.81
4			0.86	0.37	1.56	0.72	0.71	0.16
5				1.23	0.70	1.58	1.57	0.70
6					1.93	0.35	0.34	0.53
7						2.28	2.27	1.40
8							0.01	0.88
9								0.87

Tabela 9. Valores das comparações múltiplas de Tukey para produtividade das moscas t3, nas 10 gerações, para DMS= 4,81 (diferença significativa a 1%**) e DMS= 4,06 (diferença significativa a 5%*).

	Gerações							
	3	4	5	6	7	8	9	10
2	0.24	0.65	1.62	0.70	0.26	1.06	0.72	1.19
3		0.89	1.86	0.46	0.50	0.82	0.96	1.43
4			0.97	1.35	0.39	1.71	0.07	0.54
5				2.32	1.36	2.68	0.90	0.43
6					0.96	0.36	1.42	1.89
7						1.32	0.46	0.93
8							1.78	2.25
9								0.47

quarta, sexta, oitava e nona. As outras envolveram as comparações entre a sexta geração e a quinta, a sexta e a décima e entre a décima e a nona gerações. E finalmente, na Tabela 11, referente a t_5, das sete comparações significativas, cinco envolveram a nona geração, nas comparações com terceira, quarta, quinta, sétima e décima. As demais ocorreram entre a sexta e sétima e entre a sétima e oitava.

2. Efeito da Cafeína sobre a Produtividade em Cruzamentos por Casal

2.1. Moscas da 10ª. geração

A produtividade nos 20 tubos contendo meio de cultura controle, preparados com moscas da décima geração de cada experimento, foi computada diariamente, separadamente por sexo, na sequência dos repiques. Os resultados, somados por tipo de experimento e por sexo estão contidos na Tabela 12.

À vista dos números, a produtividade total em cada experimento foi menor nos primeiros tubos em todos os casos. A maior produtividade para os experimentos C, t_0, t_1 e t_3 ocorreu nos terceiros tubos, em t_2 e t_5, não diferiu entre segundos, terceiros e quartos tubos e para t_4 não diferiu entre segundos e terceiros tubos. Com exceção de t_2 e t_5, em todos os demais experimentos houve uma queda da produtividade nos quartos tubos.

Como a produtividade de fêmeas e machos não mostrou diferença significativa em nenhum dos experimentos, foi possível trabalhar, com os dados totais, aplicando-se a análise exploratória de dados e análise de variância aplicada a dados transformados. A

Tabela 10. Valores das comparações múltiplas de Tukey para produtividade das moscas t_4, nas 10 gerações, para DMS= 3,62 (diferença significativa a 1%**) e DMS= 3,06 (diferença significativa a 5%*).

	Gerações							
	3	4	5	6	7	8	9	10
2	0.84	0.27	1.46	2.21	4.47**	0.10	1.07	2.17
3		0.57	0.62	3.05	3.63*	0.94	1.91	1.33
4			1.19	2.48	4.20**	0.37	1.34	1.90
5				3.67**	3.01	1.56	2.53	0.71
6					6.68**	2.11	1.14	4.38**
7						4.57**	5.54**	2.30
8							0.97	2.27
9								3.24*

Tabela 11. Valores das comparações múltiplas de Tukey para produtividade das moscas t_5, nas 10 gerações, para DMS= 3,85 (diferença significativa a 1%**) e DMS= 3,25 (diferença significativa a 5%*).

	Gerações							
	3	4	5	6	7	8	9	10
2	0.47	1.11	1.28	1.85	2.11	1.40	3.15	0.77
3		0.64	0.81	2.32	1.64	1.87	3.62*	0.30
4			0.17	2.96	1.00	2.51	4.26**	0.34
5				3.13	0.83	2.68	4.43**	0.51
6					3.96**	0.45	1.30	2.62
7						3.51*	5.26**	1.34
8							1.75	2.17
9								3.92**

Tabela 12. Produtividade, em meio controle, de moscas da geração F_{10}, em cruzamentos por casal.

Experimento	Produtividade													
	1º tubos			2º tubos			3º tubos			4º tubos			Subtotal		Total
	F	M	T	F	M	T	F	M	T	F	M	T	F	M	T
C	2	-	2	122	84	206	254	258	512	170	173	343	548	515	1063
t_0	12	3	15	133	111	244	221	201	422	173	168	341	539	483	1022
t_1	-	-	-	160	129	289	234	259	493	138	151	289	532	539	1071
t_2	20	15	35	206	210	416	232	217	449	215	206	421	673	648	1321
t_3	12	12	24	172	166	338	252	250	501	183	166	349	619	594	1213
t_4	37	51	88	224	242	466	228	235	463	158	164	322	647	692	1339
t_5	10	10	20	123	156	279	129	137	266	128	135	263	390	438	828

ANOVA aplicada aos dados transformados, para 139 graus de liberdade foi P(F>6,26) < 0,05, portanto, mostrando que existe diferença significativa entre os tratamentos.

Os resultados das comparações Múltiplas de Tukey estão apresentados na Tabela 13 e mostram que as diferenças detectadas pela análise de variância obedecem à seguinte ordem: $t_4 > t_0$; $t_5 < t_1$; $t_5 < t_2$; $t_5 < t_3$; $t_5 < t_4$. Os demais tratamentos são considerados estatisticamente iguais, não apresentando diferenças significativas entre as médias. Contudo, à vista dos números na Tabela 12, t_5 é também menor que t_0 e C.

2.2. Produtividade em cruzamentos de moscas tratadas da geração F_{10} com moscas controle

Os resultados destes cruzamentos, constam da Tabela 14.

A análise estatística mostrou que não há diferença significativa na proporção sexual dos descendentes em cada tipo de cruzamento. Porisso, os dados foram agrupados e transformados para avaliação do modelo linear da análise de variância. Os resultados para 119 GL foram P(F>1,05) > 0,05 indicando não haver, assim, em média, diferença de produtividade entre os cruzamentos.

Contudo, à vista dos números, observa-se, em cruzamentos com t_2 e com t_5, que a direção que usa machos tratados produz menor número de descendentes que o recíproco.

A Figura 6 mostra a produtividade total para moscas da 10ª. geração, colocadas em meio controle, e para os cruzamentos com o controle.

Tabela 13. Resultados das comparações múltiplas de Tuckey para produtividade de moscas controle e tratadas da 10ª. geração, colocadas em meio de cultura controle. D.M.S. (diferença mínima significativa)= 1,07; *= diferença significativa a 0,05.

Tratamentos	t_o	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5
C	0,21	0,23	0,82	0,56	0,93	0,87
t_o		0,44	1,03	0,77	1,14*	0,65
t_1			0,59	0,33	0,69	1,10*
t_2				0,26	0,10	1,64*
t_3					0,37	1,43*
t_4						1,79*

Tabela 14. Produtividade, em meio controle, de fêmeas e machos da geração F_{10}, dos experimentos t_0, t_2 e t_5, em cruzamentos com moscas controle da mesma geração.

Experimento	Produtividade														
	1º tubos			2º tubos			3º tubos			4º tubos			Subtotal		Total
F M	F	M	T	F	M	T	F	M	T	F	M	T	F	M	T
Controle	2	-	2	122	84	206	254	258	512	170	173	343	548	515	1063
C x t_o	1	1	2	152	125	277	232	237	469	146	157	303	531	520	1051
t_o x C	6	1	7	152	125	277	226	224	450	173	151	324	557	501	1058
C x t_2	-	2	2	124	114	238	225	271	496	189	158	347	538	545	1083
t_2 x C	4	3	7	207	179	386	240	239	479	160	131	291	611	552	1163
C x t_5	5	2	7	128	133	261	195	186	381	183	173	356	511	494	1005
t_5 x C	0	0	0	135	175	310	237	254	491	181	176	357	553	605	1158

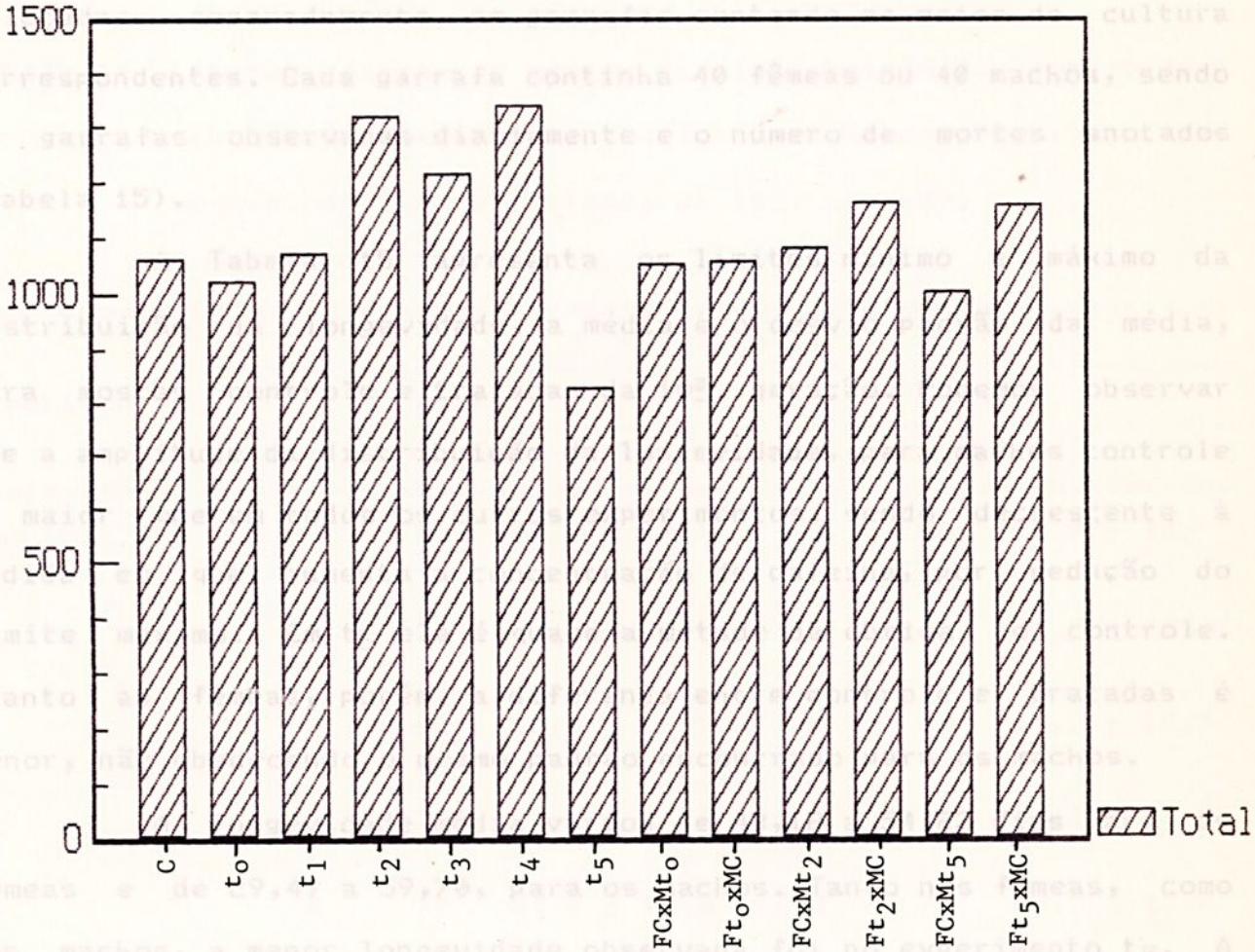


Figura 6. Produtividade total das moscas controle e tratadas e dos intercruzamentos da 10ª. geração, em meio de cultura controle. F= fêmeas; M= machos.

3. Efeito da Cafeína sobre a Longevidade, após 10 Gerações

As moscas recém-nascidas da 10ª. geração foram coletadas e colocadas, separadamente, em garrafas contendo os meios de cultura correspondentes. Cada garrafa continha 40 fêmeas ou 40 machos, sendo as garrafas observadas diariamente e o número de mortes anotados (Tabela 15).

A Tabela 15 apresenta os limites mínimo e máximo da distribuição da longevidade, a média e o desvio padrão da média, para moscas controle e tratadas da 10ª. geração. Podemos observar que a amplitude da distribuição da longevidade, para machos controle é maior que em todos os outros experimentos, sendo decrescente à medida em que aumenta a concentração de cafeína, por redução do limite máximo. Em t_5 ela é quase a metade da obtida no controle. Quanto às fêmeas, porém, a diferença entre controle e tratadas é menor, não obedecendo o mesmo padrão encontrado para os machos.

A longevidade média variou de 43,12 a 54,23 dias para as fêmeas e de 29,49 a 59,70, para os machos. Tanto nas fêmeas, como nos machos, a menor longevidade observada foi no experimento t_5. A maior longevidade foi observada nos experimentos t_3 e t_1, respectivamente, para fêmeas e para machos.

