

Mary Massumi Itoyama

**Efeito da Cafeína Sobre Aspectos Reprodutivos
e do Desenvolvimento em *Drosophila* Presaltans**

EFEITO DA CAFEÍNA SOBRE ASPECTOS REPRODUTIVOS E
DO DESENVOLVIMENTO EM *Drosophila prosaltans*.

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Genética, 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".

São José do Rio Preto

1 989



T-443/90



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 da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

ORIENTADORA:

Prof^a Dr^a Hermione Elly Melara de Campos Bicudo



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 da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

DEDICO A:

Dani, Diego e Fabrício,
meus sobrinhos.

Oswaldo, Mirio, Béa,
Sandra, Flávio e André,
meus primos.

Newton, Dirceu e Celso,
meus irmãos.



DEDICO A:

Dani, Diogo e Fabrício,
meus sobrinhos.

Osvaldo, Mário, Beto
Sandro, Flávio e André,
meus primos.

Newton, Dirceu e Celso,
meus irmãos.



"Que os nossos esforços desa-
fiem as impossibilidades.
Lembra-vos de que as gran-
des proezas da história fo-
ram conquistas do que pare-
cia impossível".

Charlie Chaplin

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 querida mestre, grande pesquisadora e amiga, Professora Doutora Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, incansável orientadora deste trabalho, que muito tem contribuído para minha formação científica, pela orientação segura e dedicada, pelo constante incentivo e renovação de coragem e entusiasmo que sempre nos proporcionou, 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.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação e estagiários do Departamento, pela convivência agradável e pelas proveitosas trocas de idéias.

À Prof^a Maria Tercília V.A. de Oliveira, Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, Prof^a Satiko Nanya, Prof^a Lilian M. Ravazzie Prof^a Dr^a Rosilux P.B. Pacheco, pela valiosa colaboração e constante troca de idéias e estímulos.

À amiga Elza M. Hashimoto, pela presença companheira, alegria e ajuda na correção do texto.

Aos amigos João R. Santos, Jorge F. Buchidid, Josué R. Santos, Paulo A. Maziero, Rosana Selestino, Sebastião D. Barbosa, Simone R. Carvalho e Yone S. Dias pela colaboração na parte prática deste trabalho.



Às Senhoras, Palmira G. Gonçalves, Ivanilde M. Brandão e Bernadete D. Trevisan, responsáveis pela limpeza.

Às Professoras Cláudia M.A. Camargo e Ana M.A. Oliveira, pela valiosa colaboração na análise estatística.

Ao Prof. Dr. Laerte Miola pela compreensão.

Aos funcionários do Laboratório de Computação Getúlio A. Salinas e José W. Silva, pela atenção.

À Sr^a Soraia F.R. Soares, pela atenção e disposição na confecção dos gráficos.

À Sr^a Linda Lúcia Comar, pelos serviços de datilografia, pela presteza e delicadeza constante.

À Sr^a Nancy Q.A. Pereira, Sr^{ta} Onilda N. Oliveira e Sr. José F.R. Silva, 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 e aos meus primos Oswaldo, Mário, Roberto, Sandro, Flávio, André, Sadaco, Masako e Luis, pela paciência e carinho.

Aos meus queridos sobrinhos Daniela, Diogo e Fabrício, que fornece-me os momentos mais felizes de minha vida.

Ao Dr. Luís Carlos Bicudo, pela xícara de café mais valiosa do mundo.

Ao Prof. Dr. James R. Coleman, pela revisão do Summary e conclusions.

Aos Professores Doutores Luís Carlos Simões e Wladimir João Tadei, pelas valiosas sugestões durante a análise criteriosa da *pro forma* desta dissertação.



À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de Mestrado.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, com palavras encorajadoras, minha eterna gratidão., em especial a Prof^a Eliana M. Versute.

1. Introdução e Justificação da Pesquisa	17
2. Manutenção em Laboratório e Criação de Cultura Utilizando-se de Experimentos	17
3. Experimentos	18
3.1. Efeito da cafeína sobre a produtividade	18
3.2. Efeito da cafeína sobre o tempo de desenvolvimento	21
3.3. Efeito da cafeína sobre a longevidade	22
3.4. Efeito da cafeína sobre a reprodução	23
3.5. Teste de preferência de meio com ou sem cafeína para oviposição	24
3.6. Efeito da cafeína sobre o peso das moscas	24
4. Preparação das amostras	25
5. Métodos de análise	27
5.1. Preparo dos líquidos	27
5.2. Preparo das amostras	28
5.3. Identificação das alterações	29
114. RESULTADOS	31
1. Efeito da Cafeína Sobre a Produtividade da <i>Drosophila melanogaster</i>	31
2. Efeito da Cafeína sobre o Tempo de Desenvolvimento da Larva	42

ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO	1
II.	MATERIAIS E MÉTODOS	17
1.	Espécie e Linhagem Utilizada	17
2.	Manutenção em Laboratório e Meios de Cultura Utilizados nos Experimentos	17
3.	Experimentos	19
3.1.	Efeito da cafeína sobre a produtividade	19
3.2.	Efeito da cafeína sobre o tempo de desen volvimento	21
3.3.	Efeito da cafeína sobre a longevidade	22
3.4.	Efeito da cafeína sobre a oviposição	23
3.5.	Teste de preferência de meio com ou sem cafeína para oviposição	24
3.6.	Efeito da cafeína sobre o peso das moscas....	24
4.	Preparações citológicas	25
5.	Estudo das esterases por eletroforese em gel de poliacrilamida	27
5.1.	Preparo dos géis	27
5.2.	Preparo das amostras	29
5.3.	Identificação das esterases	29
III.	RESULTADOS	31
1.	Efeito da Cafeina Sobre a Produtividade de <i>Drosophila prosaltans</i>	31
2.	Efeito da Cafeína sobre o Tempo de Desenvolvi mento	42



3. Efeito da Cafeína sobre a Longevidade.....	49
4. Efeito da Cafeína sobre a Oviposição	63
5. Efeito da Cafeína sobre o Peso das Moscas	66
6. Efeito Citológico da Cafeína	66
7. Estudo das Esterases por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	69
IV. DISCUSSÃO	75
V. RESUMO E CONCLUSÕES	91
VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS	95
VII. BIBLIOGRAFIA	99

I - INTRODUÇÃO

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina, $C_8H_{11}N_4O_2$) é um estimulante do sistema nervoso central, largamente consumida como componente do café, chá e outras bebidas, estando também contida em uma variedade de produtos medicinais. Ela é produzida pela conversão enzimática da xantina.

TIMSON (1977) apresenta uma revisão dos produtos naturais que contêm cafeína e seu uso em diversas partes do mundo. Por exemplo, na região amazônica, a bebida guaraná é preparada a partir de sementes de *Paullinia cupana* e *P. sorbelis*, e outra bebida, o yoco, é feita com a casca de *P. yoco*. A casca desta última planta possui de 3 a 6% de cafeína. Outra planta muito antiga, usada no preparo do mate é a *Ilex paraguensis*. Ela é nativa das montanhas do Paraguai e é extensivamente cultivada na Argentina e sul do Brasil; o conteúdo de cafeína, no mate, pode ser superior a 0,7%. Ainda de acordo com TIMSON (1977), provavelmente a bebida não alcoólica mais frequentemente consumida seja o chá preparado com as folhas de *Camellia sinensis*, um arbusto nativo da China e agora extensivamente cultivado na Índia e muitas cidades da Ásia e oeste da África. Parece que, no início, esse chá era empregado na medicina e só mais tarde passou a ser usado como bebida.

O café é preparado a partir dos frutos das espécies de *Coffea*, especialmente *C. arabica* da qual provém cerca de 90% do café consumido no mundo. O grão de *C. arabica* contém de 0,7 a 1,5% de cafeína. A planta é nativa da Etiópia e é também cultivada na América do Sul e Central, principalmente no Brasil, Colômbia e Costa Rica. Outras espécies de



Coffea usadas incluem *C. liberica*, *C. robusta* e *C. canephora*. A última é nativa da região do Congo e é cultivada na Indonésia.

Cola nitica é uma árvore nativa do oeste da África que agora é frequentemente cultivada no Brasil, Índia e Jamaica. Um certo tipo de chá é preparado a partir de suas sementes.

Já o chocolate e as bebidas de cacau são preparadas a partir de sementes de *Teobroma cacao*, as quais contêm cerca de 1% de teobromina e uma menor quantidade de cafeína. O cacau possui acima de 50 mg de cafeína por xícara.

Segundo STAVRIC e cols. (1988) o consumo de cafeína em uma amostra de indivíduos usuários do café, por eles analisada, variou de 49 a 1022 mg/dia, com uma média, por xícara, de 80 mg. Ainda segundo o mesmo autor, esses cálculos são importantes para estudos de dose-resposta, tendo em vista o risco de uma variedade de doenças agudas e crônicas relacionadas com o consumo do café. Na verdade a humanidade vem se submetendo aos efeitos da cafeína por muitas gerações.

A cafeína, por seu comportamento semelhante ao das bases ou álcalis, inclui-se entre as substâncias chamadas alcalóides. É um pó branco ou massa branca constituída por longos cristais aciculares, brancos, 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 H₂O, a 25°C é de 2,80 g/100 ml H₂O e a 100°C, de 50 g/100 ml H₂O. A solubilidade em outros solventes, como acetona, clorofórmio e etanol, a 25°C, é de, respectivamente, 2,0, 18,2 e 1,5 g/100 ml do solvente.

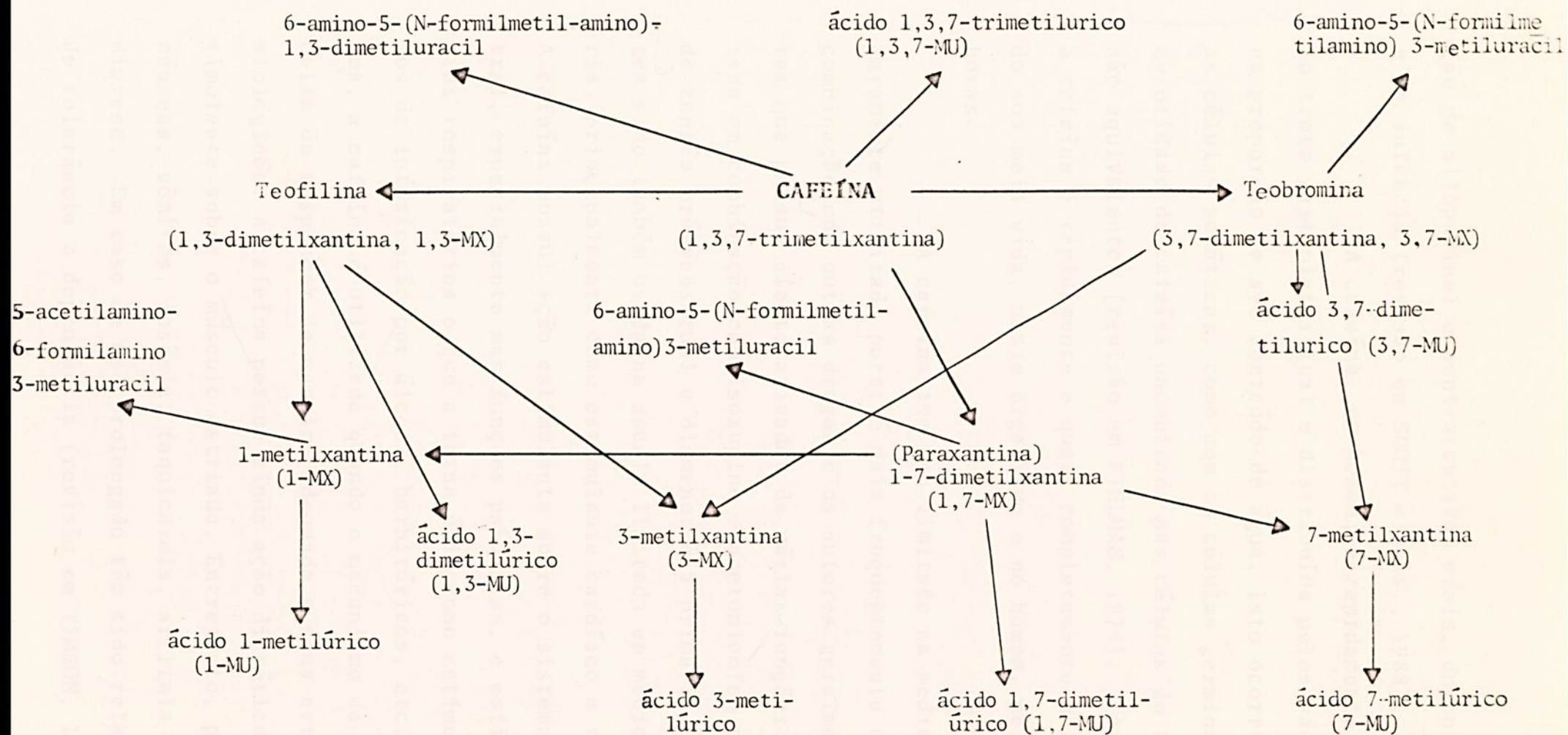


Os sais de cafeína dissociam-se por evaporação de suas respectivas soluções aquosas. A cafeína é facilmente decomposta em cafeinidina, com tratamentos álcalis à quente; possui um sabor amargo.

A cafeína, no homem, é metabolizada primeiramente por oxidação e desmetilação, sob influência do sistema oxidase de função mista, dependente do citocromo P-450, das células microsossomais hepáticas (SCOTT e cols., 1988).

De acordo com SCOTT e cols. (1988), somente 1 a 3% da dose ingerida de cafeína é excretada pela urina, de forma inalterada. A maior parte da cafeína é N-desmetilada nas posições 7 e 3 produzindo 1-metilxantina (1-MX) e o seu metabólito posterior, o ácido 1-metilúrico (7-MX), 1,7-dimetilxantina (1,7-MX) e ácido dimetilúrico (1,7-MU). Esses autores apresentaram um quadro da via metabólica da cafeína, que transcrevemos na página seguinte.

O efeito de doenças do fígado na eliminação da cafeína foi estudado por monitoração da saída (clearance) da cafeína administrada por via oral ou intravenosa, do plasma, e por medida do CO_2 no ar expirado, após injeção intravenosa de cafeína. Os resultados destes estudos mostraram que, em pacientes com cirrose, a saída da cafeína do plasma é significativamente reduzida e sua meia vida é significativamente prolongada. Mudanças menos significativas foram encontradas em pacientes com doenças do fígado não cirróticas. A saída reduzida da cafeína em pacientes com doenças crônicas do fígado é usualmente atribuída a uma redução na massa de hepatócitos funcionantes. Entretanto, o atraso na eliminação pode refletir alterações específicas na biotransformação da cafeína. Mudanças na remoção da cafeína foram relatadas após a administra-



Via metabólica da cafeína (segundo SCOTT e cols., 1988)

ção de allopurinol e contraceptivos orais, durante a gravidez e na infância (revisão em SCOTT e cols., 1988).