A Tabela 16 mostra que a comparação da longevidade entre as fêmeas e machos, utilizando o teste de Cox-Mantel é significativa a nível de 0,01, para todos os experimentos, com exceção dos tratamentos t_2 e t_3. Devido a essa diferença entre sexos, a comparação entre experimentos foi realizada separadamente.

Nas Tabelas 17 e 18 estão apresentados os valores do Teste de Cox-Mantel e o nível descritivo, para comparação dos diferentes

Tabela 15. Limites mínimo e máximo da distribuição da longevidade (em dias), sua média e desvio padrão da média, para as moscas controle e tratadas da 10ª. geração.

Experimentos	Longevidade					
	Fêmea			Macho		
	Mínimo	Máximo	$\bar{X} \pm S$	Mínimo	Máximo	$\bar{X} \pm S$
Controle	8	80	49,9 ± 19,6	8	88	54,9 ± 20,7
t_o	9	81	45,2 ± 20,0	9	86	52,7 ± 21,9
t_1	8	82	45,8 ± 18,9	8	86	59,7 ± 19,7
t_2	13	79	50,8 ± 16,5	8	79	56,1 ± 15,8
t_3	8	79	54,2 ± 19,3	8	78	50,8 ± 19,2
t_4	8	77	47,3 ± 17,9	11	77	54,5 ± 17,7
t_5	8	76	43,1 ± 19,0	8	51	29,5 ± 11,8

Tabela 16. Valores do teste de Cox-Mantel, a nível de 0,01, para comparação da longevidade entre fêmeas e machos, nos diferentes experimentos. A estatística U/I tem distribuição aproximadamente normal padrão, sob a hipótese de que não há diferença entre experimentos. S= significativo, NS= não significativo.

Experimentos	Valores de U/I	Nível descritivo P	Significância
Controle	2,7251	0,006500	S
to	3,6453	0,002800	S
t1	5,7157	0,000010	S
t2	1,6324	0,103100	NS
t3	1,0687	0,289100	NS
t4	3,1790	0,001500	S
t5	-7,1619	0,000001	S

experimentos. A Tabela 17 refere-se às fêmeas e a Tabela 18 aos machos. Podemos observar na Tabela 17 que somente as comparações do tratamento t_5 com os demais, exceto t_0 e t_4, foram significativas.

A Tabela 18 mostra que as comparações entre o tratamento t_1 e todos os demais foram significativas, o mesmo ocorrendo com o tratamento t_5 que se apresentou altamente significativo. Além destas, foram significativas as comparações do tratamento t_0 com t_3 e t_4.

4. Efeito da Cafeína sobre a Oviposição

A oviposição de moscas acasaladas, obtidas dos experimentos controle e t_5 e colocadas em caixas de população contendo placas de Petri com meio de cultura controle, no decorrer de 13 dias (moscas de seis a 19 dias de idade) está apresentada na Tabela 19.

Os resultados mostram que a oviposição total das moscas do experimento t_5 corresponde a 38,50% da oviposição das moscas controle e que apenas no 11º dia, a oviposição de t5 foi superior numericamente à das moscas controle. O número máximo de ovos colocados, em um só dia, foi de 826 no controle e de 280 no experimento t_5.

A variação diária nos valores de oviposição das moscas controle e t5 é apresentada na Figura 7.

Tabela 17. Valores do teste de Cox-Mantel dado por U/I e o nível descritivo P, a nível de 0,05 (*) e 0,01 (**), para comparação da longevidade entre fêmeas dos diferentes experimentos.

	C	t_0	t_1	t_2	t_3	t_4
t_0	-0,8179					
	0,4122					
t_1	0,0229	1,0997				
	0,9960	0,2757				
t_2	0,6429	1,7457	0,5021			
	0,5222	0,0819	0,6171			
t_3	-0,1276	0,8466	0,5837	-0,2838		
	0,9045	0,4009	0,5619	0,7794		
t_4	-1,4451	0,3265	-0,8111	-1,8777	-1,4124	
	0,1498	0,7490	0,4179	0,0615	0,1585	
t_5	-2,9156**	-1,8213	-2,2620*	-3,4179**	3,0761**	1,6228
	0,0036	0,0688	0,0238	0,0007	0,0021	0,1052

Tabela 18. Valores do teste de Cox-Mantel dado por U/I e o nível descritivo P, a nível de 0,05 (*) e 0,01 (**), para comparação da longevidade entre machos dos diferentes experimentos.

	C	t_o	t_1	t_2	t_3	t_4
t_o	0,2141					
	0,8336					
t_1	2,8937**	2,6330**				
	0,0029	0,0085				
t_2	-0,9782	1,6324	-4,6605**			
	0,3304	0,1031	0,0000			
t_3	-1,7014	-2,3994*	-5,1889**	-0,9824		
	0,0819	0,0168	0,0000	0,3271		
t_4	-1,3967	-2,1438*	-5,0481**	1,0945	0,2494	
	0,1645	0,0324	0,0000	0,2757	0,8183	
t_5	-4,7785**	-9,5723**	-13,5974**	-13,5974**	11,0540**	11,7642**
	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tabela 19. Número diário de ovos colocados por moscas controle e t_5, em placas de Petri (P1 e P2) contendo meio de cultura controle.

Dia	Controle				t_5			
	P1	P2	T	%	P1	P2	T	%
1º	21	31	52	1,55	2	5	7	0,54
2º	193	633	826	24,63	21	51	72	5,57
3º	203	224	427	12,73	13	73	86	6,65
4º	158	189	347	10,35	54	86	140	10,83
5º	133	210	343	10,23	72	88	160	12,37
6º	64	223	287	8,56	21	39	60	4,64
7º	36	61	97	2,89	18	58	76	5,88
8º	123	139	262	7,81	34	53	87	6,73
9º	48	248	296	8,83	46	49	95	7,35
10º	71	108	179	5,34	48	71	119	9,20
11º	51	109	160	4,77	137	143	280	21,66
12º	18	18	36	1,07	26	31	57	4,41
13º	17	24	41	1,22	14	40	54	4,18
Total	1136	2217	3353		506	787	1293	

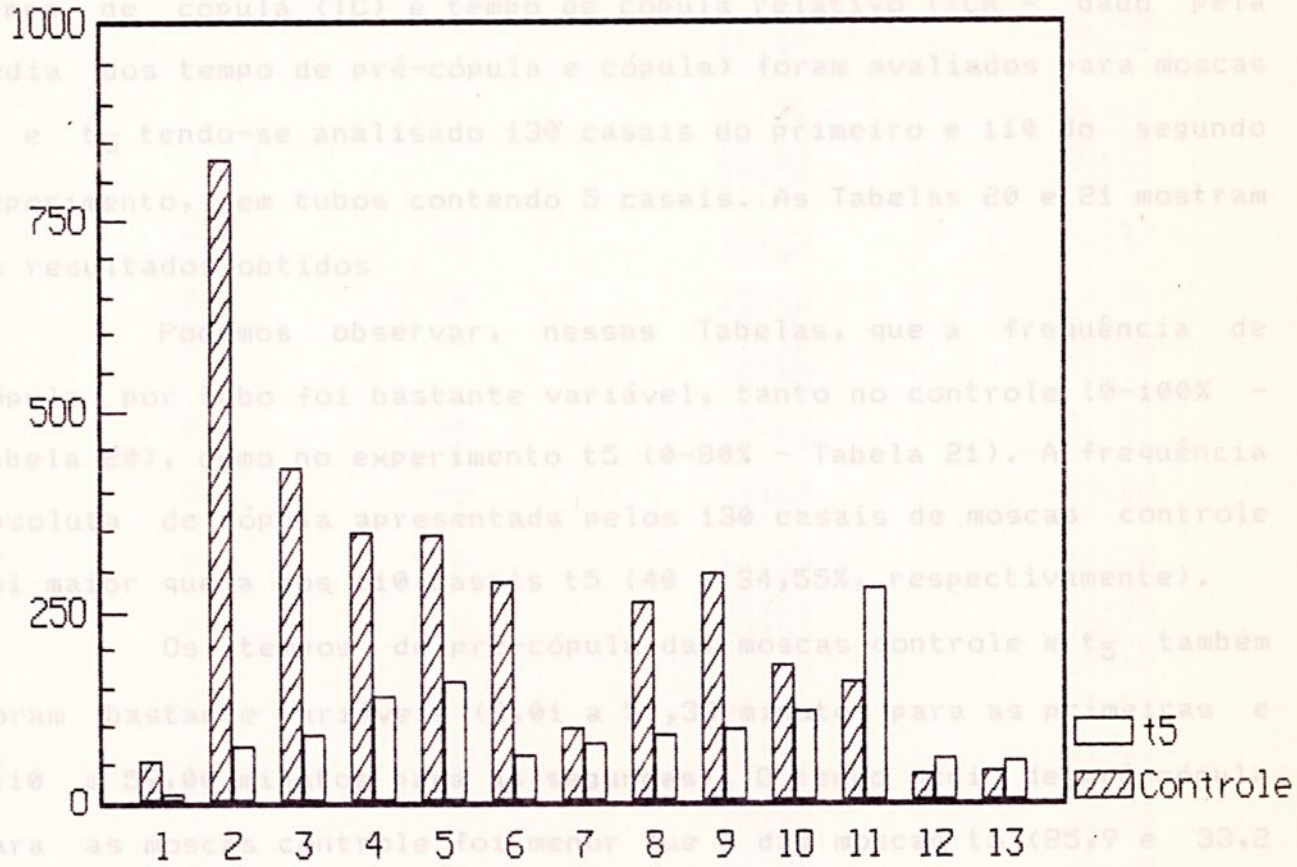


Figura 7. Observação diária da oviposição das moscas controle e t_5, em caixas de população contendo placas de Petri com meio de cultura controle.

5. Efeito da Cafeína sobre o Acasalamento

A frequência de acasalamento, o tempo de pré-cópula (TPC), tempo de cópula (TC) e tempo de cópula relativo (TCR - dado pela média dos tempo de pré-cópula e cópula) foram avaliados para moscas C e t_5 tendo-se analisado 130 casais do primeiro e 110 do segundo experimento, em tubos contendo 5 casais. As Tabelas 20 e 21 mostram os resultados obtidos

Podemos observar, nessas Tabelas, que a frequência de cópula por tubo foi bastante variável, tanto no controle (0-100% - Tabela 20), como no experimento t5 (0-80% - Tabela 21). A frequência absoluta de cópula apresentada pelos 130 casais de moscas controle foi maior que a dos 110 casais t5 (40 e 34,55%, respectivamente).

Os tempos de pré-cópula das moscas controle e t_5 também foram bastante variáveis (8,01 a 59,33 minutos para as primeiras e 8,10 a 59,00 minutos para as segundas). O tempo médio de pré-cópula para as moscas controle foi menor que o das moscas t5 (25,9 e 33,2 minutos, respectivamente).

Outro parâmetro que se apresentou bastante variável foi o tempo de cópula, tanto para as moscas controle (18,37 a 37,04 minutos), como para as moscas t5 (6,45 a 34,21 minutos). Para estas últimas, a variabilidade foi muito maior devido ao valor mínimo menor. O tempo médio de cópula para as moscas controle foi superior ao das moscas t5 (27,0 e 25,7 minutos, respectivamente).

A Figura 8 mostra os resultados comparativos dos tempos de pré-cópula e cópula e da frequência de cópula, das moscas controle e t_5.

Tabela 20. Frequência de cópula, tempo de pré-cópula e cópula (minutos), de moscas controle, em tubos com cinco casais.

Tubo	Frequência de cópula		Tempo de pré-cópula	Tempo de cópula
	Nº	%		
1	3	60	12,36 18,00 18,33	29,68 18,37 28,93
2	3	60	8,01 21,44 51,02	27,44 29,68
3	-	-	-	-
4	5	100	11,58 15,00 15,00 30,50 55,01	26,69 25,11 25,69 27,32
5	2	40	13,15 45,09	23,41
6	2	40	15,28 53,42	22,24
7	3	60	7,17 11,00 50,50	22,24 24,42
8	2	40	19,22 21,24	37,04 23,96
9	2	40	11,25 15,36	23,02 30,20
10	3	60	11,55 18,45 26,22	32,73 30,75 26,34
11	3	60	5,34 24,40 30,13	33,79 25,06 28,19
12	1	20	37,22	25,37
13	-	-	-	-
14	4	80	10,34 15,17 26,56 29,02	29,96 33,08 29,21 31,50
15	3	60	31,58 33,07 58,11	29,45 22,98
16	1	20	10,33	24,89
17	1	20	13,17	21,23
18	1	20	8,42	25,03
19	1	20	58,00	-
20	2	40	27,55 49,30	29,74 28,76
21	2	40	32,16 40,16	26,14 29,03
22	2	40	14,31 14,55	28,10 28,50
23	2	40	19,10 33,29	31,01 28,28
24	1	20	59,33	19,89
25	2	40	20,06 41,22	31,00 26,37
26	1	20	29,03	26,38
TOTAL($\bar{X}$)	52(2)		1347,45(25,9)	1213,91(27,0)

Tabela 21. Frequência de cópula, tempo de pré-cópula e cópula (minutos), de moscas t_5, em tubos com cinco casais.