A cafeína, no homem, é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e distribuída pelos vários tecidos na proporção de seu conteúdo de água. Isto ocorre tanto com as células somáticas, como com as células germinativas. A quantidade de cafeína encontrada nas células do feto e da mãe são equivalentes (revisão em KIHLMAN, 1974). Também no rato a cafeína é rapidamente e quase completamente metabolizada sendo sua meia vida, nesse organismo e no homem, de cerca de 3 horas.

A cafeína tem uso limitado na medicina. Ela é raramente utilizada pura; é mais frequentemente utilizada em combinação com outras drogas e os autores geralmente acreditam que possui efeito ativador de várias funções. Foi utilizada em combinação com isoxupine e acetominofen no tratamento de tensão pré-menstrual e dismenorréia primária. A cafeína tem sido também usada na escala limitada em medicina veterinária, principalmente como estimulante cardíaco e respiratório. A cafeína possui ação estimulante sobre o sistema nervoso central, especialmente nas funções psíquicas, e estimula os centros respiratórios o que a torna útil como estimulante em casos de intoxicação por álcool, barbitúricos, etc. Nestes casos, a cafeína é utilizada quando o mecanismo da respiração deixa de responder de maneira adequada a seus estimulantes fisiológicos. A cafeína possui ainda ação diurética e efeito estimulante sobre o músculo estriado. Entretanto, pode causar náuseas, vômitos, insônia, taquicardia, arritmia cardíaca e diurese. Em caso de uso prolongado têm sido relatados casos de tolerância e dependência (revisão em TIMSON, 1977).



A cafeína tem sido também relacionada com a elevação da pressão sanguínea, com a doença fibrocística, com o câncer do pâncreas e da bexiga, com a elevação do colesterol no soro sanguíneo e com outros problemas de saúde (STAVRIC e cols., 1988).

Sabe-se que a cafeína protege naturalmente as plantas contra infecções bacterianas, bolores patogênicos ou ainda na competição com outras plantas (PUTNAM, 1983, in LÉGER, 1985). Possui efeitos pestistático e pesticida (NATHANSON, 1984).

Vários trabalhos têm indicado que a cafeína apresenta um efeito potencial danoso ao desenvolvimento humano e animal. Alguns desses trabalhos mostraram que a cafeína teria efeito teratogênico, causando malformações quando administrada oralmente a ratas grávidas, em doses maiores do que 75 mg/Kg. Essas malformações abrangem palato fendido e outras anomalias menores como hemorragia subcutânea, edema, redução do peso fetal e retardo na ossificação. Uma pequena revisão dos efeitos teratogênicos da cafeína foi apresentada por SMITH e cols. (1987).

KAWANO & SIMÕES (1987), demonstraram que o tratamento de embriões de *Biomphalaria glabrata* com cafeína induz malformações que abrangem o retardo na clivagem de células, alterações no número de células na vesícula da cabeça e nas placas apicais, monoftalmia e exogástrula.

Foi demonstrado que a cafeína acumula na mulher grávida, atravessa a placenta e atinge o feto que não tem as enzimas necessárias para o seu metabolismo. Essas evidências sugerem que a intoxicação do embrião, induzida pela cafeína, é possível. Para os autores, entretanto, não está claro se a droga afeta diretamente o embrião ou causa um efeito materno, tal como a secreção excessiva de catecolaminas que pode comprometer secundariamente o desenvolvimento (BRUYERE e cols., 1988).

Uma malformação específica nos descendentes de



ratas grávidas tratadas com cafeína a 75 mg/Kg é a ectrodactilia em que o efeito é proporcional à dose. Esse trabalho foi realizado por BERTRAND e cols. (1965, in TIMSON, 1977). Resultados posteriores (BERTRAND e cols., 1970, citado no mesmo trabalho), mostraram que a indução desta malformação específica, em ratos, pela cafeína, estava em parte sob o controle genético, uma vez que ocorreu em algumas linhagens e não em outras. Esse efeito da cafeína foi considerado teratogênico e não mutagênico, pois nenhum caso de malformação foi encontrado em 60 descendentes dos ratos afetados pela cafeína.

Um dos trabalhos pioneiros com cafeína foi realizado por DRUCKREY & SCHREIBER (1938, in TIMSON, 1977) em ouriço do mar. Esse organismo teve seu desenvolvimento normal inibido pela cafeína a 200 mg/l. O mesmo autor cita que o zigoto de *Arbacia punctulata* tem seu processo de diferenciação completamente inibido sob o efeito da cafeína, em concentração igual ou superior a M/40.

No diptero, *Telmatoscopus albipunctatus*, SEHGAL e cols. (1977) mostraram que a cafeína causa severo retardo do crescimento e desenvolvimento e uma mortalidade elevada das larvas. Pupas tratadas originaram adultos com abdomens alongados, asas anormais e fertilidade reduzida.

O tratamento de ovos e larvas de *Drosophila melanogaster* com algumas drogas, incluindo a cafeína foi realizado por SEHGAL & SIMÕES (1976). Esses autores verificaram que as drogas utilizadas não causaram retardo no desenvolvimento larval, mas as fêmeas resultantes apresentaram malformações do ovário e esterilidade na maioria dos casos. Os autores atribuíram as alterações no desenvolvimento do ovário à degeneração de células dos gânglios cerebrais que poderiam interromper a síntese e a liberação dos hormônios responsáveis pela diferenciação ovariana e formação dos oócitos, da mesma forma que foi sugerida no caso da mariposa *Hyalophora cecropia* por BLAUSTEIN & SCHNEIDERMAN (1960, in SEHGAL & SIMÕES, 1976).

O efeito da cafeína foi estudado também na formação de tumores melanóticos que algumas linhagens de *Drosophila* desenvolvem espontaneamente. PALADINO & CAVOLINA (1984), verificaram que a linhagem tu-pb de *Drosophila melanogaster*, tratada com cafeína, mostra redução significativa da



incidência de tumores. Entretanto, a cafeína só é ativa se aplicada durante as primeiras fases do desenvolvimento.

TIMSON (1977) relata dados de WEATHERSBEE (1975) segundo os quais exemplares de hamster chinês tratados com 0,02 g/100 ml de cafeína na água de beber por 60 dias, produziram ninhadas com uma mudança significativa na razão de sexo (49,2% de fêmeas no controle para 61,4% de fêmeas na amostra tratada).

TIMSON (1977) também relata o trabalho de NISHIMURA & NAKAI (1960), segundo o qual injeções intraperitoniais de 1% de cafeína por 0,25 mg/g peso corpóreo (esta é a dose máxima tolerada) em fêmeas grávidas de camundongo, do 7º ao 15º dias de gravidez, causaram morte embrionária e fetos malformados. Taxas de malformações fetal de 18 a 43% foram obtidas quando as injeções foram dadas entre o 10º e o 14º dias. A maioria das malformações observadas atingiram o sistema esquelético, especialmente os dedos e o palato (fendido). Em outro trabalho foi sugerido que a cafeína poderia estar agindo como um co-teratogênico (YIELDING e cols., 1976, in TIMSON, 1977), pois causou um aumento significativo no número de descendentes com palato fendido, causado por raios X a 200 rad, quando administrada em doses não teratogênicas à fêmeas grávidas de camundongo.

Os efeitos da cafeína no reparo do DNA e na mutagênese têm sido estudados em eucariotos e procariotos. Efeitos mutagênicos, co-mutagênicos, anti-mutagênicos e anti-carcinogênicos foram atribuídos à cafeína em diferentes trabalhos, às vezes para um mesmo organismo.

CLARKE & WADE (1973, in MACPHEE & LEYDEN, 1985) verificaram em *Escherichia coli* que a cafeína é um mutagênico do tipo "frameshift". Já em *Salmonella typhimurium*, MACPHEE & LEYDEN (1985), observaram que a cafeína inibe significativamente a ocorrência de mutações devidas à substituição de pares de base, induzidas pelos raios ultravioletas, mas tem um efeito pequeno na origem de mutações "frameshift", na mesma população de células.

Um aspecto comum a todos os trabalhos parece ser a indicação de que a cafeína tem a capacidade de inibir diferentes processos de reparo do DNA, levando aos resultados observados (MACPHEE & LEYDEN, 1985).



CHAUDHURI & GHOSH (1982) estudaram, em células de Sarcoma-180 de camundongos, o efeito da cafeína sobre os ácidos nucleicos observando uma relação dose-dependente. Em altas doses, a cafeína mostrou uma inibição da incorporação dos precursores radioativos no DNA, RNA e proteína. De acordo com os autores, este efeito inibitório é parcialmente devido à inibição da incorporação dos precursores adicionados e parcialmente devido à inibição da síntese. O efeito inibitório da cafeína no processo sintético foi eliminado por incubação das células tratadas em meio livre de cafeína, assim, podendo ser explicado com base em que a interação DNA-cafeína possivelmente seja um processo físico. Os mesmos autores observaram que altas doses de cafeína produzem letalidade que pode ser devida ao aumento de quebras no DNA por aumento concomitante na atividade DNase intranuclear. Nesse sentido, SEHGAL e cols. (1977) verificaram que a cafeína afeta o grau de politenização dos cromossomos de *Telmatoscopus albipunctatus*, atribuindo esse efeito ao retardo da síntese de DNA.

SANDLIE & KLEPPE (1982) estudaram a influência da cafeína na concentração de vários nucleosídeos trifosfatados, além do dTMP e dTDP, em *Escherichia coli*. Para a maioria dos nucleosídeos trifosfatados a presença de 10 mM de cafeína no meio resultou em um pequeno aumento na quantidade, 5 minutos após a adição, seguido por decréscimo lento para a concentração inicial. No caso de dTTP, entretanto, atingiu a quantidade máxima, 2 vezes superior ao valor inicial, 30 minutos após a adição da cafeína. Os autores atribuíram este aumento no nível de dTTP a um efeito provável da cafeína sobre o processo de síntese do DNA e síntese de açúcar-dTDP.

Efeito da cafeína na inibição da DNA polimerase foi descrita por vários autores, como por exemplo, VRAG e cols. (1967, in SRINIVASAN e cols., 1979). Os últimos autores mostraram que, sem dúvida, a cafeína inibe a DNA polimerase de-



pendente do RNA (transcriptase reversa) em vírus oncogênicos de murinus e aves.

LOPRIENO e cols. (1974) observaram no cromossomo II de *Schizosaccharomyces pombe*, que a cafeína reduz o número de recombinantes com simples e duplo crossing-over. Foi também estudado o efeito da cafeína sobre a frequência de conversão gênica entre sítios heterozigotos localizados a diferentes intervalos, no locus *ade 7*. A frequência de conversão do gene foi diferencialmente influenciada pela cafeína, dependendo da distância dos heteroalelos analisados.

Segundo OKOYAMA & KITAO (1981), a frequência de trocas intercromatídicas por mitomicina C em cultura de linfócitos humanos é diminuída marcadamente na presença de cafeína ou ácido isonicotínico hidrazida (INH) durante um período pós-tratamento, indicando existência de um processo sensível a essas substâncias na formação de trocas.

Em *Drosophila melanogaster*, DE MARCO & POLANI (1981) observaram que a cafeína (10^{-2} M) induz altos níveis de aberrações cromatídicas nos gânglios neurais de larvas de terceiro estágio, quando adicionada às células em G_2 tardio e prófase mitótica. Foi observado também, nessas fases e em S, que a cafeína aumenta fortemente os danos induzidos por raio-X. Os autores apresentaram a hipótese de que, em diferentes estágios de S, a cafeína pode inibir uma fase tardia do processo de excisão-reparo, somente quando ele foi ativado pela presença de lesões no DNA induzidas por agentes físicos ou químicos. Essa hipótese pode explicar tanto a potenciação como a capacidade da cafeína sozinha induzir aberrações em estágios particulares.



Desde que os efeitos de potenciação de pós-tratamento com cafeína na morte celular e nos danos cromossômicos induzidos por mutagênicos foram descobertos, respectivamente por RAUTH (1967) e SHONEICH e cols. (1970, ambos in KIHLMAN e cols., 1982), esses efeitos têm sido extensivamente estudado em muitos laboratórios. O aumento causado pela cafeína, embora nem sempre da mesma magnitude, tem sido observado em muitos materiais diferentes e após exposição a um grande número de agentes físicos e químicos diferentes.

Micro-irradiação UV de pequena parte dos núcleos de hamster chinês e pós-incubação com cafeína resulta frequentemente em cromossomos quebrados na primeira mitose após a irradiação. Em algumas destas células mitóticas, as quebras cromossômicas são restritas a poucos cromossomos espacialmente relacionados em uma pequena área da metáfase espalhada; em outros, as quebras ocorrem no complemento cromossômico completo (CREMER e cols., 1983).

O efeito da cafeína sobre aberrações cromossômicas induzidas in vivo (camundongos) por trietilelinimelamine (TEM) e adriamicina(ADR) foi estudado por DULOUT e cols. (1981). Os tratamentos combinados com TEM mais cafeína mostram a potencialização da primeira droga pela segunda na frequência de falhas, quebras e trocas cromatídicas. Tratamento com ADR mais cafeína potencializa o efeito apenas na frequência de fusões cêntricas. Os resultados foram explicados com base no envolvimento das drogas nos processos de síntese e reparo de DNA.

Os efeitos de pós-tratamento com cafeína sobre as frequências de aberrações cromossômicas, induzidas por outros agentes foi estudada por outros autores também. Entre



eles incluem-se KIHLMAN e cols. (1982), que estudaram o problema em linfócitos humanos e pontas de raiz de *Vicia faba*. Os resultados do pós-tratamento variam em função da fase em que este ocorre e com o organismo considerado, causando forte aumento ou mesmo nenhuma alteração.

HERNÁNDEZ e cols. (1986), mostraram que a cafeína (1 a 10 mM) induz aberrações cromossômicas em células de meristema de raiz de *Allium cepa*, em cultura, de forma dose-dependente e a eficiência do tratamento está correlacionado com o quadrado da concentração de cafeína. Os autores verificaram também, utilizando variações de temperatura de 5 a 25°C, que quanto mais baixa a temperatura de cultura, maior o nível de aberrações. Entretanto, em diferentes temperaturas, o nível de aberrações cromossômicas é uma simples função da concentração de cafeína e do nível de ATP. Portanto, a eficiência do tratamento com cafeína parece ser determinada por algum tipo de interação entre a concentração de cafeína e o nível de ATP celular. Na indução de aberrações cromossômicas, quanto mais baixo o nível de ATP, maior a eficiência da cafeína.