Tubo	Frequência de cópula		Tempo de pré-cópula	Tempo de cópula
	Nº	%		
1	4	80	19,33 33,00 45,18 59,00	20,67 27,00 – –
2	4	80	18,34 21,48 33,35 36,00	25,06 26,00 34,21 27,10
3	2	40	8,52 36,40	26,48 21,17
4	–	–	–	–
5	3	60	9,55 30,30 32,55	18,73 25,95 6,45
6	–	–	–	–
7	3	60	24,11 24,20 39,37	33,22 31,83 26,92
8	2	40	8,10 50,00	31,90 22,18
9	1	20	33,42	29,72
10	4	80	17,55 22,23 25,02 25,21	25,62 31,34 33,17 24,11
11	3	60	43,02 53,24 55,49	– – –
12	2	60	23,50 52,22	22,50 –
13	2	40	51,27 54,48	– –
14	–	–	–	–
15	1	20	34,47	25,53
16	–	–	–	–
17	2	40	21,14 21,16	23,34 28,18
18	1	20	44,55	–
19	–	–	–	–
20	1	20	50,53	–
21	–	–	–	–
22	2	40	37,44 44,01	21,74 28,08
TOTAL ($\bar{X}$)	37(1,7)		1228,73(33,2)	698,86(25,7)

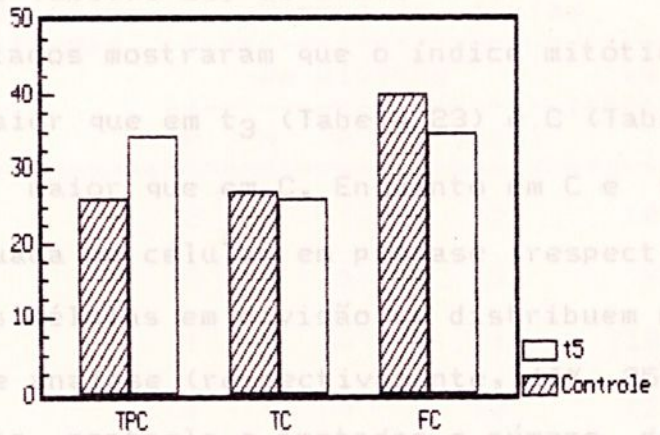


Figura 8. Comparação dos tempos de pré-cópula (TPC) e cópula (TC) e da frequência de cópula (FC), das moscas controle e t_5.

Não foi observada diferença no comportamento de corte das moscas controle e tratadas.

6. Efeito da Cafeína sobre o índice Mitótico

Dados sobre a contagem de células interfásicas e em divisão nos gânglios cerebrais de moscas controle, t_3 e t_5 constam, respectivamente, das Tabelas 22, 23 e 24.

Os resultados mostraram que o índice mitótico nas moscas t_5 (Tabela 24) é maior que em t_3 (Tabela 23) e C (Tabela 22) e o de t_3 é ligeiramente maior que em C. Enquanto em C e t_3 houve uma predominância acentuada de células em prófase (respectivamente 66,6% e 58,3%), em t_5 as células em divisão se distribuem nas fases de prófase, metáfase e anáfase (respectivamente, 40%, 25% e 31%). Nos gânglios das moscas controle e tratadas o número de células em telófase foi baixo.

A análise estatística pelo X^2, para comparação dos índices mitóticos, mostrou que a diferença entre os experimentos não é significativa.

A Figura 9 mostra, para efeito comparativo, o número total de células em prófase, metáfase, anáfase e telófase, observadas em gânglios cerebrais dos indivíduos C, t_3 e t_5.

Na Figura 10, para o mesmo fim é apresentado o índice mitótico das moscas C, t_3 e t_5.

Tabela 22. Número de células de gânglios cerebrais em divisão e em intérfase e índice mitótico, de moscas controle. P= prófase; M= metáfase; A= anáfase; T= telófase.

Indivíduo	Número de células analisadas	Número de células em divisão					Número de células em intérfase	índice mitótico (%)
		P	M	A	T	Total		
1	110	2	4	1	0	7	103	6,36
2	100	2	0	0	1	3	97	3,00
3	105	1	0	0	0	1	104	0,95
4	116	2	1	0	0	3	113	2,58
5	100	2	0	0	0	2	98	2,00
6	109	2	0	1	0	3	106	2,75
7	115	3	0	1	0	4	111	3,47
8	107	6	0	1	0	7	100	6,54
9	104	1	0	0	0	1	103	0,96
10	112	3	1	1	0	5	107	4,46
TOTAL	1078	24	6	5	1	36	1042	$\bar{X}$= 3,07

Tabela 23. Número de células de gânglios cerebrais em divisão e em intérfase e índice mitótico, de moscas t_3. P= prófase; M= metáfase; A= anáfase; T= telófase.

Indivíduo	Número de células analisadas	Número de células em divisão					Número de células em intérfase	índice mitótico (%)
		P	M	A	T	Total		
1	97	3	0	0	0	3	94	3,09
2	100	0	1	0	0	1	99	1,00
3	103	1	0	0	0	1	102	0,97
4	99	2	1	0	0	3	96	3,01
5	106	4	0	1	0	5	101	4,72
6	104	2	1	1	0	4	100	3,85
7	97	4	1	0	0	5	92	5,15
8	101	0	2	1	0	3	98	2,97
9	102	3	2	3	0	8	94	7,84
10	105	2	1	0	0	3	102	2,86
TOTAL	1014	21	9	6	0	36	978	$\bar{X}$= 3,55

Tabela 24. Número de células de gânglios cerebrais em divisão e em intérfase e índice mitótico, de moscas t_5. P= prófase; M= metáfase; A= anáfase; T= telófase.

Indivíduo	Número de células analisadas	Número de células em divisão					Número de células em intérfase	índice mitótico (%)
		P	M	A	T	Total		
1	96	1	0	3	0	4	92	4,17
2	93	5	0	2	1	8	85	8,60
3	99	3	0	0	0	3	96	3,03
4	105	5	0	2	0	7	98	6,67
5	101	0	0	0	0	0	101	0,00
6	111	0	2	1	0	3	108	2,70
7	108	1	5	2	0	8	100	7,41
8	102	2	1	2	0	5	97	4,90
9	95	2	4	1	1	8	87	8,42
10	99	2	1	3	0	6	93	6,06
TOTAL	1009	21	13	16	2	52	957	$\bar{X}$= 5,20

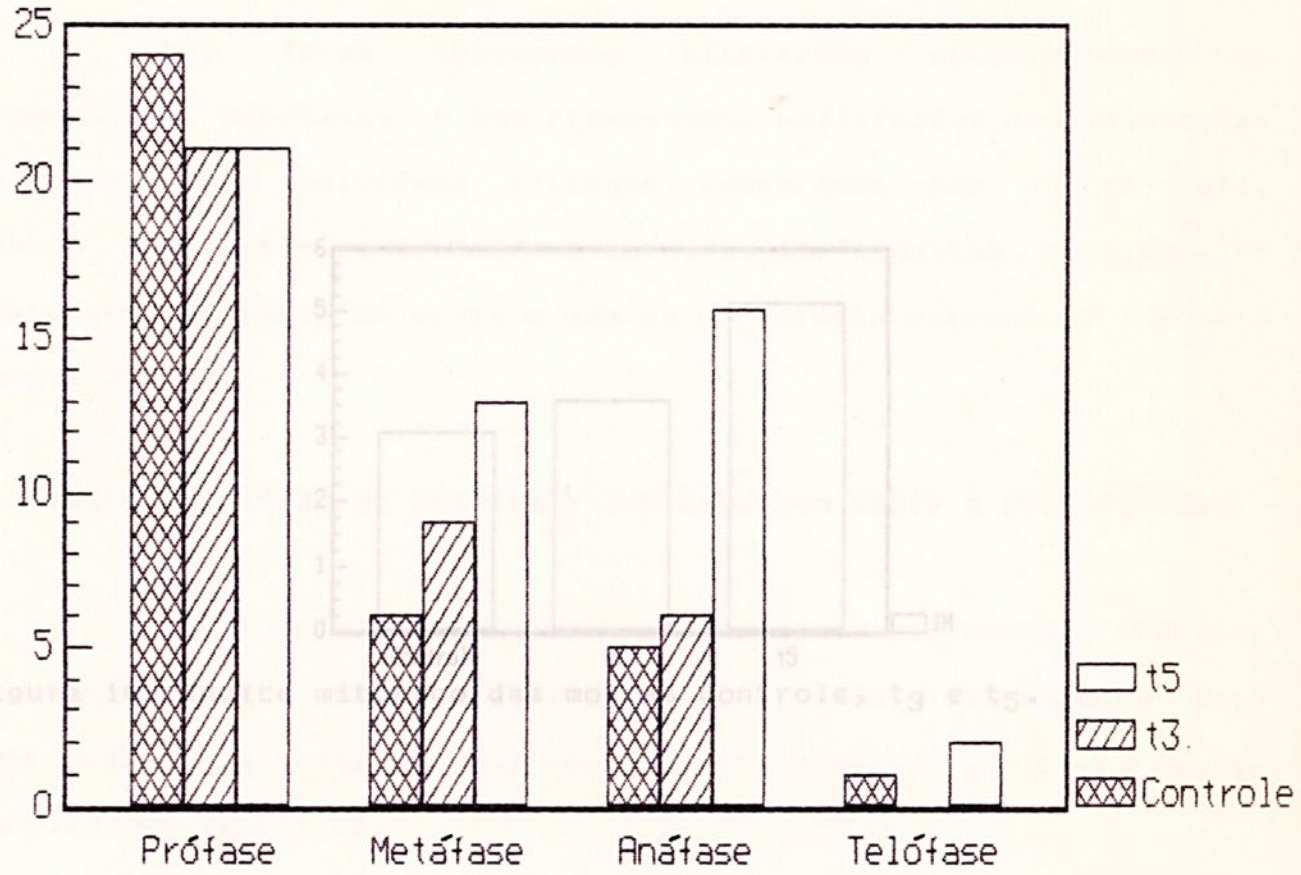


Figura 9. Número total de células em prófase, metáfase, anáfase e telófase, observadas em gânglios cerebrais dos indivíduos controle, t_3 e t_5.

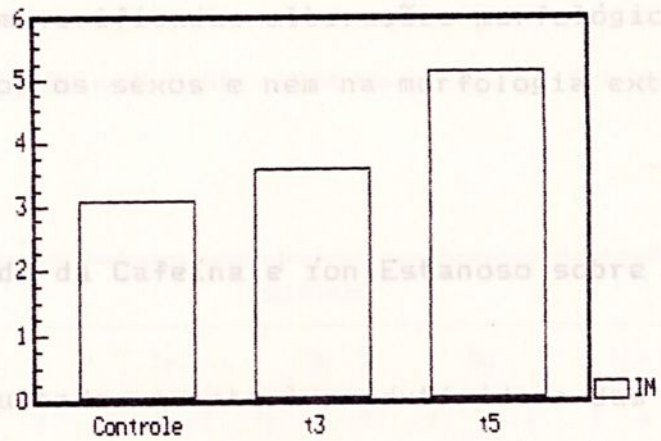


Figura 10. índice mitótico das moscas controle, t_3 e t_5.

7. Análise Morfológica dos Cromossomos, do Aparelho Reprodutor Masculino e Feminino e da Morfologia Externa de Larvas e Moscas Adultas

Não foram observadas alterações morfológicas nos cromossomos mitóticos e nos cromossomos politênicos das glândulas salivares dos indivíduos tratados, comparados com os controle. Também não foram verificadas alterações morfológicas no aparelho reprodutor de ambos os sexos e nem na morfologia externa de larvas e moscas adultas.

8. Efeito Combinado da Cafeína e íon Estanoso sobre a Produtividade

Os resultados quanto à produtividade das moscas tratadas com cafeína (t_4= 2000 ug/ml), íon estanoso (Sn_1= 500 ug/ml e Sn_2= 2000 ug/ml) e cafeína + íon estanoso ($t_4 + Sn_1$ e $t_4 + Sn_2$), estão contidos na Tabela 25.

Podemos observar que a produtividade das moscas tratadas com íon estanoso (Sn_1 e Sn_2) é inferior à das moscas controle e menor no experimento em que se usou maior concentração do íon.