CHINNICI & BETTINGER (1984) testaram a sensibilidade de 35 populações de *Drosophila melanogaster*, ao carcinogênico aflatoxina B1 e à cafeína. A maioria das linhagens foi mais afetada pela aflatoxina do que pela cafeína, mas, variações significativas na sensibilidade para cada substância foram encontradas nas populações. Oito delas foram testadas para os efeitos da administração simultânea de aflatoxina e cafeína. A cafeína demonstrou um efeito protetor significativo contra o alto grau de mortalidade ovo-adulto produzido pela aflatoxina e um retardo na diminuição do comprimento do corpo, mostrado pelos adultos que sobrevivem ao tratamento com aflatoxina.



No trabalho de LA PEÑA e cols. (1981), solução de cafeína a 0,1% foi injetada em plantas de centeio em várias fases do desenvolvimento da espiga. A citocinese foi inibida na linhagem germinativa e as células binucleadas sofreram bimeiose.

A cafeína também inibe a citocinese em células somáticas, sem alterar a cariocinese, dando origem a células binucleadas GIMENEZ-MARTIN e cols. (1964, in LA PEÑA e cols., 1981). De acordo com ESPINO & VASQUEZ (1981), embora a ação primária da cafeína, nas células em cultura, seja a formação de células polinucleadas, a fusão dos núcleos, nessas células, leva à formação de núcleos poliplóides.

Muitos trabalhos mostram o envolvimento da cafeína com a atividade enzimática celular. Além dos trabalhos já mencionados, anteriormente, podemos citar o de BALACHANDRAN & SRINIVASAN (1982) que observaram que a cafeína inibe a atividade da DNA polimerase de *Escherichia coli* e de seu grande fragmento proteolítico, no sistema de replicação do DNA, in vitro. Resultados obtidos em estudos de tempo indicaram que a inibição pela cafeína atinge o máximo aos 30 minutos de incubação. Estudos de cinética enzimática mostraram que a inibição era competitiva com respeito ao molde de DNA.

Uma pequena revisão dos efeitos enzimáticos da cafeína foi apresentada também por TIMSON (1977). Esse autor cita KIHLMAN & OVERGARD-HANSEN (1955) segundo os quais a cafeína a 10^{-2} M inibe quase completamente a atividade da fosforilase, no músculo de coelho. Este efeito inibitório pode ser revertido completamente pela 5'-AMP a baixas concentrações. Fosforilases de plantas e algumas outras enzimas, incluindo nucleosídeo fosforilase, a desoxirribonuclease, a xan



tina oxidase, a G6PD hexoquinase e a fosfoglucomutase não foram afetadas pela cafeína. No trabalho de revisão, são citados os resultados de BUTCHER & SUTHERLAND (1962) segundo os quais a ação da fosfodiesterase de nucleotídeos 3' 5'cíclicos foi competitivamente inibida pela cafeína, e os de COHEN e cols. (1976) que mostraram que a cafeína a 10mM inibiu 40% da atividade da mesma enzima, em células mamárias normais de ratos e 80% em células neoplásicas do mesmo tecido, em culturas de monocamadas.

Também em vertebrados, SUTHERLAND & RALL (1958 , in LÉGER, 1985) mostraram que as metilxantinas inibem as enzimas fosfodiesterases, cujo papel é transformar, por hidrólise, a adenosina monofosfato cíclica (AMPC) em adenosina monofosfato (AMP). Se a concentração de AMPC aumenta, há inibição da contração dos músculos esqueléticos e parece razoável dizer que o efeito inibitório da cafeína é mediado pelo AMPC (AHN e cols., 1988).

Além da cafeína inibir a enzima fosfodiesterase, ela também é um competitivo antagônico dos receptores de adenosina extracelular (YOKOGOSHI e cols., 1987). Administração de adenosina a animais pode produzir muitas ações fisiológicas (sedação, bradicardia, hipotensão e hipotermia) e estes efeitos geralmente são opostos à aqueles produzidos pela cafeína.

YOKOGOSHI e cols. (1987) analisaram os efeitos da cafeína e da adenosina nos aminoácidos presentes em cérebros de ratos. Em resumo, os resultados obtidos suportam os de outros estudos, segundo os quais a cafeína inibe a atividade de fosfodiesterase, in vivo, aumentando os níveis de AMPC no soro. A adenosina é um potente estimulador da ciclase adeni-



lato em muitos tecidos, incluindo o cérebro, e sua adição à dieta determina também um aumento dos níveis de AMPc no soro.

GARBERS e cols. (1971, in SCHOFF & LARDY, 1987) determinaram que o AMPc está envolvido na estimulação da motilidade dos espermatozóides bovino e seu metabolismo. Inibidores da fosfodiesterase, entre os quais a cafeína, estimularam a motilidade dos espermatozóides. HOSKINS e cols. (1974, também citado em SCHOFF & LARDY, 1987) observaram que a elevação do AMPc intracelular também está associada com o desenvolvimento da capacidade de motilidade de espermatozóides imaturos.

A cafeína exerce, portanto, sobre os sistemas biológicos, uma variedade de ações cujos mecanismos ainda permanecem, em muitos casos, não elucidados, recomendando-se a continuidade do estudo de seus efeitos. No presente trabalho foi analisado o efeito da cafeína sobre alguns aspectos biológicos de *Drosophila prosaltans*.

Uma importante vantagem da *Drosophila* para este tipo de estudo é sua capacidade de converter xenobióticos de forma similar à dos mamíferos. (O metabolismo de xenobióticos nos mamíferos é mais ativo no fígado. Os sistemas de enzimas envolvidos nessa ação foram estudados extensivamente nas décadas passadas. Para insetos, especialmente *Drosophila*, a maioria dos dados foram obtidos mais recentemente. Os microsomos obtidos de insetos ou de alguns de seus órgãos particulares possuem atividade metabólica similar à das preparações microsossomais do fígado humano. A maior parte da atividade enzimática em insetos está localizada no trato gastrointestinal, nos túbulos de Malpighi e no corpo gorduroso. Vários traba-

lhós mostraram que o segundo cromossomo de *Drosophila* transporta genes importantes no controle do metabolismo dos xenobióticos) (pequena revisão em FOERSTER & WUGLER, 1984).

1. Espécie e Linhagem Utilizada

Foi utilizada no presente trabalho, a espécie *Drosophila przewalskii*, pertencente ao subgrupo *Saltans* do grupo de *melanogaster*. Essa espécie foi preliminarmente analisada quanto ao isolamento reprodutivo e ao polimorfismo cromossômico (RICUDO, 1973a,b e 1979). A linhagem utilizada é proveniente de Sangre Grande, Trinidad, e vem sendo mantida no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, UNESP, há aproximadamente 25 anos. Essa linhagem apresenta heterozigotismo, tendo sido utilizada como padrão nos estudos de polimorfismo cromossômico (RICUDO, 1973a; RICUDO e cols., 1978).

2. Manutenção no Laboratório e Meios de Cultura Utilizados nos Experimentos

As moscas utilizadas neste trabalho foram mantidas em câmara de temperatura constante a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e em meio de cultura de 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
- 15 ml de água
- 20 ml de melado preparado com 1 kg de açúcar fervido em 250 ml de água até dar o ponto
- 17 mg/ml de tetraciclina de suspensão de água

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Espécie e Linhagem Utilizada

Foi utilizada no presente trabalho, a espécie *Drosophila prosaltans*, pertencente ao subgrupo Saltans do grupo do mesmo nome. Essa espécie foi preliminarmente analisada quanto ao isolamento reprodutivo e ao polimorfismo cromossômico (BICUDO, 1973a,b e 1979). A linhagem utilizada é procedente de Sangre Grande, Trinidad, e vem sendo mantida no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, UNESP, há aproximadamente 25 anos. Essa linhagem não apresenta inversões heterozigotas, tendo sido utilizada como padrão nos estudos de polimorfismo cromossômico (BICUDO, 1973a; BICUDO e cols., 1978).

2. Manutenção em Laboratório e Meios de Cultura Utilizados nos Experimentos

As moscas utilizadas neste trabalho foram mantidas em câmara de temperatura constante a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e em meio de cultura de 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 ml de melado preparado com 1 kg de açúcar fervido em 250 ml de água até dar o ponto
- 8 ml de solução alcoólica de nipagin 7%

Para os experimentos, a esse meio controle (C) foram adicionadas quatro diferentes concentrações de cafeína, resultando em quatro tipos de meios diferentes, além do controle, descritos a seguir:

- meio **t0**: 50 μg de cafeína por ml de meio
- meio **t1**: 100 μg de cafeína por ml de meio
- meio **t2**: 1000 μg de cafeína por ml de meio
- meio **t3**: 1500 μg de cafeína por ml de meio

A escolha das doses de cafeína foi feita com base em um experimento piloto, seguindo a técnica descrita em BOURNIAS-VARDIABASIS & TEPLITZ (1982). Assim, nesse experimento piloto, as diferentes concentrações de cafeína foram utilizadas no meio de cultura para alimentar indivíduos adultos de *Drosophila*, visando a determinar a concentração em que metade das moscas morriam (DL50). Para esse fim, foram utilizadas as espécies *Drosophila mulleri* e *Drosophila prosaltans*, tendo-se verificado que a cafeína a 2000 $\mu\text{g/ml}$ é letal para 50% das moscas em 2 dias, e para 100% em 4 dias. Foram também preparados 24 cruzamentos com 5 casais, em tubos contendo meio de cultura com essa dose de cafeína. Dez produziram descendentes adultos cujo número correspondeu a aproximadamente 40% do número produzido nos cruzamentos controle. Dos 14 cruzamentos que não produziram descendentes adultos, 11 produziram larvas, indicando que nessa dosagem a mortalidade larval também é elevada. Assim, inicialmente optou-se por utilizar diluições correspondentes a 50% (1000 $\mu\text{g/ml}$) e a 5% (100 $\mu\text{g/ml}$). Posteriormente, decidiu-se também incluir, nos experimentos, as concentrações correspondentes a 75% (1500 $\mu\text{g/ml}$) e a 2,5% (50 $\mu\text{g/ml}$).

Essas quatro concentrações de cafeína foram adi



cionadas ao meio de cultura de banana-agar, resultando nos quatro tipos de meios descritos anteriormente.

Devido ao fato da cafeína possuir uma baixa solubilidade em água destilada fria (são necessários 46 ml de água destilada fria para dissolver 1 grama), no presente trabalho a cafeína foi dissolvida em água destilada a $\pm 30^{\circ}\text{C}$, na proporção de 1g/5,5 ml de água destilada (dados obtidos do Index Merck). A cafeína solubilizada era adicionada ao meio de cultura quente e, posteriormente, este era distribuído nos frascos utilizados. Foram utilizados 40 ml de meio de cultura nos frascos de $\frac{1}{4}$ de litro e 5 ml nos tubos.

3. Experimentos

3.1. Efeito da cafeína sobre a produtividade

Esse estudo foi feito em dois grupos de experimentos. No primeiro, foram utilizados os meios de cultura **C**, **t1** e **t2**. No segundo, os meios de cultura **C**, **t0** e **t3**. Nos dois grupos, o procedimento foi o mesmo. Foram coletadas moscas virgens dos estoques e, após 7 dias, colocados 10 casais em cada uma de 30 garrafas (10 garrafas com cada tipo de meio), em cada experimento. No total, foram utilizados, portanto, 600 casais.

Foram coletadas moscas virgens nascidas nessas garrafas e, após 6 dias, montados cruzamentos por casal, em tubos, sendo 20 para cada um dos tipos de experimentos descritos a seguir:

Grupo 1

A - com moscas produzidas no meio controle:



1. **C** → **C** (transferidas para meio controle)
2. **C** → **t1** (transferidas para meio **t1**)
3. **C** → **t2** (transferidas para meio **t2**)

B - com moscas produzidas em meio **t1**:

4. **t1** → **C** (transferidas para meio controle)
5. **t1** → **t1** (transferidas para meio **t1**)
6. **t1** → **t2** (transferidas para meio **t2**)

C - com moscas produzidas no meio **t2**:

7. **t2** → **C** (transferidas para meio controle)
8. **t2** → **t1** (transferidas para meio **t1**)
9. **t2** → **t2** (transferidas para meio **t2**)

Grupo 2

A - com moscas produzidas no meio controle:

1. **C** → **C** (transferidas para meio controle)
2. **C** → **t0** (transferidas para meio **t0**)
3. **C** → **t3** (transferidas para meio **t3**)

B - com moscas produzidas no meio **t3**:

4. **t3** → **t0** (transferidas para meio **t0**)



C - com moscas produzidas no meio **t₀**:

5. **t₀** → **t₃** (transferidas para meio **t₃**)

No total, foram realizados 230 cruzamentos nos 14 experimentos. Esses cruzamentos foram transferidos 3 vezes para os mesmos tipos de meios, em intervalos de três dias. Os pais foram descartados na última transferência ou repique. Os descendentes foram contados separadamente por sexo, diariamente, até que todas tenham nascido.

3.2. Efeito da cafeína sobre o tempo de desenvolvimento

Para observação do tempo de desenvolvimento, foram coletadas moscas virgens e, após 6 dias, colocadas em grupos de 100 casais em 5 garrafas, sendo que uma continha o meio de cultura controle (**C**) e as quatro restantes, os meios de cultura **t₀**, **t₁**, **t₂** e **t₃**. Após 36 horas, estas moscas foram transferidas para caixas de população contendo o mesmo tipo de meio de cultura da garrafa de que provieram.

As caixas de população utilizadas são de acrílico incolor medindo 16 cm de lado e de altura e possuem 4 pés de 3 cm. Apresentam duas aberturas na base, de 6,3 cm de diâmetro, e outra abertura em uma das paredes laterais, de 5,5 cm de diâmetro. Às aberturas da base adaptam-se placas de Petri plásticas contendo o meio 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 vedada com durex e pode ser removida para limpeza.



As placas de Petri com meio de cultura foram trocadas nos dois dias seguintes à introdução das moscas, às 10 e às 16 horas. As placas de Petri retiradas foram mantidas na câmara de temperatura constante à $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Quando as larvas começaram a nascer, as placas foram lavadas, para eliminar as larvas existentes, com solução fisiológica de Shen (NICOLETTI, 1959), cuja fórmula é a que segue:

- NaCl 9,99 g
- KCl 0,42 g
- H₂O.100 ml

Decorrida 1 hora, as novas larvas recém eclodidas foram coletadas e colocadas em número de 10 em cada tubo contendo o mesmo meio das caixas de população e das garrafas de onde provieram seus pais. No total, foram coletadas e acompanhadas no seu desenvolvimento, 100 larvas de cada tipo de meio de cultura. As larvas foram observadas, diariamente, até a completa emergência dos adultos. Os machos e as fêmeas foram contados diariamente.