A comparação da produtividade das moscas tratadas com íon estanoso com a das moscas tratadas com cafeína mostra que a produtividade das segundas é menor. A soma dos efeitos das duas drogas, ministradas conjuntamente, leva a um aumento da redução da produtividade, nas duas concentrações do íon estanoso, em comparação com qualquer das drogas ministradas isoladamente. Não há diferença significativa entre a produtividade de fêmeas e machos.

Tabela 25. Produtividade de moscas controle e tratadas com cafeína (t_4= 2000 ug/ml), íon estanoso (Sn_1= 500 ug/ml; Sn_2= 2000 ug/ml) e cafeína + íon estanoso ($t_4 + Sn_1$ e $t_4 + Sn_2$), em garrafas de 1/4 de litro.

	Produtividade																	
Repique	C			t_4			Sn_1			Sn_2			$t_4 + Sn_1$			$t_4 + Sn_2$		
	F	M	T	F	M	T	F	M	T	F	M	T	F	M	T	F	M	T
Garrafa 1	583	594	1177	376	371	747	451	432	883	449	446	895	285	293	578	294	292	586
Garrafa 2	574	585	1159	322	370	692	629	612	1241	533	500	1033	318	338	656	332	302	634
TOTAL			2336			1439			2124			1928			1234			1220

A análise de variância para a produtividade total é dada na Tabela 26.

Os dados das comparações múltiplas de Tukey, contidos na Tabela 27, mostram que a comparação do controle com todos os demais experimentos é significativa, com exceção do experimento Sn_1. Foram ainda significativas as comparações de t_4 com Sn_1 e com Sn_2, de Sn_1 com $t_4 + Sn_1$ e com $t_4 + Sn_2$, e de Sn_2 com $t_4 + Sn_1$ e com $t_4 + Sn_2$.

Tabela 26. Análise de variância (ANOVA) para os dados transformados para produtividade total. *= significativo

Fonte de variação	G.L.	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamento	5	115084	23017	58,36*
Resíduo	54	21298	394	
Total	59	136382		

Tabela 27. Comparações múltiplas de Tukey para a produtividade total de moscas controle e tratadas com cafeína e íon estanoso. D.M.S.= 1,01

Experimentos	Controle	t_4	Sn_1	Sn_2	$t_4 + Sn_1$
t_4	3,30*				
Sn_1	0,73	2,57*			
Sn_2	1,42*	1,88*	0,69		
$t_4 + Sn_1$	4,20*	0,90	3,47*	2,78*	
$t_4 + Sn_2$	4,27*	0,97	3,54*	2,85*	0,07

IV. DISCUSSÃO

A literatura mostra que a cafeína causa, em muitos organismos, uma toxicidade que se manifesta por meio de uma gama de efeitos abrangendo, entre outros, malformações, alterações no tempo de desenvolvimento, redução da fertilidade e alterações cromossômicas estruturais e numéricas (WILCOX **et al.**, 1988; JOESOEF **et al.**, 1990; SEHGAL & SIMÕES, 1976; SEHGAL **et al.**, 1977, POLLARD **et al.**, 1987; ITOYAMA, 1989; SASAKI & NISHIMOTO, 1989; KUNICKA **et al.**, 1990).

Há também trabalhos indicativos de que a cafeína é mutagênica (MAcPHEE & LEYDEN, 1985; PONS & MULLER, 1990; GRAF & WURGLER, 1986), atua reforçando efeitos de outros agentes genotóxicos (DULOUT **et al.**, 1981; GRANBERG-OHMAN **et al.**, 1980; DAS, 1987), ou minimizando suas consequências (MAcPHEE & LEYDEN, 1985). De modo geral, atribui-se esses efeitos à sua capacidade de inibir processos de reparo do DNA (MAcPHEE & LEYDEN, 1985).

Quando agentes físicos ou químicos lesam o material genético de uma célula, diferentes mecanismos de reparo entram em funcionamento. Esses sistemas de reparo atuam por vários processos, entre os quais incluem-se a excisão de bases ou de nucleotídeos alterados e a reparação por recombinação ou pós-duplicativa (revisão em LEITÃO & ALCANTARA GOMES, 1988).

Segundo DAS (1987) a abordagem dos fenômenos envolvidos no reparo do DNA nas células de eucariotos é difícil por causa da estrutura complexa da cromatina e da complexidade do ciclo celular desses organismos. Devido a esses problemas, estudos com modificadores do reparo do DNA têm sido cruciais no avanço do

entendimento daqueles fenômenos. A cafeína, análogo da purina é um modificador do reparo do DNA que, como já foi mencionado, tem sido muito estudado.

Aliás, segundo RAUTH (1967, in CLEAVER, 1989) uma das primeiras observações a sugerir processos de reparo em células de mamíferos foi o aumento da sensibilidade nas células L de camundongo à luz ultra-violeta, quando as células cresciam na presença de cafeína.

A maioria dos trabalhos com cafeína, visando a estudos de reparo, tem sido realizada com células e linhagens celulares de roedores, humanas e de alguns outros mamíferos.

Segundo CLEAVER (1989), observou-se que a resposta à cafeína está relacionada com processos bioquímicos associados com a fase de síntese do DNA (fase S) e que o efeito da cafeína no período da sensibilidade à radiação UV em células de roedores (camundongo e hamster chinês) é muito maior do que nas células humanas. Ainda segundo o mesmo autor, embora o interesse neste assunto tenha diminuído nos últimos anos, permanecem muitas perguntas sem respostas, como por exemplo, se todas as linhagens celulares humanas são menos sensíveis à cafeína do que as células de roedores e que fatores determinam o grau de sensibilização à cafeína.

As dúvidas a respeito da sensibilidade e dos fatores que a determinam, em relação à cafeína, permanecem não só a nível celular, como também a nível do indivíduo.

A partir de estudos com linhagens celulares, duas interpretações para o efeito da cafeína sobre o DNA foram propostas. Uma delas sugere que essa substância pode inibir um processo de reparo pós-duplicação, dependente da fase S (D'AMBROSIO & SETLOW,

1976). Assim a maior sensibilidade das células de roedores pode ser indicativa de que essas células são mais dependentes do reparo pós-duplicação que as células humanas (BOHR **et al.**, 1985).

A outra interpretação admite o estimulo, pela cafeína, de mais origens de duplicação, aumentando o efeito letal dos sítios danificados e não reparados, nessas regiões do DNA (CLEAVER, 1989).

Trabalhando com uma linhagem celular humana transformada obtida de indivíduos portadores de Xeroderma pigmentoso (XP), que apresentava maior sensibilidade à cafeína que outras linhagens de origem humana analisadas, CLEAVER (1989) mostrou que as células XP, as quais proliferam mais rapidamente em cultura que os fibroblastos primários, têm um aumento da mortalidade pela cafeína pós-irradiação UV. Os resultados foram interpretados admitindo que as células, durante a fase S (quando a cafeína exerce seu efeito), tornam-se mais vulneráveis à morte pela cafeína nas tentativas de duplicar o DNA lesado. A proliferação aumentada e o reparo por excisão diminuído podem, portanto, resultar em uma maior sensibilidade à cafeína porque a duplicação de sítios lesados do DNA coloca as células em situações de risco de mutagênese e morte celular.

Assim uma interpretação convencional dos resultados com células XP é que, à medida que o reparo por excisão diminui, o reparo pós-duplicação torna-se mais importante e a sensibilidade deste processo à cafeína torna-se aparente (LEHMANN **et al.**, 1975; CLEAVER, 1989).

A hipótese alternativa admite que as lesões não reparadas, à frente das forquilhas de duplicação tornam-se mais importantes na presença da cafeína, porque esta aumenta o número de origens de duplicação. Consequentemente, a correlação da sensibilidade à

cafeína por excisão reduzida torna-se uma consequência direta da deficiência na excisão à frente da forquilha de duplicação (CLEAVER, 1989). Essa hipótese foi admitida como provável para explicação dos dados obtidos pelo referido autor.

Contudo, permanece ainda o fato de que o mecanismo molecular pelo qual a cafeína exerce sua ação não é bem conhecido. A compreensão dos processos celulares em que ela está envolvida seria extremamente importante inclusive para explicar a deficiência bioquímica presente em casos como o de Xeroderma pigmentoso, cuja taxa de mutação induzida pela UV é aumentada.

ITOYAMA (1989) estudou o efeito da cafeína, utilizando quatro concentrações diferentes (50, 100, 1000 e 1500 ug/ml) sobre os parâmetros produtividade, longevidade, oviposição e tempo de desenvolvimento de **Drosophila prosaltans.** Todos eles foram afetados pela cafeína, em menor ou maior grau.

No presente trabalho pretendeu-se ampliar as informações relacionadas aos efeitos da cafeína, sobre os parâmetros mencionados e avaliar as consequências de seu consumo por várias gerações. Foram também analisados os efeitos somados da cafeína com o íon estanoso, considerado genotóxico por alguns trabalhos (OLIVIER & MARZIN, 1987; CUNHA **et al.**, 1991) e não genotóxico por outro (TRIPATHY **et al.**, 1990).

A análise do efeito da cafeína em seis concentrações diferentes (50, 100, 1000, 1500, 2000 e 2500 ug/ml de meio de cultura), no decorrer de 10 gerações, realizada neste trabalho, confirmou os resultados anteriores que mostraram que a cafeína reduz a produtividade de **D. prosaltans.** ITOYAMA (1989) verificou que a produtividade das moscas tratadas era inferior à do controle e na

proporção da concentração, isto é, quanto maior a concentração de cafeína no meio, menor a produtividade, sendo observado, portanto, o efeito dose-resposta.

Neste trabalho, pelos dados estatísticos, é possível também afirmar que em cada geração, de modo geral, há uma redução significativa da produtividade à medida que aumenta a concentração de cafeína e que, entre todas as concentrações utilizadas, t_5 (2500 ug/ml) apresenta o efeito mais drástico.

Os dois grupos de experimentos obtidos, considerando-se a proximidade do número de descendentes produzidos nas 10 gerações, um deles constituído pelos experimento t_0, t_1 e t_2, de produtividade maior, e outro pelos experimentos t_3, t_4 e t_5, de produtividade menor, refletem as observações mencionadas, de efeito da cafeína dependente da concentração, as maiores concentrações determinando as menores produtividades e vice-versa, sendo que entre as concentrações de 1000 (t_2) e 1500 (t_3) ug/ml há uma redução mais drástica que entre as demais concentrações de cada grupo.

Os resultados mostraram, também, que a cafeína não altera significativamente a proporção sexual, em nenhuma das 10 gerações estudadas e em nenhum experimento, mostrando que a cafeína age igualmente sobre os sexos, quanto a esse aspecto, resultados que também já haviam sido detectados por ITOYAMA (1989). WEATHERSBEE **et al.** (1975, in TIMSON, 1977), entretanto, relataram mudança significativa na razão de sexo em hamster chinês, contra os machos, nas ninhadas de indivíduos tratados com 0,02 g/100 ml de água.

Quanto à produtividade ao longo das gerações, foram observadas algumas diferenças significativas nos tratamentos e mesmo no controle. É difícil interpretar essas alterações significativas

como resultado de manifestação de resistência ou de efeito acumulativo. Como pode ser observado, na Figura 3, vários "picos" e "vales" observados na curva da produtividade, ao longo das gerações, ocorrem simultaneamente em todos os experimentos, inclusive no controle, podendo, portanto, ser decorrentes de influências alheias ao tratamento com cafeína. Entretanto, observaram-se respostas mais, ou menos acentuadas, dos tratamentos, nesses picos e são essas respostas diferenciais que determinam a maioria das diferenças significativas ao longo das gerações.

Deve-se, entretanto, ressaltar que os maiores números de diferenças significativas, entre gerações, foram obtidos nos tratamentos t_4 e t_5 envolvendo predominantemente a sétima geração em comparação com as demais e, no tratamento t_5, a nona geração, em relação às demais.

Indivíduos que apresentam normalmente graus diferentes de resistência à cafeína foram verificados por vários autores. Por exemplo, BARD **et al.** (1980) isolaram, em **Saccharomyces cerevisiae** quatro haplóides resistentes à cafeína, sendo dois resistentes a 50 mM e dois a 100 mM. Os autores explicaram a resistência à cafeína admitindo mudança na especificidade enzimática de modo que a cafeína não seria incorporada em um ou mais metabólitos celulares essenciais (por exemplo, a toxicidade da cafeína poderia ser devida a sua conversão em análogos adenínicos inibidores de ATP, NAD^+ ou FAD^+) ou supondo que a célula poderia adquirir uma capacidade aumentada para modificar quimicamente a cafeína, reduzindo seus efeitos tóxicos, ou ainda que a alteração de uma permease alteraria a permeabilidade da membrana à cafeína.