3.3. Efeito da cafeína sobre a longevidade

Para analisar o efeito da cafeína sobre a longevidade foram coletadas moscas virgens dos estoques e, após 6 dias, colocados 10 casais em cada uma de 50 garrafas, as quais, em grupos de 10, continham os meios de cultura controle, **t0**, **t1**, **t2** e **t3**. Portanto, no total, foram utilizados 500 casais, sendo 100 em cada meio.

Moscas virgens, nascidas dessas garrafas foram



coletadas e, após 6 dias, utilizadas para montar os experimentos, em grupos de 10 casais por garrafa, da mesma maneira que foi realizado o experimento de efeito da cafeína sobre a produtividade, isto é, no total foram preparadas 130 garrafas, sendo 10 de cada um dos tipos: C → C, C → to, C → t1, C → t2, C → t3, t1 → C, t1 → t1, t1 → t2, t2 → C, t2 → t1, t2 → t2, t3 → to, to → t3.

Moscas recém-nascidas dessas garrafas foram coletadas e colocadas 16 fêmeas ou 16 machos, isolados, ou 8 casais por tubo, contendo os mesmos tipos de meios de cultura onde nasceram. Em cada tipo de experimento, foram preparados 7 tubos com fêmeas, 7 com machos e 6 com casais, totalizando 320 moscas (112 fêmeas, 112 machos e 48 casais) por tipo de experimento, em 20 tubos. Nos treze experimentos foram utilizadas 4160 moscas em 260 tubos. As moscas foram transferidas semanalmente para meio de cultura novo, de mesmo tipo, computando-se então o número de sobreviventes até que todas tenham morrido.

3.4. Efeito da cafeína sobre a oviposição

Para verificar um possível efeito da cafeína sobre a oviposição, foram coletadas moscas virgens do estoque e, após 7 dias, colocadas em grupos de 10 casais em cada uma de 50 garrafas, sendo que, em grupos de 10, essas garrafas continham os meios de cultura controle, to, t1, t2 e t3.

Em um primeiro experimento foram coletadas moscas virgens nascidas nos 5 tipos de meios e após 6 dias, preparados 100 casais e colocados em garrafas contendo os mesmos tipos de meios onde nasceram. Após 48 horas, estas moscas foram transferidas para caixas de população contendo placas de



Petri com os mesmos meios de cultura de onde provieram. As placas de Petri foram retiradas após 12 horas e os ovos foram contados. Para facilitar a contagem, as placas foram divididas, com traço de corante, em áreas menores, e observadas ao microscópio estereoscópico.

Em um outro experimento observou-se também a oviposição das moscas controle, colocadas em caixas de população contendo os diferentes meios, isto é, **t₀**, **t₁**, **t₂** e **t₃**. Os detalhes de realização do experimento foram iguais aos do primeiro experimento.

3.5. Teste de preferência de meio com ou sem cafeína para oviposição

Foram coletadas moscas virgens do estoque e, após 6 dias, colocados 500 casais em 5 garrafas, sendo 100 por garrafa. Após 48 horas as moscas foram transferidas para 5 caixas de população contendo duas placas de Petri com meio controle ou uma placa de Petri com meio controle e a outra com meio **t₀** ou **t₁** ou **t₂** ou **t₃**. Após 12 horas as placas de Petri foram retiradas e os ovos contados.

Em todos esses experimentos tomou-se o cuidado de manter as caixas de população no centro da câmara de temperatura constante para evitar que as placas de Petri, acopladas às caixas de população contendo os meios, recebessem iluminação diferente.

3.6. Efeito da cafeína sobre o peso das moscas

Dez casais de moscas virgens, obtidas dos esto-



ques, foram colocadas em garrafas contendo os 5 tipos de meios; controle, t_0 , t_1 , t_2 e t_3 . De cada tipo foram feitas 9 réplicas.

Quando os descendentes desses casais começaram a nascer, foram coletados, diariamente, às mesmas horas, contados e pesados separadamente por sexo. A pesagem era feita do conjunto de moscas de mesmo sexo nascidas no dia, calculando-se o peso médio das moscas, dividindo-se seu peso total pelo número delas. Foram pesadas 621 moscas de cada sexo, de cada meio de cultura.

4. Preparações Citológicas

As glândulas salivares e os gânglios cerebrais para o preparo de lâminas, foram obtidos de larvas do terceiro estágio tardio, produzidas nos 5 tipos de meios: controle, t_0 , t_1 , t_2 e t_3 .

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, 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.



As larvas do terceiro estágio tardio foram dissecadas 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 ₂ O		1000 ml

As glândulas e 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 a 50%) aí permanecendo por 2 minutos. Posteriormente, a lâmina era coberta com a lamínula e submetida a esmagamento conforme ATHERTON & GALL (1972). Esse esmagamento era feito batendo-se delicadamente, com a ponta de um lápis borracha sobre a lamínula, da lâmina preparada e envolta em papel higiênico e acompanhando-se, ao microscópio, o grau de distensão dos cromossomos. A lutagem era realizada com esmalte incolor.

As lâminas foram guardadas no Freezer e analisadas em microscópio Zeiss Standard Júnior (883), com sistema fotográfico MC-63 automático acoplado (doação CNPq - Processo nº 40049/80) e em fotomicroscópio II Zeiss (doação FAPESP - Processo Biológicas nº 70/562).



5. Estudo das Esterases por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

5.1. Preparo dos Géis

O princípio do gel de poliacrilamida consiste na formação de uma "malha" entre o monômero acrilamida e seu comonômero de ligação cruzada, a N, N' metilenobisacrilamida (BIS), numa reação de polimerização com auxílio de catalisadores. Em geral são usados, como catalisadores, o persulfato de amônio e o TEMED (N, N, N', N' tetrametilenodiamina). A relação acrilamida/bisacrilamida determina as qualidades mecânicas do gel e o tamanho dos poros da "malha". O preparo do gel pode ser realizado em tubos (gel em cilindro), ou entre duas placas de vidro (gel em placa). Neste trabalho foram preparados géis em placa (STUDIER, 1973). As soluções e tampões empregados foram adaptados por CERON (1988), a partir dos utilizados por DAVIS (1964) & LAEMMLI (1970) e são descritos a seguir:

a) solução estoque de acrilamida/bisacrilamida: 30 g de acrilamida e 0,8 g de bisacrilamida dissolvida em água, num volume final de 100 ml. Essa solução deve ser mantida em geladeira, em frasco escuro. A acrilamida deve ser manuseada com cuidado por se tratar de uma neurotoxina.

b) tampão do gel (7,5 concentrado): Tris 1,5 M ajustado a pH 8,8 com HCl 6M. Deve ser mantido na geladeira, em frasco escuro.



c) solução de persulfato de amônio a 2%, preparada na hora de usar. O persulfato de amônio em pó deve ser armazenado em dessecador para evitar a hidratação. O uso do persulfato de amônio hidratado ocasiona a formação de géis irregulares ou impede a sua polimerização. Soluções de persulfato de amônio de concentrações mais elevadas podem causar a perda de atividade das proteínas.

d) TEMED com aproximadamente 99% de pureza: este deve ser o último componente adicionado à solução, dando início a polimerização.

e) Tampão de amostra: Tris-HCl 0,1 M, pH 8,8 contendo glicerol a 10%. Deve ser guardado no congelador.

Géis com um milímetro de espessura, foram polimerizados entre duas placas de vidro de 17x17x0,5 cm. As placas eram presas por garras com um espaço entre elas formado pela introdução de espaçadores de acrílico com um milímetro de espessura, colocados nos lados e no bordo inferior. Para vedação, passava-se uma camada de vaselina entre os espaçadores e as placas que eram, em seguida, lacradas por fora com uma solução de agarose a 1%, previamente fundida. Uma das placas apresentava um recorte de 2 centímetros de profundidade, no qual era adaptado um pente de acrílico, com 14 dentes, para a formação dos poços de aplicação das amostras. O espaço entre as placas era então preenchido com a solução de polimerização, mantendo-se as mesmas em posição vertical por 30 minutos, no escuro, para a formação dos géis. O pente e o espaçador inferior eram então retirados e as placas eram adaptadas, na posição vertical, numa cuba de acrílico, com auxílio de duas garras.



5.2. Preparo das amostras

As amostras eram maceradas a 0°C, em 30 a 50 µl do tampão de amostra (tris - HCl 0,1 M pH 8,8 contendo glicérol a 10%), com o auxílio de um bastão de vidro e, em seguida, centrifugadas a 3000 rpm, por 3 minutos. Volumes de 10 a 20 µl dos sobrenadantes eram, então, utilizados nas eletroforeses. As amostras foram submetidas à eletroforese por 3 horas e meia, a uma voltagem constante de 200 V, utilizando-se, para o enchimento dos compartimentos superior e inferior da cuba, um tampão tris-glicina, pH 8,3, conforme DAVIS (1964), com a diferença de que, neste trabalho, a concentração do tampão foi reduzido à metade (Tris 0,0125 M, glicina 0,096).

5.3. Identificação das esterases

A identificação das bandas com atividades esterásicas, nos géis, foi também baseada nos métodos de coloração descritos por CERON (1988), modificadas de JOHNSON e cols. (1966) e STEINER & JOHNSON (1973). Antes da coloração, os géis foram pré-incubados em placas de Petri por 30 minutos, à temperatura ambiente, em 50 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,2. Após esse período, o tampão era retirado e os géis submetidos à coloração por 45 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com solução de coloração preparada de acordo com o seguinte procedimento: para cada gel, 10 mg de β-naftil acetato (2-naftil acetado) e 20 mg de α-naftil acetato (1-naftil acetato) eram dissolvidos em 1 ml de acetona ou metanol e combinados com uma solução recém preparada e filtrada, contendo 60 mg de sal de diazônio, Fast Blue RR e 5 ml de n-propanol ,



em 50 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,2. A solução resultante era então adicionada à placa de Petri contendo o gel.

Após a coloração, as esterases eram visualizadas nos géis, como bandas de coloração preta ou vermelha. Os géis eram então, tratados com 100 ml de uma solução de descoloração contendo álcool etílico comercial/ácido acético/água, na proporção de 5:1:5, por 24 ou 48 horas.

A secagem dos géis foi feita conforme CERON & SANTOS (1988). Inicialmente os géis eram mantidos numa solução conservante de ácido acético a 7,5% e glicerol a 10%, por 2 horas. Em seguida, os géis eram banhados numa solução de gelatina a 5%, feita a partir de produto comercial (OTKER ou Anglo), prensados entre duas folhas de papel celofane poroso, nos bastidores fixados por garras, e deixados à temperatura ambiente por 3 a 4 dias para a secagem. Nesse procedimento os géis desidratam, transformando-se em uma fina película entre as folhas de celofane que podem ser recortadas e guardadas para análise posterior. Dois aspectos merecem ser destacados neste procedimento: o uso da solução de gelatina, que impede rachaduras nos géis, e a qualidade do papel celofane que deve ser bem poroso.



III - RESULTADOS

1. Efeito da Cafeína sobre a Produtividade de

Drosophila prosaltans

Os vinte tubos de cada tipo de experimento produziram descendentes que foram contados diariamente e separadamente por sexo. Como consta de Materiais e Métodos, os casais foram transferidos 3 vezes para meio novo com as mesmas características do meio do tubo original, isto é, onde o casal foi colocado inicialmente. A produtividade dos 20 tubos de cada experimento foi computada separadamente na sequência dos repiques. Os resultados, somados por tipo de experimento e por sexo, estão contidos nas tabelas 1 e 7, referentes aos dois conjuntos de experimentos realizados com diferentes meios de cultura.

A tabela 1 contém dados dos experimentos com os meios controle, **t1** e **t2**. Pode-se observar que computando-se o total de todos os experimentos, a produtividade foi menor nos 1ºs tubos (onde as moscas permaneceram de 1 a 3 dias após o cruzamento - moscas com 6 a 8 dias de idade), maior nos 3ºs tubos (onde as moscas permaneceram do 7º ao 9º dia após o cruzamento - moscas com 12 a 14 dias de idade), havendo uma redução nos 4ºs tubos (onde as moscas permaneceram do 10º ao 12º dia após o cruzamento - moscas com 15 a 17 dias de idade). Porém, analisando a produtividade na sequência dos repiques, separadamente, por experimento, pode-se verificar três exceções: os experimentos **t1** → **t2** e **t2** → **t2**, cuja produtividade foi praticamente igual nos terceiros e



quartos tubos e o experimento $t2 \rightarrow C$, cuja produtividade foi maior nos quartos tubos. Um outro aspecto que pode ser destacado é a pequena produtividade, nos primeiros tubos, dos experimentos $t1 \rightarrow C$, $t1 \rightarrow t1$ e $t1 \rightarrow t2$.

Observando-se os totais de cada experimento, nota-se que a produtividade do controle é maior do que a dos demais experimentos, cujo meio de cultura continha cafeína.

Uma análise mais detalhada dos subtotais para fêmeas e machos dos nove experimentos consta da tabela 2 e mostra, com base no teste de Student, que em nenhum dos casos há diferença significativa na produtividade dos dois sexos.

A análise estatística para comparação dos subtotais entre as fêmeas, os machos e os totais, isto é, soma de ambos, em cada experimento, consta respectivamente das tabelas 3, 4 e 5. Nas três comparações os valores de t foram significativos para as diferenças entre o controle e os demais experimentos. A comparação da produtividade de fêmeas entre os meios tratados não foi significativa em nenhum dos casos. Já, entre os machos dos meios tratados, houve diferença significativa nas comparações $t1 \rightarrow t2$ versus: $C \rightarrow t1$, $t1 \rightarrow t1$, $t2 \rightarrow C$, $t2 \rightarrow t1$ e $t2 \rightarrow t2$. Na comparação dos totais produzidos nos meios com cafeína apenas uma diferença foi significativa: entre $C \rightarrow t1$ e $t1 \rightarrow t2$.

A tabela 6 mostra as porcentagens da produtividade total para cada experimento, calculadas na sequência dos tubos. Observa-se, nos primeiros tubos, que todos os experimentos com cafeína, exceto $t2 \rightarrow C$ apresenta porcentagem menor que o controle. Nos segundos tubos as porcentagens tornam-se mais próximas (de 24 a 31%), sendo que, em alguns dos experimentos tratados, as porcentagens superam a do controle.



TABELA 1. Produtividade de fêmeas e machos F_1 , nos nove experimentos envolvendo os meios de cultura C, t1 e t2, em cada conjunto de vinte tubos, na sequência dos repiques. A direção da seta nos experimentos indica o meio onde a mosca nasceu e o meio para o qual foi transferida. Meios: C = controle; t0 = 50 µg de cafeína/ml; t1 = 100 µg/ml; t2 = 1000 µg/ml e t3 = 1500 µg/ml. F = fêmeas; M = machos; T = total.