Linhagens de camundongos com diferentes graus de susceptibilidade aos efeitos tóxicos da cafeína foram estudadas por SEALE **et al.** (1985). A linhagem SWR sobrevive à dose de 187 mg/Kg, considerada letal, enquanto a linhagem CBA morre em menos de 30 segundos após aplicação dessa dose.

Populações de **D. melanogaster**, analisadas por CHINNICI & BETTINGER (1984) quanto à sensibilidade à cafeína, também mostraram variações significativas. Ministrada simultaneamente com aflatoxina, a cafeína mostrou efeito protetor contra o alto grau de mortalidade ovo-adulto induzido pela primeira droga.

Sensibilidade diferencial também foi detectada no homem, relacionada com as condições emocionais e comportamentais de indivíduos submetidos ao consumo de cafeína por 12 dias (100 mg/dia) (GRIFFITHS **et al.**, 1990).

Já HOLTZMAN & FINN (1988) verificaram que, após receber cinco a 10 mg/Kg/dia de cafeína na água de beber, ratos tornaram-se tolerantes ao efeito estimulante da cafeína na atividade locomotora. A exposição a doses diárias mais altas levou ao desenvolvimento de tolerância completa. Duas a três semanas após o término da ingestão da cafeína, a sensibilidade completa retornou indicando que a mudança da resposta à cafeína não resultou de alterações da função motora, pelo menos de forma irreversível.

Há situações descritas na literatura que explicam o desenvolvimento de resistência a agentes que atuam no reparo do DNA (revisão em LEITÃO & ALCANTARA GOMES, 1988). Quando células procariontes ou eucariontes são incubadas com concentrações reduzidas de determinados agentes químicos envolvidos no reparo do DNA, elas podem tornar-se mais resistentes a tratamentos

posteriores, em concentrações elevadas do mesmo agente. Este fenômeno é conhecido como reparação adaptativa e é explicado pelo acúmulo intracelular de uma ou mais enzimas capazes de eliminar lesões provocadas no DNA, pelo tratamento, reduzindo assim seus efeitos letais ou mutagênicos. Na **Escherichia coli** e algumas outras espécies bacterianas, acumulam-se a metiltransferase e a 3-metiladenina glicosilase II, em consequência da resposta adaptativa a um tratamento indutor. A primeira enzima remove grupamentos alquil inseridos na posição O^6 da guanina eliminando erros de emparelhamento causados pela guanina metilada e a segunda atua de várias formas, por exemplo, promovendo a eliminação de certas bases nitrogenadas metiladas. Em **E. coli**, outros genes também participam do controle e da resposta adaptativa, como o gene **ada** (revisão em LEITÃO & ALCANTARA GOMES, 1988).

Também em células pré-tratadas com peróxido de hidrogênio, há aumento de resistência à luz UV de comprimento longo. STORZ **et al.** (1990) mostraram que em **Salmonella typhimurium** e **E. coli** o gene oxyR regula os genes induzidos por estresse oxidativo. Os resultados sugerem que a proteína OxyR que se liga ao promotor dos genes induzíveis por estresse oxidativo, quando oxidada sofre uma alteração conformacional passando do estado inativo ao ativo, fazendo com que esses genes passem a transcrever para proteção da célula e do indivíduo.

É possível que as respostas celulares a outras situações, tais como o choque térmico, envolvam mecanismos semelhantes, mas, esses mecanismos ainda não são conhecidos.

Uma abordagem para verificar a persistência, após 10 gerações de tratamento, do efeito da cafeína sobre a produtividade,

cessada sua administração, foi realizada, neste trabalho, tomando-se moscas de todos os experimentos, nascidas na 10ª. geração e colocando-as em meio controle para reproduzir. Os dados obtidos mostraram que, nessas condições, há aumento da produtividade. No trabalho anterior (ITOYAMA, 1989), em que as moscas foram tratadas em uma só geração, também houve algum aumento da produtividade, nas mesmas condições. Entretanto, no presente trabalho, em todos os tratamentos, a produtividade tornou-se igual ou até mesmo maior que a do controle, com exceção do t_5 em que permaneceu significativamente menor.

Conclue-se que, após 10 gerações, para a produtividade, a concentração de cafeína que deixa efeitos mais permanentes nas moscas tratadas é a concentração de 2500 ug/ml.

Pode-se perguntar a que se deve a aparente maior capacidade de resposta ou a maior facilidade de eliminação dos efeitos dos tratamentos t_1 a t_4, na ausência da cafeína após 10 gerações, quando comparada com uma só geração de tratamento?

Pode-se supor que haja, através das gerações, seleção de alguma característica que capacite a essa resposta rápida no retorno às condições normais. Os dados mostram, porém, que para indivíduos criados em concentrações elevadas de cafeína, cessado seu consumo o efeito persiste pelo menos em uma geração, permitindo ainda supor a possibilidade de uma ação genotóxica da cafeína interferindo nesse parâmetro que, entretanto, dependerá de outros estudos para ser demonstrada. Mecanismos de proteção relacionados com a reparação adaptativa também não atuam quando altas concentrações do agente tóxico são utilizadas (LEITÃO & ALCANTARA GOMES, 1988).

No presente trabalho, foi realizada outra forma de abordagem para verificar a persistência do efeito da cafeína sobre a produtividade por meio de cruzamentos de moscas da 10ª. geração, dos tratamentos t_0, t_2 e t_5 com moscas controle, colocadas em meio controle para reprodução. O uso de casais permite um estudo mais individualizado do problema.

As diferenças de produtividade dos cruzamentos não foram significativas. Entretanto, tanto nos cruzamentos de t_2 como nos de t_5, a direção em que foram utilizados machos tratados e fêmeas controle produziu menor número de descendentes que a direção recíproca (para t_2, a diferença entre os recíprocos foi de 6,88% e para t_5 de 13,21%). Isto pode indicar que os machos permanecem mais afetados do que as fêmeas após 10 gerações de tratamento e reforça a idéia de um efeito mais duradouro sobre as moscas, da concentração t_5, isto é, 2500 ug/ml de meio.

A espermatogênese de ratos albinos maduros injetados com cafeína (0,1 mg/100 g de peso a 0,25 mg/100 ml de peso) foi analisada por ALWACHI & BALASH (1988), os quais observaram redução significativa na porcentagem média de espermatócitos primários e espermátides nos animais tratados. Essa redução, se detectada em **Drosophila** poderá explicar os resultados do presente trabalho.

Os resultados de cruzamentos deste trabalho diferem, porém dos obtidos em camundongo por SEALE **et al.** (1985). A descendência F_1 do intercruzamento mostrou-se igualmente sensível ao efeito letal da cafeína, nas duas direções de cruzamento, indicando que a resposta à cafeína está sob o controle de um gene autossômico dominante. O intercruzamento dos F_1 produziu 74% de indivíduos sensíveis e 26% de resistentes, independentemente do sexo.

A análise genética realizada por BARD **et al.** (1980) para linhagens resistentes de **S. cerevisiae** mostrou que as quatro mutações são alelos do mesmo loco. As quatro linhagens isoladas demonstraram dominância incompleta quando hibridizadas com a linhagem do tipo selvagem e dominância da linhagem de alta sobre a de baixa resistência quando hibridizadas entre si.

Vários trabalhos mostraram alterações morfológicas em indivíduos submetidos a tratamentos com cafeína, como por exemplo, BERTRAND **et al.** (1965, in TIMSON, 1977) e SMITH **et al.** (1987) em descendentes de ratas tratadas durante a gravidez e KAWANO & SIMÕES (1987) em embriões tratados de **Biomphalaria glabrata**; SEHGAL **et al.** (1977) em **Telmatoscopus albipunctatus.** No presente trabalho não foram encontradas alterações morfológicas externas em nenhuma das dosagens utilizadas. BERTRAND **et al.** (1970, in TIMSON, 1977) mostraram que a indução da ectrodactilia em ratos, pela cafeína, estava parcialmente sob controle genético pois, algumas linhagens não manifestaram o efeito. Os autores consideraram esse efeito, teratogênico e não genético, pois os descendentes dos ratos afetados não manifestaram a malformação.

Como já foi mencionado, vários trabalhos têm indicado alterações cromossômicas associadas ao tratamento com cafeína. Em um desses trabalhos, OSTERTAG **et al.** (1965) utilizaram concentrações de 500 a 10000 ug/ml de cafeína em células HeLa para estudo de sua atividade mutagênica. Nas concentrações 500, 1000 e 2000 ug/ml, que se incluem entre as utilizadas, no presente trabalho, foram obtidas quebras cromatídicas, respectivamente, em número de 18, 47 e 111, enquanto no controle foram obtidas quatro. Efeito dose-resposta foi observado, com o número de quebras crescente até 763, obtido à

concentração de 10000 ug/ml.

No presente trabalho foram analisados cromossomos politênicos das glândulas salivares e cromossomos mitóticos dos gânglios cerebrais dos indivíduos dos diferentes tratamentos. Não foram encontradas alterações morfológicas, nesses cromossomos, que pudessem ser atribuídas à cafeína. Contudo, não foram utilizadas técnicas específicas para trocas entre cromátides-irmãs.

É possível que as dosagens utilizadas neste trabalho sejam muito pequenas para provocar outros tipos de alterações cromossômicas. DULOUT **et al.** (1981) usaram doses de 100 a 150 mg/Kg injetadas no peritôneo dos camundongos para obter os resultados mencionados por eles. E MITLLER **et al.** (1967) usaram a dose máxima de cafeína que permite à **D. melanogaster** completar o ciclo vital para obter indicações genéticas de perda cromossômica e não-disjunção (machos XO e fêmeas XXY).

Dados de ITOYAMA (1989) mostraram que a cafeína altera a longevidade média das fêmeas e machos virgens e acasalados, reduzindo-a significativamente, em todos os tratamentos realizados, embora de forma não proporcional à concentração de cafeína no meio. A redução foi significativamente menor para as fêmeas do que para os machos, em seis de 12 experimentos e a amplitude da distribuição das longevidades sofreu redução para as fêmeas e para os machos, em todos os tratamentos, pela redução dos valores máximos, quando comparados com o controle.

Neste trabalho, em que fêmeas e machos virgens foram analisados após 10 gerações de tratamento, verificou-se que ambos apresentam redução significativa desse parâmetro, em comparação com o controle, na maior concentração utilizada, t_5. A redução foi de 15

dias, em média, para machos e sete dias para fêmeas. Para as fêmeas essa é a única diferença significativa em relação ao controle e para os machos os valores de t_1 também são menores.

A longevidade média em t_5 é significativamente menor que a de todos os demais tratamentos, para os machos, e menor que a de todos, exceto t_0 e t_4, para as fêmeas, reforçando mais uma vez o fato de que o tratamento t_5 é o que determina os efeitos mais acentuados.

Apenas nos machos foi observado um padrão de redução da amplitude da longevidade constante e crescente com o aumento da dose, comparado ao controle. Em t_5, a redução da amplitude foi de 43 dias comparado com 80 dias para o controle, o que significa uma diminuição quase à metade, por redução dos valores máximos. Para as fêmeas, porém, nessa mesma concentração a amplitude foi de 68 dias enquanto para o controle foi de 72 dias.

Esses resultados diferem do trabalho anterior (ITOYAMA, 1989), em vários aspectos (1) os machos neste experimento, com exceção dos de t5, apresentaram longevidades médias maiores do que as fêmeas, na maioria dos casais; (2) a redução da longevidade média só foi significativa, para fêmeas e machos, com relação ao controle, em t5; (3) em valores absolutos, a redução em t3 foi menor do que aquela verificada no experimento anterior (10 dias para machos e 2 dias para fêmeas neste experimento contra 26 dias para machos e 23 para fêmeas no experimento anterior).

Embora a análise desse quadro seja complexa, talvez seja possível supor o desenvolvimento de resistência envolvida com o parâmetro longevidade, afetando diferentemente fêmeas e machos. Mais uma vez, os machos mostraram maior sensibilidade à cafeína.

Segundo ITOYAMA (1989), moscas criadas em meio controle e colocadas para por ovos em meio com cafeína apresentaram redução do número de ovos de forma direta, isto é, quanto maior a concentração de cafeína no meio, maior a redução. Da mesma forma, fêmeas criadas nos meios contendo cafeína e colocadas para ovipositar em meio controle mostraram redução do número de ovos, tanto maior quanto maior a concentração da substância do meio de origem das moscas. A redução da oviposição foi supostamente atribuída a um efeito bloqueador na produção de novos folículos ou a um atraso no desenvolvimento dos mesmos.