Experimentos	1º tubo			2º tubo			3º tubo			4º tubo			Sub total		
	F	M	T	F	M	T	F	M	T	F	M	T	F	M	T
C → C	219	237	456	333	338	671	370	352	722	282	305	587	1204	1232	2436
C → t1	86	89	175	211	214	425	322	306	628	258	232	490	877	841	1718
C → t2	120	100	220	201	196	397	258	248	506	225	199	424	804	743	1547
t1 → C	31	31	62	220	188	408	278	283	561	173	183	356	702	685	1387
t1 → t1	22	34	56	244	249	493	322	277	599	196	212	408	784	772	1556
t1 → t2	53	34	87	182	171	353	221	199	420	233	199	432	689	603	1292
t2 → C	161	158	319	216	223	439	206	198	404	232	248	480	815	827	1642
t2 → t1	74	69	143	240	280	520	252	285	537	233	228	461	799	862	1661
t2 → t2	114	148	262	197	224	421	203	242	445	219	227	446	733	841	1574
TOTAL	880	900	1780	2044	2083	4127	2432	2390	4822	2051	2033	4084	7407	7406	14813

TABELA 2. Produtividade total nos vinte cruzamentos, média e desvio padrão, separadamente para fêmeas e machos, e valor de *t* para comparação das médias dos dois sexos. F = fêmeas; M = machos.

Experimentos	Produtividade total		Produtividade média e desvio padrão (20 tubos)		<i>t</i> (40)
	F	M	F	M	
C → C	1204	1232	60,2 ± 13,7	61,6 ± 11,9	0,35
C → t1	877	841	43,8 ± 18,7	42,0 ± 16,3	0,32
C → t2	804	743	40,2 ± 16,5	37,2 ± 16,4	0,59
t1 → C	702	685	35,1 ± 16,2	34,2 ± 15,7	0,17
t1 → t1	784	772	39,2 ± 10,1	38,6 ± 11,8	0,17
t1 → t2	689	603	34,5 ± 14,8	30,1 ± 12,8	0,98
t2 → C	815	827	40,8 ± 17,7	41,3 ± 16,3	0,11
t2 → t1	799	862	40,0 ± 14,0	43,1 ± 18,3	0,61
t2 → t2	733	841	36,7 ± 13,1	42,0 ± 13,9	1,27

TABELA 3. Valores de **t** e significância ao nível de 0,01 (**), para comparação da produtividade total de fêmeas nos nove experimentos.

Experimentos	C → t1	C → t2	t1 → C	t1 → t1	t1 → t2	t2 → C	t2 → t1	t2 → t2
C → C	3,16**	4,17**	5,29**	5,52**	5,73**	3,89**	4,63**	5,57**
C → t1		0,65	1,58	0,98	1,76	0,54	0,75	1,41
C → t2			0,98	0,23	1,16	0,10	0,05	0,75
t1 → C				0,96	0,13	1,05	1,01	0,33
t1 → t1					1,19	0,34	0,19	0,69
t1 → t2						1,22	1,21	0,50
t2 → C							0,16	0,83
t2 → t1								0,77

TABELA 4. Valores de **t** e significância ao nível de 0,05 (*) e ao nível de 0,01 (**), para comparação da produtividade total de machos nos nove experimentos.

Experimentos	C → t1	C → t2	t1 → C	t1 → t1	t1 → t2	t2 → C	t2 → t1	t2 → t2
C → C	4,33**	5,38**	6,19**	6,12**	8,03**	4,48**	3,79**	4,77**
C → t1		0,95	1,54	0,77	2,57*	0,14	0,19	0,00
C → t2			0,57	0,32	1,50	0,81	1,08	1,02
t1 → C				0,99	0,90	1,40	1,64	1,66
t1 → t1					2,17*	0,61	0,92	0,84
t1 → t2						2,41*	2,59*	2,81**
t2 → C							0,32	0,15
t2 → t1								0,20

TABELA 5. Valores de t e significância ao nível de 0,05 (*) e ao nível de 0,01 (**), para comparação da produtividade total dos nove experimentos.

Experimentos	C $\rightarrow$ t1	C $\rightarrow$ t2	t1 $\rightarrow$ C	t1 $\rightarrow$ t1	t1 $\rightarrow$ t2	t2 $\rightarrow$ C	t2 $\rightarrow$ t1	t2 $\rightarrow$ t2
C $\rightarrow$ C	3,98**	5,05**	6,08**	6,60**	7,38**	4,48**	4,44**	5,86**
C $\rightarrow$ t1		0,82	1,61	0,93	2,23*	0,36	0,28	0,78
C $\rightarrow$ t2			0,79	0,05	1,37	0,46	0,56	0,15
t1 $\rightarrow$ C				1,02	0,52	1,26	1,37	1,06
t1 $\rightarrow$ t1					1,79	0,50	0,63	0,13
t1 $\rightarrow$ t2						1,86	1,99	1,77
t2 $\rightarrow$ C							0,09	0,38
t2 $\rightarrow$ t1								0,49



Nos terceiros e quartos tubos a produtividade dos experimentos tratados é, na quase totalidade dos casos, superior à do controle.

A tabela 7 contém os dados dos experimentos realizados com os meios controle, t_0 e t_3 . Observa-se que a menor produtividade também ocorreu nos primeiros tubos, mas o seu máximo ocorreu nos quartos tubos, isto é, 10 a 12 dias após o cruzamento. Talvez isso se deva ao fato deste experimento ter sido montado em uma época do ano mais fria (junho) enquanto o outro foi montado em uma época mais quente (outubro). Embora os experimentos tenham sido todos mantidos a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, a manipulação, repiques, contagem, etc., era feita no meio ambiente e, portanto, devem ter recebido influência da temperatura externa. Houve apenas uma exceção em que a maior produtividade ocorreu nos terceiros tubos ($t_0 \rightarrow t_3$). Outro aspecto que pode ser destacado é a pequena produtividade de nos primeiros tubos dos experimentos $C \rightarrow t_3$ e $t_3 \rightarrow t_0$.

Observando-se os totais de cada experimento, nota-se que a produtividade do controle é maior do que a dos demais experimentos, nos quais a cafeína estava presente.

Uma análise mais detalhada dos subtotais para fêmeas e machos dos cinco experimentos consta da tabela 8 e mostra, com base no teste t , que em nenhum dos casos houve diferença significativa na produtividade dos dois sexos.

A análise estatística para comparação dos subtotais entre as fêmeas, os machos e os totais, isto é, a soma de ambos, em cada experimento, consta, respectivamente das tabelas 9, 10 e 11.

Nas três comparações os valores de t foram significativos para as diferenças entre o controle e os demais



TABELA 6. Porcentagem da produtividade total, por experimento, na seqüência de tubos.

Experimentos	Produtividade total	Porcentagens			
		1º tubo	2º tubo	3º tubo	4º tubo
C → C	2436	18,72	27,55	29,64	24,09
C → t1	1718	10,19	24,74	36,55	28,52
C → t2	1547	14,22	25,66	32,71	27,41
t1 → C	1387	4,47	29,41	40,45	25,67
t1 → t1	1556	3,60	31,68	38,50	26,22
t1 → t2	1292	6,73	27,32	32,51	33,44
t2 → C	1642	19,42	26,73	24,60	29,25
t2 → t1	1661	8,60	31,31	32,32	27,77
t2 → t2	1574	16,64	26,75	28,28	28,33

TABELA 7. Produtividade de fêmeas e machos F_1 , nos cinco experimentos envolvendo os meios de cultura **C**, **to** e **t3**, em cada conjunto de vinte tubos, na sequência dos repiques.

Experimentos	1º tubo			2º tubo			3º tubo			4º tubo			Sub total		
	F	M	T	F	M	T	F	M	T	F	M	T	F	M	T
C → C	60	77	137	261	238	499	317	324	641	374	393	767	1012	1032	2044
C → to	67	78	145	234	234	468	272	263	535	324	324	648	897	899	1796
C → t3	47	49	96	189	164	353	215	222	437	250	206	456	701	641	1342
t3 → to	38	39	77	161	178	339	265	267	532	348	338	686	812	822	1634
to → t3	107	100	207	187	153	340	208	158	366	168	122	284	664	533	1197
TOTAL	319	343	662	1032	967	1999	1277	1234	2511	1458	1383	2841	4086	3927	8013

TABELA 8. Produtividade total nos vinte cruzamentos, média e desvio padrão, separadamente para fêmeas e machos, e valor de *t* para comparação das médias dos dois sexos. F = fêmeas; M = machos.

Experimentos	Produtividade total		Produtividade média e desvio padrão (20 tubos)		<i>t</i> (40)
	F	M	F	M	
C → C	1012	1032	50,6 ± 9,13	51,6 ± 9,02	0,35
C → to	897	899	44,8 ± 15,2	45,0 ± 17,1	0,02
C → t3	701	641	35,0 ± 12,2	32,0 ± 14,4	0,71
t3 → to	812	822	40,6 ± 12,8	41,1 ± 14,1	0,12
to → t3	644	533	33,2 ± 11,7	26,6 ± 10,0	1,90

experimentos, exceto em $C \rightarrow t_0$. A comparação da produtividade de fêmeas entre os meios tratados foi significativa em $C \rightarrow t_0$ versus $C \rightarrow t_3$ e $C \rightarrow t_0$ versus $t_0 \rightarrow t_3$. Entre os machos dos meios tratados houve diferença significativa nas comparações $C \rightarrow t_0$ versus $C \rightarrow t_3$ e versus $t_0 \rightarrow t_3$ e $t_3 \rightarrow t_0$ versus $t_0 \rightarrow t_3$. Os resultados das comparações dos totais produzidos nos meios com cafeína foram os mesmos obtidos para os machos, isto é, houve diferença significativa nas mesmas comparações.

A tabela 12 mostra as porcentagens da produtividade total para cada experimento, na sequência dos tubos. Observa-se, nos primeiros tubos, que todos os experimentos com cafeína, exceto $t_3 \rightarrow t_0$ apresentaram porcentagem maior que o controle. Nos segundos tubos as porcentagens tornaram-se mais próximas, sendo que, em três dos experimentos tratados, as porcentagens superam a do controle. Nos terceiros e quartos tubos a produtividade dos experimentos tratados é, na quase totalidade dos casos, inferior à do controle.

2. Efeito da Cafeína sobre o Tempo de Desenvolvimento

Após a coleta e transferência, descritas em Materiais e Métodos, as larvas foram observadas diariamente, nos tubos e em placas de Petri, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, a fim de acompanhar seu desenvolvimento. Não foi verificada nenhuma dife-



TABELA 9. Valores de t e significância ao nível de 0,05 (*) e ao nível de 0,01 (**), para comparação da produtividade total das fêmeas, nos cinco experimentos.

Experimentos	C $\rightarrow$ to	C $\rightarrow$ t3	t3 $\rightarrow$ to	to $\rightarrow$ t3
C $\rightarrow$ C	1,45	4,56**	2,84**	5,25**
C $\rightarrow$ to		2,24*	0,95	2,71**
C $\rightarrow$ t3			1,40	0,49
t3 $\rightarrow$ to				1,91

TABELA 10. Valores de t e significância ao nível de 0,05(*) e ao nível de 0,01(**), para comparação da produtividade total dos machos, nos cinco experimentos.

Experimentos	C $\rightarrow$ to	C $\rightarrow$ t3	t3 $\rightarrow$ to	to $\rightarrow$ t3
C $\rightarrow$ C	1,54	5,14**	2,81**	8,27**
C $\rightarrow$ to		2,57*	0,78	4,12**
C $\rightarrow$ t3			2,01	1,37
t3 $\rightarrow$ to				3,74**

TABELA 11. Valores de **t** e significância ao nível de 0,05(*) e ao nível de 0,01(**), para comparação da produtividade total nos cinco experimentos.

Experimentos	C → t₀	C → t₃	t₃ → t₀	t₀ → t₃
C → C	1,56	5,18**	3,03**	7,74**
C → t₀		2,48*	0,89	3,64**
C → t₃			1,79	1,02
t₃ → t₀				3,07**

TABELA 12. Porcentagem da produtividade total por experimento, na seqüência de tubos.

Experimentos	Produtividade total	Porcentagens			
		1º tubo	2º tubo	3º tubo	4º tubo
C → C	2044	6,70	24,41	31,37	37,52
C → to	1796	8,07	26,06	29,79	36,08
C → t3	1342	7,16	26,30	32,56	33,98
t3 → to	1634	4,71	20,75	32,56	41,98
to → t3	1197	17,29	28,40	30,58	23,73



rença no desenvolvimento das larvas dos tubos **C**, **to** e **t1**. As larvas dos meios **t2** e **t3**, porém, apresentaram um desenvolvimento mais lento em relação aos outros meios, mas semelhantes entre si.

Dois dias após a coleta das larvas, observou-se que as larvas **C**, **to** e **t1** estavam sobre o meio de cultura e seus espiráculos posteriores já se apresentavam meio amarelados, o que não acontecia com as larvas dos meios **t2** e **t3**. Aos 3 dias, as larvas dos 3 primeiros meios estavam todas imersas no meio de cultura, mas não as larvas dos meios **t2** e **t3**, que permaneciam sobre o meio. Aos 4 dias, as larvas dos meios **C**, **to** e **t1** estavam imersas no meio de cultura, com os espiráculos posteriores para fora, enquanto as larvas dos meios **t2** e **t3** estavam começando a entrar no meio de cultura. As larvas dos meios **C**, **to** e **t1** eram aparentemente do mesmo tamanho e bem maiores que as larvas dos meios **t2** e **t3**, que pareciam do mesmo tamanho. Nos três dias posteriores todas as larvas continuaram dentro do meio de cultura, mantendo somente os espiráculos posteriores para fora.

Aos 9 dias, as larvas **C**, **to** e **t1** começaram a subir nas paredes dos tubos e no décimo dia já haviam empupado, enquanto a maioria das larvas **t2** e **t3** ainda continuavam dentro do meio de cultura e apenas algumas larvas começavam a subir nas paredes dos tubos.

No 11º dia as larvas dos tubos **C**, **to** e **t1** já haviam empupado e estavam bem amarelas e as larvas dos tubos **t2** e **t3** começavam a empupar.

Aos 12 dias, as nervuras das asas das pupas **C**, **to** e **t1** começavam a aparecer, enquanto as pupas **t2** e **t3** estavam amarelas.



No 13º dia, o corpo das moscas **C**, **to** e **t1** começavam a se diferenciar em cabeça e abdome e as nervuras das asas estavam bem evidentes, havendo também alguma pigmentação nas asas das moscas em formação.