No presente experimento a oviposição de moscas controle e t_5, em meio de cultura controle, foi acompanhada no decorrer de 13 dias, com o objetivo de verificar se a diferença detectada no experimento de ITOYAMA (1989) na oviposição de moscas controle e tratadas poderia ser decorrente apenas de uma retenção de ovos pelas moscas tratadas ou de atraso na maturação dos mesmos. Há dados na literatura, para algumas espécies de **Drosophila**, segundo os quais a fêmea retém os ovos quando o meio é adverso (ASHBURNER & WRIGHT, 1980).

As moscas do tratamento t_5 permaneceram afetadas no que se refere à redução da oviposição, quando cessada a ingestão de cafeína e não houve reversão do efeito ao longo dos dias, o que significa que pelo menos nessa geração, a oviposição foi permanentemente afetada. Portanto, os resultados indicam que há, de fato, distúrbio (s) no desenvolvimento dos ovos e não uma simples retenção dos mesmos.

Há dados na literatura, que reforçam a idéia de injúria permanente da cafeína aos órgãos reprodutores. Por exemplo,

WEATHESBEE **et al.** (1975, in TIMSON, 1977) apresentaram dados segundo os quais espécimes de hamster chinês tratados com doses elevadas de cafeína sofrem atrofia das gônadas sendo que o ovário apresenta maior sensibilidade à cafeína que os testículos.

SEHGAL & SIMÕES (1976) também verificaram, em **D. melanogaster** malformações do ovário e esterilidade das fêmeas obtidas a partir de ovos e larvas tratadas com cafeína. Entretanto, os órgãos reprodutores das moscas tratadas no presente trabalho foram analisados morfologicamente e não foram detectadas alterações visíveis, mesmo na maior concentração utilizada.

Vários trabalhos têm indicado que a cafeína atua sobre o sistema nervoso, podendo influenciar o comportamento. A cafeína antagoniza os efeitos da adenosina em seus receptores, afeta a mobilização do cálcio e inibe as fosfodiesterases dos nucleotídeos cíclicos e a nucleotidase 5'; através desses mecanismos tanto a taxa de liberação como as concentrações sinápticas subsequentes, dos neurotransmissores, podem ser aumentadas. Também os níveis de AMP cíclico no cérebro são reduzidos (MANTE & MINNEMAN, 1990).

Diante desses resultados, procurou-se analisar o efeito da cafeína sobre aspectos reprodutivos envolvidos com o acasalamento. Em **Drosophila**, os movimentos de corte são complexos e obedecem a um padrão característico de cada espécie e, teoricamente, poderiam ser afetados por alterações comportamentais causadas pela cafeína. Assim, foram analisadas a duração da pré-cópula e cópula e frequência de cópula, nos experimentos controle e t_5. Os resultados mostraram frequência de cópula e tempo médio de cópula maiores para moscas controle do que para moscas t_5, ocorrendo o inverso para o tempo de pré-cópula.

Há, portanto, indicações no presente trabalho de que a cafeína afeta o acasalamento em **D. prosaltans.** As moscas t_5 apresentaram uma frequência de acasalamentos 5,5% menor que as moscas controle, um tempo médio de pré-cópula 9,3 minutos maior que das moscas controle e um tempo médio de cópula 1,3 minutos menor que as moscas controle. Deve-se ressaltar, quanto a esse último aspecto, a maior variabilidade encontrada para moscas t_5, nas quais houve uma variação de 6,4 a 34,2 minutos contra 18,4 a 37,4 minutos nas moscas controle.

A existência, na literatura, de dados que mostram que a cafeína inibe o processo de reparo do DNA, bloqueia células em G_2 (BATES **et al.**, 1985), inibe a citocinese (LA PENA **et al.**, 1981; HEPLER & BONSIGNORE, 1990) e inibe a proliferação celular em linfócitos periféricos humanos, cultivados **in vitro** (GUGLIELMI **et al.**, 1982), levaram-nos a analisar o índice mitótico nos gânglios cerebrais de moscas controle e submetidas aos tratamentos t_3 e t_5. Foi observado um índice mitótico maior em t_5 que em t_3 e maior em ambos que no controle. É possível que esse aumento do índice mitótico, aparentemente relacionado com a dose de cafeína utilizada, possa ser explicado pelo atraso no processo de divisão celular. O maior tempo de desenvolvimento de moscas tratadas com 1000 e 1500 ug de cafeína por ml de meio de cultura, observado por ITOYAMA (1989) pode estar relacionado com a maior duração do processo de divisão celular nesses indivíduos.

Finalmente, foi analisado o efeito, sobre a produtividade, do íon estanoso ($SnCl_2$), isolado ou em associação com a cafeína. Como foi dito, anteriormente, o íon estanoso é um agente redutor poderoso que tem várias aplicações na área alimentícia e da saúde.

Há, portanto, a possibilidade de presença simultânea, no organismo humano, das duas substâncias, cafeína e íon estanoso, por ingestão.

OLIVIER & MARZIN (1987) utilizando **E. coli** mostraram que o composto não-carcinogênico cloreto estanoso é genotóxico e ativa o sistema SOS que é induzido depois de lesão ao DNA.

CUNHA **et al.** (1991) utilizaram cepas de **E. coli** selvagem e cepas portadoras de mutações envolvendo os genes para proteínas, uvrA, recA e lexA, para tratamento com essa substância. Os resultados mostraram que os mutantes foram mais resistentes ao tratamento que a cepa selvagem e o duplo mutante uvrA-recA foi mais sensível que os mutantes uvrA, recA e lexA. Os autores interpretaram os resultados como indicativos de que as lesões promovidas pela presença do íon estanoso estejam intimamente associadas com modificações no DNA, o que confere a este íon atividade genotóxica. Portanto, ambos os agentes, cafeína e íon estanoso, estão envolvidos com o reparo do DNA.

Utilizando o teste SMART de asa, TRIPATHY **et al.** (1990) analisaram o efeito do cloreto estanoso e concluíram, que essa substância é não-genotóxica em **Drosophila.** Entretanto, essa decisão foi tomada sobre resultados "parcialmente inconclusivos". Esses autores trabalharam com doses próximas da DL_{50} ou abaixo dela. No presente trabalho, em que foram usadas doses 22 e seis vezes menores que as utilizadas por aqueles autores (respectivamente Sn_1= 50 ug/ml e Sn_2= 2000 ug/ml), a produtividade mostrou redução significativa na maior concentração em comparação com o controle. Contudo, à vista dos números, também o tratamento com a menor concentração (50 ug/ml) mostrou redução no número de descendentes.

Em combinação com 2000 ug/ml de cafeína, o íon estanoso, tanto na dose de 50 como na de 2000 ug/ml não mostra redução significativamente maior da produtividade do que no tratamento só com cafeína.

Isto pode indicar que o íon estanoso não acrescenta efeito quando ministrada com a cafeína e que, portanto, o efeito dos dois juntos corresponde ao próprio efeito da cafeína sozinha. Entretanto, novamente à vista dos números, contata-se uma redução no número de descendentes, nas duas combinações, quando comparadas com a cafeína ou com qualquer das duas concentrações de estanho isoladamente. Portanto, algum efeito tóxico na produtividade, causado pelo íon estanoso, parece estar ocorrendo mesmo quando somado à cafeína. Porém, o efeito obtido é menor do que o que se poderia esperar pelo resultado estatisticamente significativo de Sn_2 comparado com o controle.

A comparação destes resultados com os de TRIPATHY **et al.** (1990) mostra que a toxicidade que leva à redução da produtividade tem componentes que respondem mesmo a doses relativamente pequenas do composto. Contudo, uma melhor avaliação das respostas é necessária, por exemplo utilizando a combinação de cafeína e íon estanoso em moscas tratadas com irradiação UV.

V. RESUMO E CONCLUSÕES

A cafeína, em seis diferentes concentrações (t_0= 50, t_1= 100, t_2= 1000, t_3= 1500, t_4= 2000 e t_5= 2500 ug/ml de meio de cultura) foi ministrada a **Drosophila prosaltans** durante 10 gerações (aproximadamente 8 meses). Em cada geração foi avaliado o parâmetro produtividade. Na décima geração a produtividade foi analisada pela produção massal, pela produção por casal e em intercruzamentos de moscas controle e tratadas. Nesta geração, além da produtividade, foi também avaliada a longevidade. Moscas controle e tratadas foram também utilizadas para estudo da oviposição, de aspectos da reprodução abrangendo tempo de pré-cópula e tempo e frequência de cópula, do índice mitótico em células dos gânglios cerebrais, da morfologia cromossômica nos gânglios cerebrais e glândulas salivares e da morfologia dos órgãos reprodutores internos. Também foi analisado o efeito, sobre a produtividade, do tratamento combinado da cafeína com o íon estanoso, este de uso na produção de alimentos enlatados, na fabricação de pasta dentifrícia e na produção de isótopos radioativos para fins médicos.

De modo geral, o presente trabalho, mostrou que, sob vários aspectos, as moscas submetidas a 10 gerações de tratamento com cafeína comportam-se, quanto aos parâmetros produtividade e longevidade, diferentemente das moscas submetidas a tratamento em apenas uma geração, realizado anteriormente. Contudo, permanecem as conclusões básicas referentes ao efeito dose-resposta na produtividade e ao efeito prejudicial da cafeína quanto à longevidade.

Constituem modificações, por exemplo, a observação de que excetuando-se a concentração t_5 (2500 ug/ml), cujos efeitos foram mais drásticos, uma vez cessada a ingestão da cafeína as moscas recuperaram a produtividade normal, e em alguns casos, até ultrapassaram o controle. No trabalho anterior a recuperação da produtividade foi apenas parcial. Outra modificação, refere-se à longevidade. Apenas no tratamento t_5, houve redução desse parâmetro para fêmeas e machos, em comparação com o controle, enquanto no trabalho anterior, as concentrações t_2 e t_3 também afetaram a longevidade. De modo geral, no presente trabalho, apenas os machos apresentaram uma redução da amplitude de longevidade, constante e crescente com o aumento da dose, sendo que em t_5 essa redução correspondeu à metade do valor obtido para o controle. Esse padrão de resposta dose-dependente não foi observado no trabalho anterior, com relação à longevidade. Também, a redução da longevidade determinada pela cafeína, no tratamento t_3 do presente trabalho foi menor do que aquela verificada no trabalho anterior. Assim, quanto à longevidade os dados são indicativos da possibilidade das moscas terem desenvolvido alguma resistência, maior nas fêmeas do que nos machos. Quanto ao desenvolvimento de resistência em relação à produtividade, porém, embora haja comparações significativas para todos os tratamentos (exceto t_0 e t_3), ao longo das gerações, esses resultados decorrem de alterações que na maioria dos casos envolveram também o controle, embora em graus variáveis, parecendo ser antes devidas a outras causas ambientais que não a cafeína.

Ainda quanto à produtividade, verificou-se que, após 10 gerações, em cruzamentos com o controle, as moscas na direção de cruzamento que envolve machos tratados e fêmeas controle, produzem

menor número de descendentes do que na direção recíproca, indicando, também neste caso, que o sexo masculino permanece mais afetado que o feminino, cessada a ingestão da cafeína.

Outra contribuição, deste trabalho, refere-se ao efeito da cafeína na oviposição, pela avaliação de hipótese levantada no trabalho anterior. Verificou-se que a redução nesse parâmetro decorre antes de problemas relacionados ao desenvolvimento dos ovos do que à sua retenção ao do simples atraso na sua maturação.

Com o objetivo de verificar se o efeito da cafeína sobre o sistema nervoso pode ter algum reflexo nos padrões de corte das moscas e consequentemente afetar o acasalamento, foram analisados a frequência de cópula e tempo de pré-cópula e de cópula, de moscas tratadas e controle. Os resultados mostraram que a frequência de cópula e o tempo de cópula das moscas controle são maiores, ocorrendo o inverso para o tempo de pré-cópula, indicando interferência da cafeína nesses parâmetros.

A avaliação do índice mitótico foi realizada nos gânglios cerebrais das moscas controle, t_3 e t_5. Foi encontrado um número maior de células em divisão nos indivíduos t_3 e t_5, em comparação com o controle, talvez decorrente de um aumento na duração do processo da divisão celular como consequência de dificuldades causadas pela cafeína.

Quanto ao estudo do efeito da associação da cafeína com o íon estanoso, sobre a produtividade, foi observado que a ingestão do íon sozinho diminui significativamente a produtividade na concentração de 2000 ug/ml, comparada com o controle. Em combinação com a cafeína, porém a redução não foi significativamente maior que a causada pela cafeína sozinha, podendo com isso indicar que o

efeito das duas substâncias juntas corresponde ao próprio efeito da cafeína separada. Mas, à vista dos números, a redução na produtividade dos quatro tratamentos que utilizaram íon estanoso é indicativa de seu efeito tóxico nesse parâmetro, mesmo em combinação com a cafeína.

Não foram observadas malformações nos descendentes das moscas tratadas com cafeína ou com cloreto de estanho. Também a morfologia dos cromossomos dos gânglios cerebrais e glândulas salivares bem como a morfologia do trato reprodutivo feminino e masculino não diferiram entre as moscas tratadas com cafeína e as moscas controle.

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Drosophila prosaltans was reared on culture medium with six different concentrations of caffeine ((t_0= 50 ug/ml, t_1= 100 ug/ml, t_2= 1000 ug/ml, t_3= 1500, t_4= 2000 ug/ml and t_5= 2500 ug/ml) during ten generations (about eight months). In every generation mass productivity was evaluated. In the tenth generation productivity in pair mating crosses and in intercrosses between flies treated with caffeine and control flies, as well as longevity of treated and control flies, were also analyzed.

The effects of caffeine were also studied on oviposition, pre-copula and copula duration, mating frequency, mitotic index in brain cells, chromosome morphology in brain and salivary glands and morphology of male and female reproductive tracts.

The effect of combined caffeine and stannous chloride on fecundity was also evaluated. Stannous chloride is a powerful reducing agent which is used in the food industry, in certain fluoride toothpastes and in the preparation of radioisotopes for medical purposes.

In general, this study shows that results obtained in flies after ten generations of treatment differ in several aspects from those in flies after a single treated generation. However, basic conclusions, such a dosage dependent productivity decrease and the prejudicial effect of caffeine on longevity, remain the same.

Differences include, for example, the observation that, except for concentration t_5, when intake of caffeine stops the flies recover normal productivity and in some cases are even more productive than the control. In the study cited, productivity

recovery was only partial. Another difference, this relative to longevity, was that this parameter was reduced in both males and females in a single concentration, t_5. In the study cited, concentrations t_2 and t_3 were also effective in this aspect. In the present study only males showed a constant and increasing reduction of longevity amplitude with age increase. In t_5 such values were about half of those for controls. This pattern of dosage dependence was not observed in the previous paper, relative to longevity. Also the longevity decrease caused by caffeine in concentration t_3 was smaller in the present study than in the previous one. Thus, for longevity, data indicate that some resistance, greater for females than for males, has developed in the ten generations of treatment.

However, as to productivity, the significant comparisons between treatments along generations may be, rather, due to other environmental conditions than to caffeine intake, since they are the consequence of changes which also involved the controls.

The present study also showed that males, after treatment during 10 generations, in crosses with control females yield less progeny than the reciprocal crosses. Thus, in this case, male also remained more affected than females when intake of caffeine ceased.

Results on oviposition showed that treated females transferred to control medium lay a smaller number of eggs than the control females during the course of 13 days, indicating that oviposition decrease is due to abnormalities in egg production rather than to egg retention or to delay in egg maturation.

Caffeine was also found to affect mating frequency and pre-copula and copula duration in **D. prosaltans.** Mating frequency and copula duration were greater in the control than in the treated

flies, while pre-copula duration was greater in treated flies.

Mitotic index evaluated in larval brain cells aumented as the concentration of caffeine used increased. This finding was attributed to a delay in the process of cell division in treated flies.

Stannous chloride decreased significantly the productivity of flies treated with 2000 ug/ml. However, the decrease, when in combination with caffeine, did not differ significantly from that of caffeine alone, indicating that stannous chloride did not add any effect to that of caffeine for this parameter. But considering that progeny number in the four treatments using stannous chloride showed a dosage dependent productivity decrease, some effect of this substance cannot be discarded, even in combination with caffeine.

No malformations were observed in the progeny of flies treated with caffeine or stannous chloride. Chromosome morphology in brain and salivary glands, as well as morphology of male and female reproductive tracts, also did not differ between treated and control flies.

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

VII. BIBLIOGRAFIA

ASHBURNER, M., WRIGHT, T.R.F. **The Genetics and Biology of Drosophila.** Volume 2d, Academic Press, INC (London), LTD, 702 p, 1980.

ALWACHI, S.N., BALASH, K.J. Induced alteration in spermatogenesis of mature albino mice injected with caffeine. **Journal of Biological Science Research,** v. 19, n. 3, p. 457-468, 1988.

BALACHANDRAN, R., SRINIVASAN, A. Caffeine inhibits DNA polymerase I from **Escherichia coli:** studies **in vitro. Carcinogenesis,** v. 3, n. 2, p. 151-153, 1982.

BARD, M., NEUHAUSER, J.L., LEES, N.D. Caffeine resistance of **Saccharomyces cerevisae. Journal of Bacteriology,** v. 141, p. 999-1002, 1980.

BATES, P.R., IMRAY, F.P., LAVIN, M.F. Effect of caffeine on γ-ray-induced G_2 delay in ataxia telangiectasia. **Int. J. Radiat. Biol.,** v. 47, n. 6, p. 713-722, 1985.

BENOWITZ, N.L. Clinical pharmacology of caffeine. **Annu. Rev. Med.,** v. 41, p. 277-288, 1990.

BOHR, V.A., SMITH, C.A., OKUMOTO, D.S. HANAWALT, P.C. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. **Cell,** v. 40, p. 359-369, 1985.

BONSIGNORE, C.L., HEPLER, P.K. Caffeine inhibition of cytokinesis: dynamics of cell plate formation-deformation **in vivo. Protoplasma,** v. 129, p. 28-35, 1985.

BRUYERE, JR. H.J., NOONAN, J.J., DONG, S., OBERLEY, T.D., SCHMIDT, M.J., GILBERT, E.F., SHUG, A.L. The effects of caffeine on the

ultrastructure and mitochondrial function of the embryonic chick heart. **Journal of Applied Toxicology**, v. 8, n. 1, p. 9-13, 1988.

CHAUDHURI, M.M., GHOSH, S. Effect of caffeine on macromolecular synthesis in sarcoma-180 mouse ascites cells. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 20, p. 433-436, 1982.

CHINNICI, J.P., BETTINGER, D.A. Effects of aflatoxin B_1 and caffeine on viability in natural strains of **Drosophila melanogaster**. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 44, p. 263-266, 1984.

CLEAVER, J.E. Caffeine toxicity is inversely related to DNA repair in simian virus 40-transformed xeroderma pimentosum cells irradiated with ultraviolet ligh. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 9, p. 147-155, 1989.

COX, D.R. **Regression Models and Life Tables**, JRSS séries B, 187-220 (com Discussão), 1972.

CREMER, C., CREMER, T., SIMICKOVA, M. Induction of chromosome shattering and micronuclei by ultraviolet light and caffeine. I. Temporal relationship and antagonistic effects of the four deoxyribonucleosides. **Environmental Mutagenesis**, v. 2, p. 339-351, 1980.

CREMER, C., CREMER, T., HENS, L., BAUMANN, H., CORNELIS, J.J., NAKANISHI, K. UV micro-irradiation of the Chinese hamster cell nucleus and caffeine post-treatment. Immunocytochemical localization of DNA photolesions in cells with partial and generalized chromosome shattering. **Mutation Research**, v. 107, n. 2, p. 465-476, 1983.

CUNHA, M.C., OLIVEIRA, E.F., GUILLOBEL, H.C.B., BERNARDO-FILHO, M., ALCANTARA GOMES, R. Íon estanoso: um agente genotóxico. **Livro de**

Resumos do I Simpósio Latino-Americano de Mutagênese Ambiental (ALAMCTA), Caxambú, MG, p. 29, 1991.

D'AMBROSIO, S.M., SETLOW, R.B. Enhancement of postreplication repair in chinese hamster cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n.7, p. 2396-2400, 1976.

DAS, S.K. Further evidence for a different mode of action of caffeine and benzamide on mammalian cells. **Mutation Research**, v. 192, p. 69-74, 1987.

DE MARCO, A., POLANI, S. Cell-stage-specific enhancement by caffeine of the frequency of chromatid aberrations induced by X-rays in neural ganglia of **Drosophila melanogaster. Mutation Research,** v. 84, p. 91-99, 1981.

DEMEREC, M., KAUFMANN, B.P. **Drosophila Guide.** The Lord Baltimore Press, Baltimore, Maryland, 1945.

DOZI-VASSILIADES, J., MYRTSIOTIS, A., GRANITSAS, A., MOURELATOS, D. Induction of sister-chromatid exchanges and cell-cycle delays in human lymphocytes by vitamin A alone or in combination with melphalan and caffeine. **Eur. J. Cance Clin. Oncol.**, v. 21, n. 9, p. 1089-1092, 1985.

DRISCOLL, P.G., JOSEPH JR, F., NAKAMOTO, T. Prenatal effects of maternal caffeine intake and dietary high protein on mandibular development in fetal rats. **British Journal of Nutrition**, v. 63, p. 285-292, 1990.

DULOUT, F.N., LARRAMENDY, M.L., OLIVERO, O.A. Effect of caffeine on the frequency of chromosome aberrations induced **in vivo** by triethylenemelamine (TEM) and adriamycin (ADR) in mice. **Mutation Research,** v. 82, n. 2, p. 295-304, 1981.

ESPINO, F.J., VASQUEZ, A.M. Chromosome numbers of **Saintpaulia ionantha** plantlets regenerated from leaves cultured **in vitro** with caffeine and colchicine. **Euphytica**, v. 30, p. 847-853, 1981.

EXILIE-FRIGERE, M.F., CHESSEBEUF, M., WOOD, G., PADIEU, P. Interactions of caffeine and phenobarbital on sister chromatid exchanges in rat liver epithelial cell lines treated with 2-acetyl-aminofluorene and N-acetoxy-2-acetylaminofluorene. **Cell Biology International Reports**, v. 8, n. 4, p. 329-335, 1984.

GRAF, U., WURGLER, F.E. Investigation of caffeine in **Drosophila** genotoxicity tests. **Fd. Chem. Toxic**, v. 24, n. 8, p. 835-842, 1986.

GRANBERG-OHMAN, I., JOHANSSON, S., HJERPE, A. Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in rats treated with phenacetin, phenazone and caffeine. **Mutation Research**, v. 79, p. 13-18, 1980.

GRIFFITS, R.R., EVANS, S.M., HEISHMAN, S.J., PRESTON, K.L., SANNERUD, C.A., WOLF, B., WOODSON, P.P. Low-dose caffeine physical dependence in humans. **The Journal of Pharmacology and Environmental Therapeutics**, v. 255, n. 3, p. 1123-1132, 1990.

GUGLIELMI, G.E., VOGT, T.F., TICE, R.R. Induction of sister chromatid exchanges and inhibition of cellular proliferation **in vitro**. I. Caffeine. **Environmental Mutagenesis**, v. 4, p. 191-200, 1982.

HEPLER, P.K., BONSIGNORE, C.L. Caffeine inhibition of cytokinesis: ultrastructure of cell plate formation/degradation. **Protoplasma**, v. 157, p. 182-192, 1990.

HERNÁNDEZ, P., MINGO, R., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A., LÓPEZ-SÁEZ, J.F. Relationship of chromosomal damage induced by caffeine to growth

temperature and ATP level in proliferating cells. **Mutation Research**, v. 164, p. 327-333, 1986.

HOLTZMAN, S.G., FINN, I.B. Tolerance to Behavioral effects of caffeine in rats. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 29, p. 411-418, 1988.

ITOYAMA, M.M. Efeito da cafeína sobre aspectos reprodutivos e do desenvolvimento em **Drosophila prosaltans**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, São Paulo, 106 pp, 1989.

JOESOEF, M.R., BERAL, V., ROLFS, R.T., ARAL, S.O., CRAMER, D.W. Are caffeinated beverages risk factors for delayed conception? **The Lancet**, v. 335, p. 136-137, 1990.

KAWANO, T., SIMÕES, L.C.G. Morphogenetic effects of caffeine on **Biomphalaria glabrata** (Pulmonata, Planorbidae). **Developmental Biology**, v. 90, n. 3, p. 281-302, 1987.

KIHLMAN, B.A. Effects of caffeine on the genetic material. **Mutation Research**, v. 26, p. 53-71, 1974.

KIHLMAN, B.A., HANSSON, K., ANDERSON, H.C. The effects of post-treatments with caffeine during S and G_2 on the frequencies of chromosomal aberrations induced by thiotepa in root tips of **Vicia faba** and in human lymphocytes **in vitro**. **Mutation Research**, v. 104, p. 323-330, 1982.

KIMURA, H., AOYAMA, T. Decrease in sensitivity to ethidium bromide by caffeine, dimethylsulfoxide or 3-aminobenzamide due to reduced permeability. **J. Pharmacobio-Dyn.**, v. 12, p. 589-595, 1989.

KUNICKA, J.E., MYC, A., MELAMED, M.R., DARZYNKIEWICZ, Z. Caffeine increases sensitivity of DNA to denaturation in chromatin of L1210 cells. **Cell Tissue Kinet.**, v. 23, p. 31-39, 1990.