No 14º dia, as nervuras das asas estavam mais evidentes nas moscas **C**, **to** e **t1**. As asas das moscas **t2** e **t3** estavam começando a se pigmentar.

No 16º dia, os olhos das moscas **C**, **to** e **t1** apresentaram coloração vermelha escura, enquanto que, os das moscas **t2** e **t3** ainda eram de cor vermelha clara.

No 17º dia, as asas das moscas dos meios **C**, **to** e **t1**, já estavam pretas e as moscas dos meios **t2** e **t3**, estavam começando a enegrecer. No 18º dia, as moscas dos meios **C**, **to** e **t1** começaram a emergir das pupas, enquanto as moscas de **t2** e **t3** só o fizeram a partir do 19º dia.

As larvas **C**, **to** e **t1** demoraram 10 dias para empupar, enquanto as larvas **t2** e **t3** demoraram 11 dias. Os imagos **C**, **to** e **t1** demoraram 8 dias para emergir, enquanto os imagos **t2** e **t3** demoraram 9 dias.

Os gráficos da figura 1 mostram a distribuição da emergência dos imagos produzidos nos meios **C**, **to**, **t1**, **t2** e **t3**. De modo geral observa-se que a distribuição das moscas nascidas nos meios **C**, **to** e **t1** é mais semelhante entre si do que a **t2** e **t3**, que por sua vez são mais parecidas. O início da emergência dos imagos ocorreu, nos três primeiros meios, aos 20 dias, e nos dois últimos, aos 21 dias. A moda da distribuição nos três primeiros meios ocorreu aos 21 dias e nos dois últimos, aos 22 dias. A emergência ocorreu até os 24 dias nos três primeiros meios e até os 25 nos dois últimos. Em todos os casos, apenas machos nasceram no último dia. No



controle, apenas fêmeas foram obtidas no primeiro dia, enquanto nos meios tratados foram obtidos fêmeas e machos.

Todos os indivíduos analisados, não apresentaram malformações visíveis.

3. Efeito da Cafeína sobre a Longevidade

O número de indivíduos analisados em cada um dos experimentos foi de 112 fêmeas virgens, 112 machos virgens, 48 fêmeas acasaladas e 48 machos acasalados. No total foram analisadas 4160 moscas.

Podemos observar na tabela 13 que a longevidade média (em dias) das fêmeas e dos machos virgens tratados com cafeína diminui em relação ao controle, entretanto, de forma não proporcional à concentração de cafeína no meio. As fêmeas virgens tratadas apresentam longevidades médias que variam de 27 a 47 dias aproximadamente, enquanto a do controle é de 60. Na maioria dos experimentos a longevidade média está entre 30 e 38 dias. Os machos virgens tratados apresentam longevidades médias que variam de 25 a 44 dias aproximadamente, sendo a do controle igual a 59 dias.

O teste t para comparação das longevidades médias das fêmeas e machos virgens de mesmo tipo de experimento mostrou diferença significativa em $C \rightarrow t_1$, $C \rightarrow t_3$, $t_1 \rightarrow t_2$, $t_2 \rightarrow C$, $t_2 \rightarrow t_1$, $t_2 \rightarrow t_2$ e $t_3 \rightarrow t_0$. Em todos os casos a longevidade média das fêmeas é superior à dos machos, exceto em $t_3 \rightarrow t_0$.

O teste t para comparação das longevidades médias das fêmeas virgens de todos os experimentos, entre si, consta da tabela 14 e mostra que a diferença em relação ao



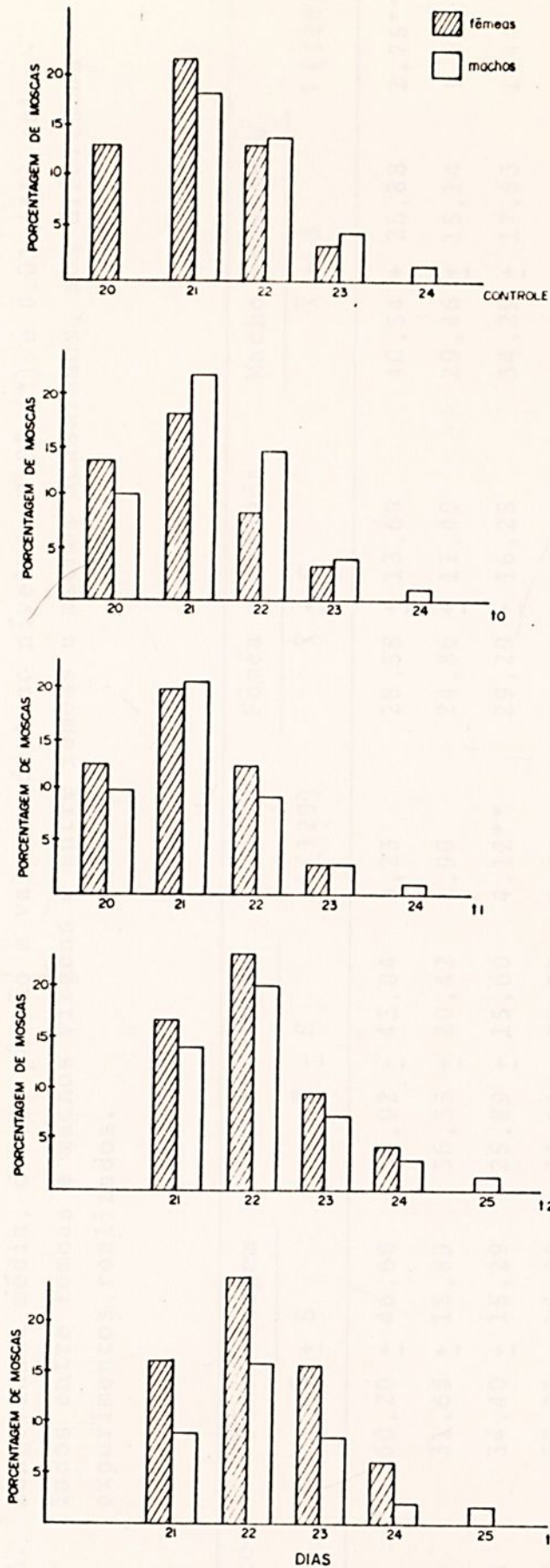


Figura 1. Gráficos de distribuição da emergência dos imagos produzidos nos meios C, to, t1, t2 e t3.

TABELA 13. Longevidade média, desvio padrão e valores de *t* ao nível de 0,05 (*) e 0,01 (**) calculados entre fêmeas e machos virgens e entre fêmeas e machos acasalados, nos diferentes experimentos realizados.

Experimentos	Fêmea virgem	Macho virgem	<i>t</i> (120)	Fêmea acasalada	Macho acasalado	<i>t</i> (120)
	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$		$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	
C → C	60,20 ± 46,60	58,92 ± 43,04	0,23	28,58 ± 13,69	40,54 ± 26,88	2,75**
C → to	31,68 ± 15,89	36,33 ± 20,42	1,90	24,86 ± 11,49	29,46 ± 15,14	1,67
C → t1	34,40 ± 15,29	25,89 ± 15,60	4,12**	29,29 ± 16,25	34,29 ± 17,63	1,44
C → t2	35,23 ± 16,08	33,61 ± 21,33	0,64	31,10 ± 12,51	40,39 ± 14,40	3,38**
C → t3	37,59 ± 14,42	32,84 ± 23,62	2,47*	23,62 ± 9,73	36,48 ± 19,51	4,08**
t1 → C	35,58 ± 18,52	33,41 ± 20,81	0,82	34,46 ± 14,29	34,27 ± 16,32	0,06
t1 → t1	41,53 ± 19,12	40,97 ± 18,34	0,22	36,35 ± 18,09	45,06 ± 22,13	2,11*
t1 → t2	38,08 ± 14,19	31,80 ± 16,84	3,02**	34,39 ± 16,53	37,69 ± 15,48	1,01
t2 → C	41,97 ± 18,59	39,99 ± 22,87	2,11*	41,83 ± 16,63	47,92 ± 21,00	1,57
t2 → t1	47,14 ± 17,45	42,16 ± 18,91	2,27*	38,06 ± 14,47	47,77 ± 20,35	2,69**
t2 → t2	30,08 ± 15,22	25,36 ± 18,88	2,43*	29,15 ± 11,77	42,37 ± 17,89	4,28**
t3 → to	35,37 ± 19,02	44,50 ± 22,02	3,32**	34,94 ± 14,58	41,02 ± 20,01	1,70
to → t3	27,26 ± 10,66	28,26 ± 10,72	0,70	25,92 ± 7,91	30,52 ± 7,65	2,90**

controle é significativa em todos os casos, ao nível de 0,01. Quanto às comparações entre as fêmeas tratadas observou-se que: (1) o experimento $t1 \rightarrow t1$ difere significativamente dos demais exceto na comparação com $C \rightarrow t3$ e $t1 \rightarrow t2$; (2) o experimento $t2 \rightarrow t1$ difere significativamente de todos os demais; (3) o experimento $t2 \rightarrow t2$ difere dos demais, exceto quando comparado com $C \rightarrow t0$ e $t2 \rightarrow C$; (4) o experimento $t0 \rightarrow t3$ difere significativamente dos demais em todos os casos, exceto quando comparado com $t2 \rightarrow t2$. Quanto às demais comparações, na sua maioria não são significativas. No total de 78 comparações, 47 são diferentes, correspondendo a aproximadamente 60%.

Quanto às comparações dos machos virgens, observa-se na tabela 15 que o controle difere significativamente de todos os demais experimentos. São significativas ainda as diferenças: (1) de $t1 \rightarrow t1$ com os demais, exceto $C \rightarrow t0$; (2) de $t2 \rightarrow C$ com os demais, exceto $C \rightarrow t0$ e $t1 \rightarrow t1$; (3) de $t2 \rightarrow t1$ com todos os demais, exceto $t1 \rightarrow t1$ e $t2 \rightarrow C$; (4) de $t2 \rightarrow t2$ com todos os demais experimentos, exceto com $C \rightarrow t1$; (5) de $t3 \rightarrow t0$ com os demais, exceto $t1 \rightarrow t1$, $t2 \rightarrow C$ e $t2 \rightarrow t1$; (6) de $t0 \rightarrow t3$ com os demais, exceto $C \rightarrow t1$, $t1 \rightarrow t2$ e $t2 \rightarrow t2$. As demais diferenças não são significativas na maioria dos casos. No total de 78 comparações, 56 são diferentes, correspondendo a aproximadamente 72%.

Quanto às moscas acasaladas (tabela 13) verifica-se que as fêmeas controle possuem longevidades médias de aproximadamente 28 dias, enquanto as tratadas variam de 23 a 41 dias, aproximadamente. Os machos controle apresentam longevidade média ao redor de 40 dias, enquanto as dos tratados variam de 29 a 47 dias aproximadamente.



TABELA 14. Valores de t ao nível de 0,05 (*) e 0,01 (**), calculados para as longevidades das fêmeas virgens de todos os experimentos.

Experimentos	C → to	C → t1	C → t2	C → t3	t1 → C	t1 → t1	t1 → t2	t2 → C	t2 → t1	t2 → t2	t3 → to	to → t3
C → C	6,64**	6,03**	5,80**	5,32**	5,61**	4,23**	5,21**	5,86**	3,00**	7,05**	5,63**	7,94**
C → to		1,31	1,66	2,91**	1,69	4,19**	3,18**	0,77	6,93**	0,77	1,58	2,44*
C → t1			0,40	1,61	0,52	3,08**	1,87	0,29	5,81**	2,12*	0,42	4,06**
C → t2				1,16	0,15	2,67**	1,41	0,61	5,31**	2,46*	0,06	4,37**
C → t3					0,91	1,74	0,26	1,58	4,47**	3,79**	0,98	6,10**
t1 → C						2,36*	1,13	0,71	4,81**	2,43*	0,08	4,12**
t1 → t1							1,53	2,85**	2,30*	4,96**	2,41*	6,90**
t1 → t2								1,79	4,26**	4,07**	1,21	6,45**
t2 → C									5,08**	1,42	0,62	2,77**
t2 → t1										7,80**	4,82**	10,29**
t2 → t2											2,30*	1,61
t3 → to												3,94**

TABELA 15. Valores de t ao nível de 0,05 (*) e 0,01 (**), calculados para as longevidades dos machos virgens de todos os experimentos.

Experimentos	C → to	C → t1	C → t2	C → t3	t1 → C	t1 → t1	t1 → t2	t2 → C	t2 → t1	t2 → t2	t3 → to	to → t3
C → C	5,01**	7,63**	5,57**	6,08**	5,64**	4,05**	6,80**	4,10**	3,89**	7,85**	3,15**	7,31**
C → to		4,40**	0,98	1,48	1,06	1,79	1,81	1,26	1,99*	4,70**	2,88**	3,70**
C → t1			3,09**	3,47**	3,06**	6,63**	2,73**	5,39**	6,74**	0,27	7,30**	1,32
C → t2				0,32	0,07	2,77**	0,70	2,16*	2,95**	3,43**	3,76**	2,37*
C → t3					0,24	3,70**	0,50	2,80**	3,88**	3,97**	4,70**	2,71**
t1 → C						2,89**	0,64	2,25*	3,07**	3,41**	3,87**	2,33*
t1 → t1							3,90**	0,35	0,25	7,19**	1,30	6,33**
t1 → t2								3,05**	4,07**	3,13**	4,85**	1,88
t2 → C									0,57	5,79**	1,50	4,91**
t2 → t1										7,28**	1,05	6,44**
t2 → t2											7,78**	1,75
t3 → to												7,02**

Os valores de t para comparação das longevidades entre as fêmeas e os machos acasalados foram significativos no controle, $C \rightarrow t_2$, $C \rightarrow t_3$, $t_1 \rightarrow t_1$, $t_2 \rightarrow t_1$, $t_2 \rightarrow t_2$, $t_0 \rightarrow t_3$. Em todos esses casos a longevidade dos machos é superior à das fêmeas.

Os valores de t para comparação das longevidades médias entre as fêmeas acasaladas são apresentados na tabela 16. O controle difere significativamente de $C \rightarrow t_3$, $t_1 \rightarrow C$, $t_2 \rightarrow C$, $t_2 \rightarrow t_1$, $t_3 \rightarrow t_0$ e $t_1 \rightarrow t_1$. Exceto em $C \rightarrow t_3$, as demais longevidades são superiores à do controle. Quanto aos demais experimentos observam-se diferenças significativas nos seguintes casos: (1) de $t_0 \rightarrow t_3$ com todos os demais, exceto com o controle, $C \rightarrow t_0$, $C \rightarrow t_1$, $C \rightarrow t_3$ e $t_2 \rightarrow t_2$; (2) de $t_2 \rightarrow C$ com os demais, exceto $t_1 \rightarrow t_1$ e $t_2 \rightarrow t_1$; (3) de $C \rightarrow t_3$ com os demais, exceto $C \rightarrow t_0$; (4) de $C \rightarrow t_0$ com os demais, exceto com o controle, $C \rightarrow t_1$, $C \rightarrow t_3$ e $t_2 \rightarrow t_2$. No total de 78 comparações, 42 foram significativas, correspondendo a aproximadamente 54%.

Os valores de t para comparação das longevidades médias entre os machos acasalados de todos os experimentos constam da tabela 17. Apenas os experimentos $C \rightarrow t_0$ e $t_0 \rightarrow t_3$ diferem do controle, sendo inferiores a ele. Quanto aos demais experimentos observam-se diferenças significativas nos seguintes casos: (1) de $t_0 \rightarrow t_3$ com todos os demais experimentos, exceto $C \rightarrow t_0$, $C \rightarrow t_1$, $C \rightarrow t_3$ e $t_1 \rightarrow C$; (2) de $t_2 \rightarrow t_1$ em todos os casos, exceto com o controle, com $t_1 \rightarrow t_1$, $t_2 \rightarrow C$, $t_2 \rightarrow t_2$ e $t_3 \rightarrow t_0$; (3) de $t_2 \rightarrow C$ com os demais, exceto o controle, $t_1 \rightarrow t_1$, $t_2 \rightarrow t_2$ e $t_3 \rightarrow t_0$. A maioria das demais comparações deu resultados não significativos. No total de 78 comparações, 31 foram significativas, corresponden



TABELA 16. Valores de t ao nível de 0,05 (*) e 0,01 (**), calculados para as longevidades das fêmeas acasaladas de todos os experimentos.

Experimentos	C → to	C → t1	C → t2	C → t3	t1 → C	t1 → t1	t1 → t2	t2 → C	t2 → t1	t2 → t2	t3 → to	to → t3
C → C	1,44	0,23	0,94	2,05*	2,06*	2,37*	1,88	4,26**	3,30**	0,22	2,20*	1,17
C → to		1,54	2,54*	0,58	3,62**	3,71**	3,28**	5,81**	4,94**	1,80	3,76**	0,52
C → t1			0,61	2,07*	1,65	2,01*	1,53	3,74**	2,79**	0,05	1,79	1,29
C → t2				3,27**	1,22	1,65	1,10	3,57**	2,52**	0,79	1,38	2,43*
C → t3					4,34**	4,29**	3,89**	6,55**	5,74**	2,50*	4,47**	1,27
t1 → C						0,57	0,02	2,33*	1,23	1,99*	0,16	3,62**
t1 → t1							0,55	1,54	0,51	2,31*	0,42	3,66**
t1 → t2								2,20*	1,16	1,79	0,17	3,21**
t2 → C									1,19	4,31**	2,16*	5,99**
t2 → t1										3,31**	1,05	5,10**
t2 → t2											2,14*	1,58
t3 → to												3,77**

TABELA 17. Valores de t ao nível de 0,05 (*) e 0,01 (**), calculados para as longevidades dos machos acasalados de todos os experimentos.

Experimentos	C → to	C → t1	C → t2	C → t3	t1 → C	t1 → t1	t1 → t2	t2 → C	t2 → t1	t2 → t2	t3 → to	to → t3
C → C	2,49*	1,35	0,03	0,85	1,38	0,90	0,64	1,50	1,49	0,39	0,10	2,48*
C → to		1,44	3,63**	1,97	1,50	4,03**	2,63**	4,94**	5,00**	3,82**	3,19**	0,43
C → t1			1,86	0,58	0,01	2,64**	1,00	3,44**	3,47**	2,23*	1,75	1,36
C → t2				1,12	1,95	1,22	0,89	2,05*	2,05*	0,60	0,18	4,20**
C → t3					0,60	2,02*	0,34	2,76**	2,77**	1,54	1,13	1,97
t1 → C						2,72**	1,05	3,56**	3,59**	2,32**	1,81	1,44
t1 → t1							1,89	0,65	0,62	0,65	0,94	4,30**
t1 → t2								2,72**	2,73**	1,37	0,91	2,88**
t2 → C									0,03	1,39	1,65	5,39**
t2 → t1										1,38	1,64	5,50**
t2 → t2											0,35	4,22**
t3 → to												3,40**

do a 40%, aproximadamente.

A comparação das longevidades médias entre fêmeas virgens e acasaladas e entre machos virgens e acasalados consta da tabela 18. Em relação às fêmeas foram significativas as diferenças obtidas para os experimentos $C \rightarrow C$, $C \rightarrow t_0$, $C \rightarrow t_3$, $t_2 \rightarrow C$ e $t_2 \rightarrow t_1$. Entre os machos virgens e acasalados foram significativas as comparações $C \rightarrow C$, $C \rightarrow t_0$, $C \rightarrow t_1$, $C \rightarrow t_2$, $t_1 \rightarrow t_2$, $t_2 \rightarrow C$ e $t_2 \rightarrow t_2$. Portanto, ambos os sexos partilham diferenças significativas quanto à longevidade, relativas ao estado "virgem ou acasalado" nos experimentos $C \rightarrow C$, $C \rightarrow t_0$ e $t_2 \rightarrow C$.

A tabela 19 apresenta os valores dos limites mínimo e máximo da distribuição das longevidades das moscas virgens e acasaladas e sua amplitude. Podemos observar que a amplitude da distribuição da longevidade tanto para fêmeas como para os machos virgens dos experimentos tratados é inferior à do controle, em todos os casos. Para as fêmeas essa diferença varia de 32 a 53%, enquanto que nos machos varia de 15 a 55%.

Quanto aos indivíduos acasalados, a comparação da amplitude de variação da longevidade dos machos tratados com o controle, mostra redução dos primeiros em todos os casos, variando de 19 a 63% no valor da redução. No caso das fêmeas acasaladas, porém, houve redução da amplitude de variação em 6 experimentos comparados com o controle (de 13 a 39%), aumento em três casos (de 12 a 25%) e em dois casos a amplitude de variação das longevidades foi a mesma obtida no controle.

A comparação da amplitude da distribuição entre



TABELA 18. Valores de t ao nível de 0,05(*) e 0,01(**), calculados entre fêmeas virgens e acasaladas e entre machos virgens e acasalados.

Experimentos	Fêmea virgem X acasalada	Macho virgem X acasalado
C → C	7,05**	3,27**
C → t₀	3,04**	2,36*
C → t₁	1,86	2,86**
C → t₂	1,75	2,34*
C → t₃	7,14**	1,16
t₁ → C	0,41	0,28
t₁ → t₁	1,63	1,13
t₁ → t₂	1,35	2,14*
t₂ → C	2,57*	2,13*
t₂ → t₁	3,41**	1,79
t₂ → t₂	0,42	5,88**
t₃ → t₀	0,16	0,98
t₀ → t₃	0,88	1,51

indivíduos virgens e acasalados mostra redução para os acasalados comparados com os não acasalados de mesmo sexo, no controle e na totalidade dos demais experimentos, exceto em $C \rightarrow t1$ (fêmeas) e $C \rightarrow t3$ (machos). Os gráficos de distribuição da longevidade para fêmeas e machos virgens e acasalados, nos vários experimentos, constam da figura 2. A redução da amplitude da distribuição da longevidade nos experimentos com cafeína, indicada pelos números da tabela 19, é visualizada nas curvas de distribuição desses experimentos que se apresentam com picos mais elevados que os do controle.

A maioria dos machos virgens apresentam os picos da curva de distribuição superpostos ou deslocados para a esquerda em relação às fêmeas. Já os machos acasalados apresentam os picos predominantemente deslocados para a direita.

As fêmeas e os machos virgens do experimento controle apresentam vários picos na curva de distribuição da longevidade, enquanto os machos virgens dos experimentos tratados apresentam, geralmente, de um a quatro picos e as fêmeas, frequentemente, um só pico mais destacado.

Nas curvas de distribuição da longevidade das fêmeas e dos machos acasalados controle, há uma redução no número de picos, em relação às moscas virgens controle. Quanto aos tratados acasalados, são semelhantes aos tratados virgens, exceto pelo encurtamento das curvas de distribuição dos primeiros.

O experimento $t0 \rightarrow t3$ destaca-se por apresentar um pico bem característico e quase superposto, para as fêmeas e machos virgens e acasalados.

Tabela 19. Limites mínimo e máximo da distribuição da longevidade nos treze experimentos e sua amplitude, em moscas virgens e acasaladas.

Experimentos	Fêmea virgem			Macho virgem			Fêmea acasalada			Macho acasalado		
	min	máx	amplitude	min	máx	amplitude	min	máx	amplitude	min	máx	amplitude
C → C	5	138	133	5	145	140	5	61	56	5	117	112
C → to	5	82	77	5	110	105	5	39	34	5	47	42
C → t1	5	68	63	5	89	84	5	75	70	5	68	63
C → t2	5	82	77	5	82	77	5	54	49	5	75	70
C → t3	5	75	70	5	68	63	5	39	34	5	96	91
t1 → C	5	82	77	5	103	98	12	61	49	5	68	63
t1 → t1	5	82	77	5	89	84	5	68	63	5	75	70
t1 → t2	5	68	63	5	75	70	5	61	56	5	61	56
t2 → C	5	96	91	5	124	119	5	75	70	5	75	70
t2 → t1	5	96	91	5	75	70	5	68	63	5	75	70
t2 → t2	5	82	77	5	75	70	5	54	49	5	68	63
t3 → to	5	89	84	5	110	105	5	61	56	5	82	77
to → t3	5	68	63	5	75	70	5	39	34	5	47	42

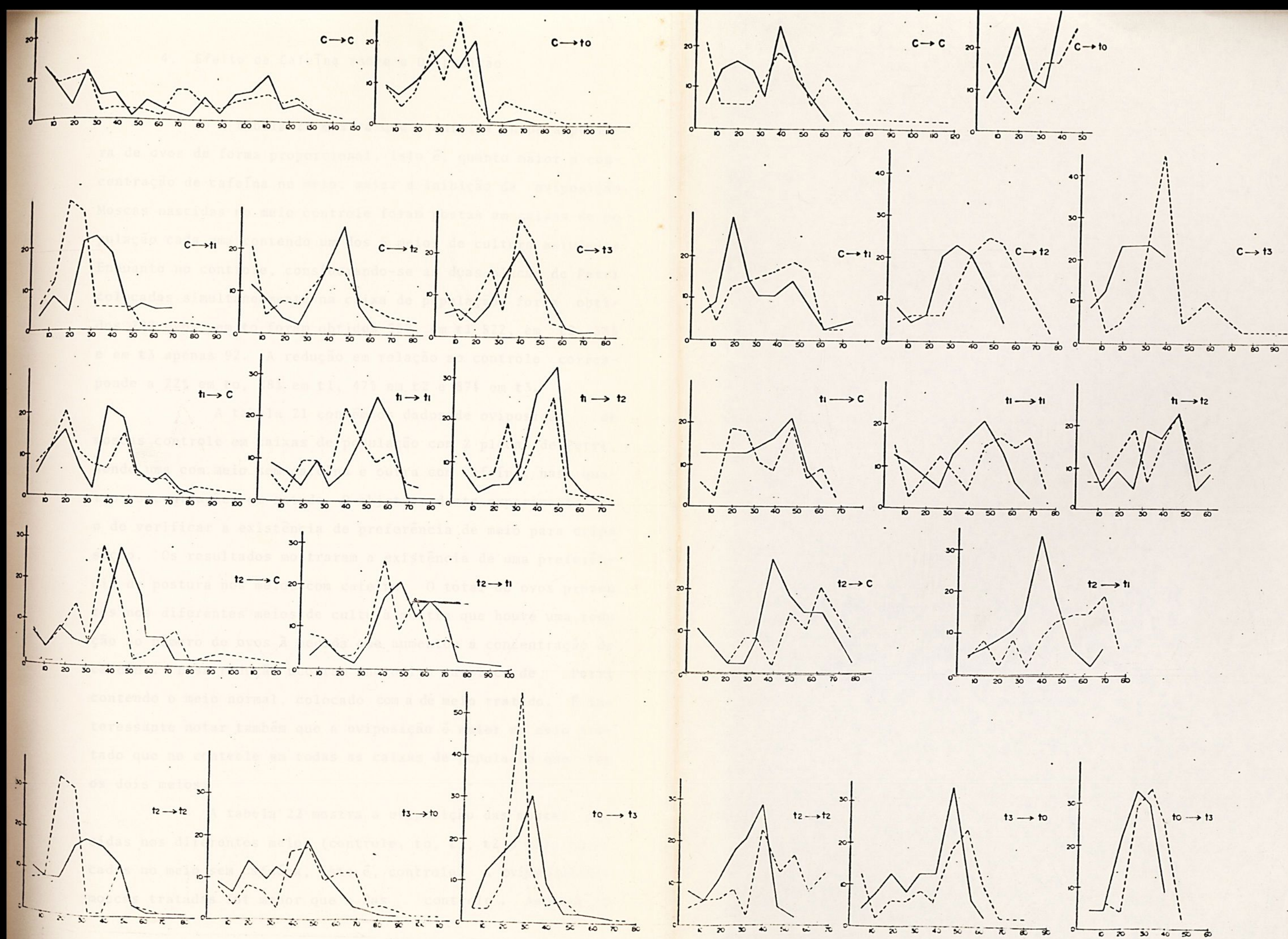


Figura 2. Curvas de distribuição da longevidade, em dias (abscissa) de fêmeas e machos virgens (gráficos à esquerda) e fêmeas e machos acasalados (gráficos à direita). Machos (----) fêmeas (—). Em ordenada, porcentagem de moscas.

4. Efeito da Cafeína sobre a Oviposição

A tabela 20 mostra que a cafeína inibe a postura de ovos de forma proporcional, isto é, quanto maior a concentração de cafeína no meio, maior a inibição da oviposição. Moscas nascidas no meio controle foram postas em caixas de população cada uma contendo um dos 5 meios de cultura estudados. Enquanto no controle, considerando-se as duas placas de Petri colocadas simultaneamente na caixa de população, foram obtidos 727 ovos, em t_0 foram obtidos 567, em t_1 522, em t_2 385 e em t_3 apenas 92. A redução em relação ao controle corresponde a 22% em t_0 , 28% em t_1 , 47% em t_2 e 87% em t_3 .

A tabela 21 contém os dados de oviposição de moscas controle em caixas de população com 2 placas de Petri, sendo uma com meio sem cafeína e outra com cafeína, nas quatro concentrações em estudo. O objetivo deste experimento foi o de verificar a existência de preferência de meio para oviposição. Os resultados mostraram a existência de uma preferência de postura nos meios com cafeína. O total de ovos presentes nos diferentes meios de cultura mostra que houve uma redução no número de ovos à medida que aumentou a concentração de cafeína. Essa redução ocorreu inclusive na placa de Petri contendo o meio normal, colocado com a de meio tratado. É interessante notar também que a oviposição é maior no meio tratado que no controle em todas as caixas de população que têm os dois meios.