LA PENA, A., PUERTAS, M.J., MERINO, F. Bimeiosis induced by caffeine. **Chromosoma**, v. 83, n. 2, p. 241-248, 1981.

LÉGER, L. La caféine, un insecticide? **La Recherche**, v. 16, n. 165, p. 554-555, 1985.

LEITÃO, A.A.C., ALCANTARA GOMES, R. **Mecanismos de Reparação do DNA em Escherichia coli.** IN COSTA, S.O.P. Genética Molecular e de Microorganismos. Os Fundamentos da Engenharia Genética, Editora Manole LTDA, p. 135-166, 1988.

LEHMANN, A.R., KIRK-BELL, S., ARLETT, C.F., PATERSON, M.C., LOHMAN, P.H.M., WEERD-KASTELEIM, E.A., BOOTSMA, D. Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 1, p. 219-223, 1975.

LEONARD, T.K., WATSON, R.R., MOHS, M.E. The effects of caffeine on various body systems: a review. **J. Am. Diet. Association**, v. 87, n. 8, p. 1048-1053, 1987.

LOPRIENO, N., BARALE, R., BARONCELLI, S. Genetic effects of caffeine. **Mutation Research**, v. 26, p. 83-87, 1974.

MAcPHEE, D.G., LEYDEN, M.F. Effects of caffeine on ultraviolet-induced base-repair substitution and frameshift mutagenesis in **Salmonella. Mutation Research**, v. 143, p. 1-3, 1985.

MANTE, S., MINNEMAN, K.P. Caffeine inhibits forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation in rat brain. **European Journal of Pharmacology**, v. 175, p. 203-205, 1990.

MENDELSON, D., SOBELS, F.H. The inhibiting effect of caffeine on the maternal repair of radiation-induced chromosome breaks in **Drosophila. Mutation Research**, v. 26, p. 123-128, 1974.

MITTLER, S., MITTLER, J.E., OWENS, S.L. Loss of chromosomes and nondisjunction induced by caffeine in **Drosophila. Nature**, v. 214, p. 424, 1967.

NAKAMOTO, T., GRANT, S., YAZDANI, M. The effects of maternal caffeine intake during pregnancy on mineral contents of fetal rat bone. **Res. Exp. Med.**, v. 189, p. 275-280, 1989.

NETER, J., WASSERMAN, W. **Applied Linear Statistical Models**; Homewood Richard D. Irwin, Inc, 1974.

NISHI, Y., HASEGAWA, M.M., INUI, N. Production of chromosome pulverization specially associated with the effect of post-treatment with caffeine after treatment with different classes of clastogens in Chinese hamster V79 cells. **Jpn. J. Genet.**, v. 58, n. 1, p. 11-22, 1983.

OKOYAMA, S., KITAO, Y. Inhibition of chromosome repair by caffeine or isonicotinic acid hydrazide on chromosome damage induced by mitomycin C in human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 81, n. 1, p. 75-80, 1981.

OLIVIER, P., MARZIN, D. Study of the genotoxic potential of 48 inorganic derivatives with the SOS chromoteste. **Mutation Research**, v. 198, p. 263-269, 1987.

OSTERTAG, W., DUISBERG, E., STURMANN, M. The mutagenic activity of caffeine in man. **Mutation Research**, v. 2, p. 293-296, 1965.

PARK, C.K., OHGODA, O., NIWA, K. Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. **J. Reprod. Fert.**, v. 86, p. 577-582, 1989.

PERES, C.A., SALDIVA, C.D. Planejamento de Experimentos. **5º Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística**, SP, 1983.

POLLARD, I., JABBOUR, H., MEHRABANI, P.A. Effects of caffeine administered during pregnancy on fetal development and subsequent function in the adult rat: prolonged effects on a second generation. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 22, p. 1-15, 1987.

PONS, F.W., MULLER, P. Induction of frameshift mutations by caffeine in **Escherichia coli** K12. **Mutagenesis**, v. 5, n. 2, p. 173-177, 1990.

REES, J.M., FORD, W.C.L., HULL, M.G.R. Effect of caffeine and pentoxifylline on the mobility and metabolism of human spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, v. 90, p. 147-156, 1990.

REICKS, M., RADER, J.I. Effects of dietary tin and copper on rat hepatocellular antioxidant protection (43130). **Proc. Soc. Exp. Biol. Medicine**, v. 195, p. 123-128, 1990.

ROSS, C.P., PERSAUD, T.V.N. Craniofacial and limb development in early rat embryos following in utero exposure to ethanol and caffeine. **Anat. Anz. Jena**, v. 170, p. 9-14, 1990.

SASAKI, H., NISHIMOTO, T. X-ray-related potentially lethal damage expressed by chromosome condensation and the influence of caffeine. **Radiation Research**, v. 120, p. 72-82, 1989.

SASAKI, Y.F., IMANISHI, H., OHTA, T., SHIRASU, Y. Modifying effects of components of plant essence on the induction of sister-chromatid exchanges in cultured Chinese hamster ovary cells. **Mutation Research**, v. 226, p. 103-110, 1989.

SCHOFF, P.K., LARDY, H.A. Effects of fluoride and caffeine on the metabolism and mobility of ejaculated bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 37, p. 1037-1046, 1987.

SEALE, T.W., JOHNSON, P., RODERICK, T.H., CARNEY, J.M., RENNERT, O.W. A single gene difference determines relative susceptibility to caffeine-indiced lethality in SWR and CBA inbred mice. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 23, p. 275-278, 1985.

SEHGAL, S.S., SIMÕES, L.C.G. Preliminary results on the effects of neurotropic drugs on **Drosophila melanogaster. Ciência e Cultura**, v. 28, n. 8, p. 917-920, 1976.

SEHGAL, S.S., SIMÕES, L.C.G., JURAND, A. Effects of caffeine on growth and metamorphosis of moth fly **Telmatoscopus albipunctatus** (Diptera, Psychodidae). **Ent. Exp. & Appl.**, v. 21, p. 174-181, 1977.

SMITH, S.E., MCEIHATTON, P.R., SULLIVAN, F.M. Effects of administering caffeine to pregnant rats either as a single daily dose or as divided doses four times a day. **Fd. Chem. Toxic.**, v. 25, n. 2, p. 125-133, 1987.

SOARES, J.F., BARTMAN, F.C. Métodos Estatísticos em Medicina e Biologia, 14º Colóquio Brasileiro de Matemática, IMPA, Poços de Caldas, 1983.

SOMANI, S.M., GUPTA, P. Caffeine: a new look at an age-old drug. **International Journal of clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology**, v. 26, n. 11, p. 521-533, 1988.

SRINIVASAN, A., PREMKUMAR-REDDY, E., SARMA, P.S., SCHULZ, R.A. Inhibition of RNA-dependent DNA polymerase activity of oncornaviruses by caffeine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 91, n. 1, p. 239-246, 1979.

STAVRIC, B., GILBERT, S.G. Caffeine metabolism: A problem in extrapolating results from animal studies of humans. **Acta. Pharm. Jugosl.**, v. 40, p. 475-489, 1990.

STORZ, G., TARTAGLIA, L.A., AMES, B.N. Transcriptional relator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. **Science**, v. 248, p. 189-194, 1990.

TANAKA, H., NAKAZAWA, K., ARIMA, M. Effects of maternal caffeine ingestion on the perinatal cerebrum. **Biol. Neonate**, v. 51, p. 332-339, 1987.

TANZARELLA, C., ASTOLFI, S., PALITTI, F. Effect of caffeine on induced damage in cells of **Xenopus laevis. Mutation Research**, v. 128, n. 1, p. 25-29, 1984.

TARGA, H.J. Synergism between caffeine and y-radiation in the induction of dominant lethal mutations in oocytes and spermatozoa of **Musca domestica. Mutation Research**, v. 110, p. 311-325, 1983.

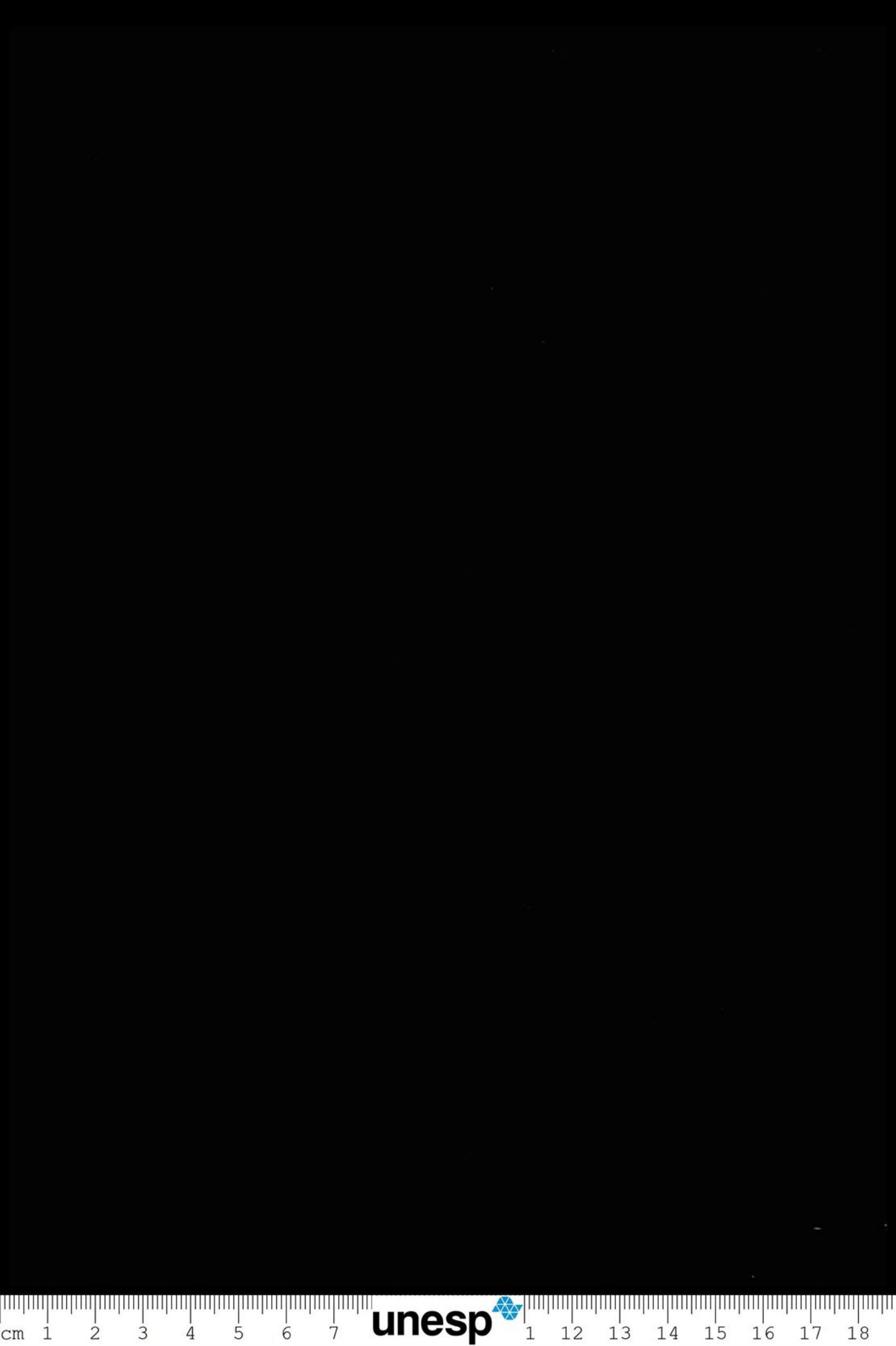
TERASAKA, O., NIITSU, T. Unequal cell division and chromatin differentiation in pollen grain cells. I. Centrifugal, cold and caffeine treatments. **Bot. Mag. Tokyo**, v. 100, p. 205-216, 1987.

TIMSON, J. Caffeine. **Mutation Research**, v. 47, p. 1-52, 1977.

TRIPATHY, N.K., WURGLER, F.E., FREI, H. Genetic toxicity of six carcinogens and six non-carcinogens in the **Drosophila** wing spot test. **Mutation Research**, v. 242, p. 169-180, 1990.

WILCOX, A., WEINBERG, C., BAIRD, D. Caffeinated beverages and decreased fertility. **The Lancet**, v. II, n. 8626/8627, p. 1453-1456, 1988.

YOKOGOSHI, H., TANI, S., AMANO, N. The effects of caffeine and caffeine-containing beverages on the disposition of brain serotonin in rats. **Agric. Biol. Chem.**, v. 51, n. 12, p. 3281-3286, 1987.


cm 1 2 3 4 5 6 7
unesp
1 12 13 14 15 16 17 18