A tabela 22 mostra a oviposição das moscas nascidas nos diferentes meios (controle, t_0 , t_1 , t_2 e t_3), colocadas no meio sem cafeína, isto é, controle. A oviposição das moscas tratadas foi menor que a das controle. As moscas



TABELA 20. Oviposição das moscas controle colocadas em caixas de população contendo duas placas de Petri com os diferentes meios de cultura.

Placas de Petri	Número de ovos nos diferentes meios				
	C	to	t1	t2	t3
1	306	382	264	235	49
2	421	185	258	150	43
TOTAL	727	567	522	385	92

TABELA 21. Oviposição das moscas controle em caixas de população contendo apenas meio de cultura controle (placas de Petri 1a e 1b) ou contendo meio controle (placa de Petri 1) e meio com cafeína (placa de Petri 2), nas diferentes concentrações.

Placas de Petri	Número de ovos nos diferentes meios				
	C	t0	t1	t2	t3
1	(a) 1000 (b) 303	386	151	278	15
2		597	397	373	99
TOTAL	1303	983	548	651	114

5. Efeito Citológico da Cafeína

Foram preparadas lâminas por esmagamento de glândulas salivares e gânglios cerebrais de larvas do terceiro estágio de desenvolvimento de *Calliphora vicina* em meio controle e em meio com cafeína nas quatro diferentes concentrações de cafeína. A reação citológica observada nos esmagamentos salivares foi a seguinte: no controle, as células apresentavam núcleo bem definido, com cromossomos bem visíveis, no padrão de bandas de cromossomos característico da espécie.



t3 produziram 74,65% menos ovos que as moscas controle, as t2, 53,30%, as t1, 36,99% e as to, 18,53%. Aqui também o efeito ocorreu na proporção direta do aumento da concentração de cafeína no meio em que as moscas foram criadas.

5. Efeito da Cafeína sobre o Peso das Moscas

Este experimento foi realizado a fim de verificar um possível efeito da cafeína sobre o peso das moscas, nas quatro diferentes concentrações de cafeína (to, t1, t2 e t3), comparadas com o controle. Foram pesadas 621 moscas recém nascidas, em 3 ou 4 amostras, por experimento.

Na tabela 23, podemos observar que, em todos os experimentos, as fêmeas têm peso médio superior ao dos machos. Podemos observar ainda que a introdução de cafeína no meio de cultura não reduziu o peso médio das moscas fêmeas ou machos quando comparadas com o respectivo controle. Ao contrário, um pequeno aumento ocorreu, para fêmeas e machos, nas concentrações to e t3.

6. Efeito Citológico da Cafeína

Foram preparadas lâminas por esmagamento de glândulas salivares e gânglios cerebrais de larvas do terceiro estágio de *Drosophila prosaltans* criadas no meio sem cafeína e no meio contendo as quatro diferentes concentrações de cafeína, e coradas com orceína lacto-acética. A análise dessas lâminas não mostrou diferenças visíveis nos cromossomos mitóticos, no padrão de bandas dos cromossomos politêni-



TABELA 23. Peso das moscas controle e tratadas com as diferentes concentrações de cafeína.

Experimentos	CONTROLE		TRATAMENTO	
	Nº de moscas	Peso total (g)	Nº de moscas	Peso total (g)

TABELA 22. Oviposição das moscas nascidas nos diferentes meios de cultura, em caixas de população contendo apenas meio de cultura sem cafeína (Placas de Petri 1 e 2).

Placas de Petri	Nº de ovos das moscas nascidas nos 5 meios				
	C	to	t1	t2	t3
1	767	533	260	316	268
2	582	566	590	314	74
TOTAL	1349	1099	850	630	342

TABELA 23. Peso das moscas controle e tratadas com as diferentes concentrações de cafeína.

Experimentos	FÊMEA			MACHO		
	Nº de moscas por amostra	Peso total (g)	Peso médio (g)	Nº de moscas por amostra	Peso total (g)	Peso médio (g)
Controle	291	0,2252	0,00077	247	0,1437	0,00058
	247	0,1870	0,00076	223	0,1267	0,00057
	83	0,0615	0,00074	151	0,0862	0,00057
	TOTAL	621	0,4737	621	0,3566	0,00057
t ₀	336	0,2884	0,00086	323	0,2068	0,00064
	223	0,1831	0,00082	194	0,1199	0,00062
	62	0,0446	0,00072	104	0,0604	0,00058
	TOTAL	621	0,5161	621	0,3871	0,00062
t ₁	183	0,1400	0,00076	291	0,1735	0,00060
	255	0,1890	0,00074	237	0,1334	0,00056
	183	0,1400	0,00076	93	0,0492	0,00053
	TOTAL	621	0,4690	621	0,3561	0,00057
t ₂	257	0,2043	0,00079	195	0,1152	0,00059
	209	0,1586	0,00076	199	0,1154	0,00058
	77	0,0549	0,00071	185	0,1006	0,00054
	78	0,0550	0,00071	42	0,0236	0,00056
	TOTAL	621	0,4728	621	0,3548	0,00057
t ₃	166	0,1453	0,00087	88	0,0573	0,00065
	190	0,1582	0,00083	96	0,0599	0,00062
	228	0,1781	0,00078	201	0,1260	0,00063
	37	0,0268	0,00072	236	0,1414	0,00060
	TOTAL	621	0,5084	621	0,3846	0,00062

cos ou na morfologia do nucléolo.

Para melhor análise, foram preparados híbridos de moscas **t3** e controle, pois em heterozigose, seria mais fácil visualizar pequenas diferenças morfológicas ou estruturais. Neste caso, também nenhuma diferença foi verificada.

7. Estudo das Esterases por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

As figuras 3 a 7 são fotografias de géis de poliacrilamida onde foram analisadas as esterases de adultos controle e tratados, conforme descrito em Materiais e Métodos. As observações não permitiram concluir quanto a efeitos da cafeína sobre esse sistema. As variações detectadas parecem ser devidas à variabilidade individual e não à ação da cafeína.

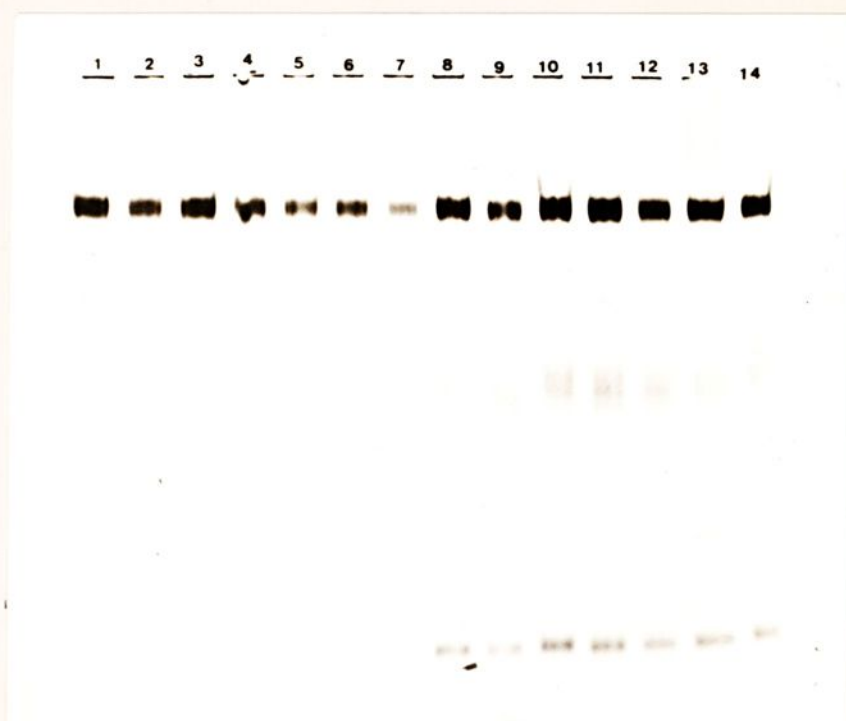


Figura 3. Esterases de adultos fêmeas (1 a 7) e machos (8 a 14) controle de *Drosophila prosaltans*, com 6 dias de idade.

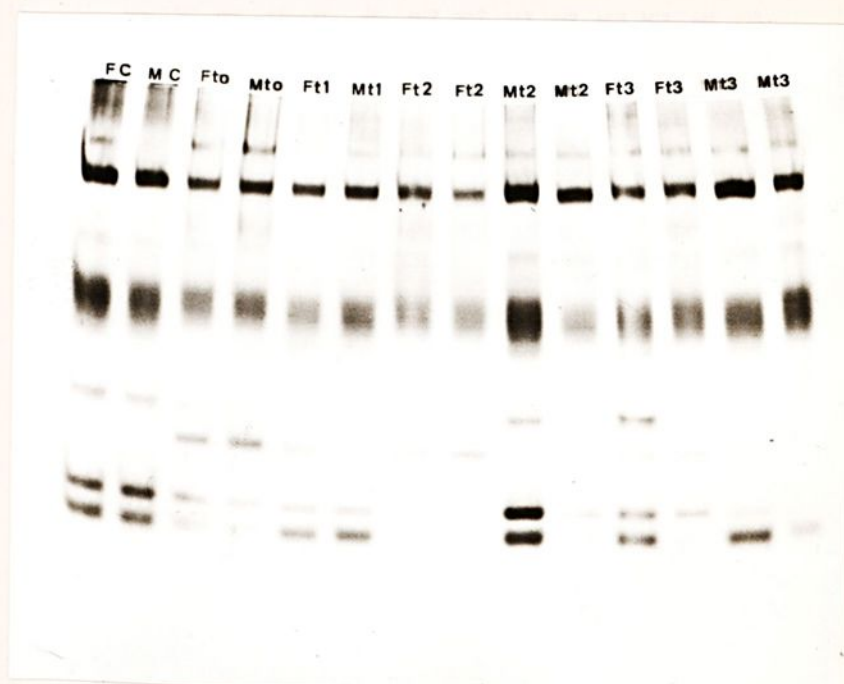


Figura 4. Esterases de fêmeas (F) e machos (M) adultos, com 6 dias de idade, control e (C), to, t1, t2 e t3.

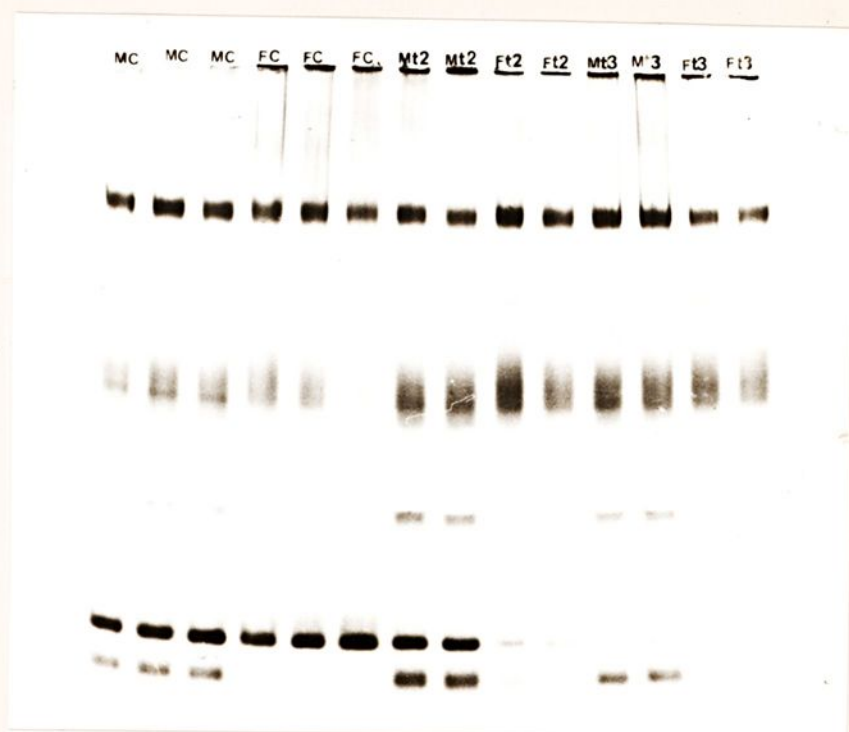


Figura 5. Esterases de adultos fêmeas (F) e machos (M) com 6 dias de idade, Controle (C), t2 e t3.

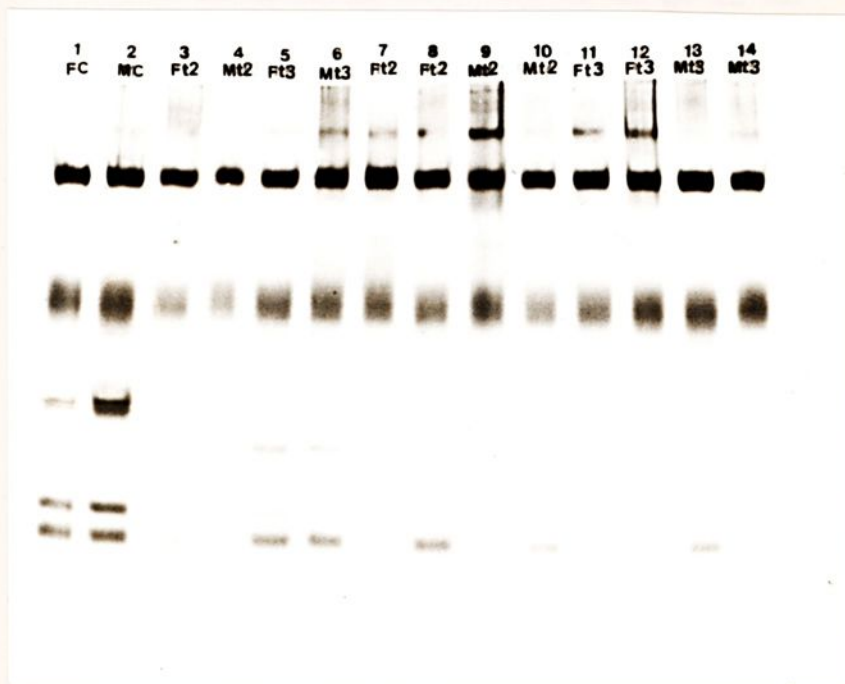


Figura 6. Esterases de fêmeas (F) e machos (M) Controle (C 1 e 2), fêmeas e machos nascidos no meio tratado e criados no meio controle (3 a 6) e fêmeas e machos nascidos e criados no meio com cafeína (7 a 14), com 6 dias de idade.

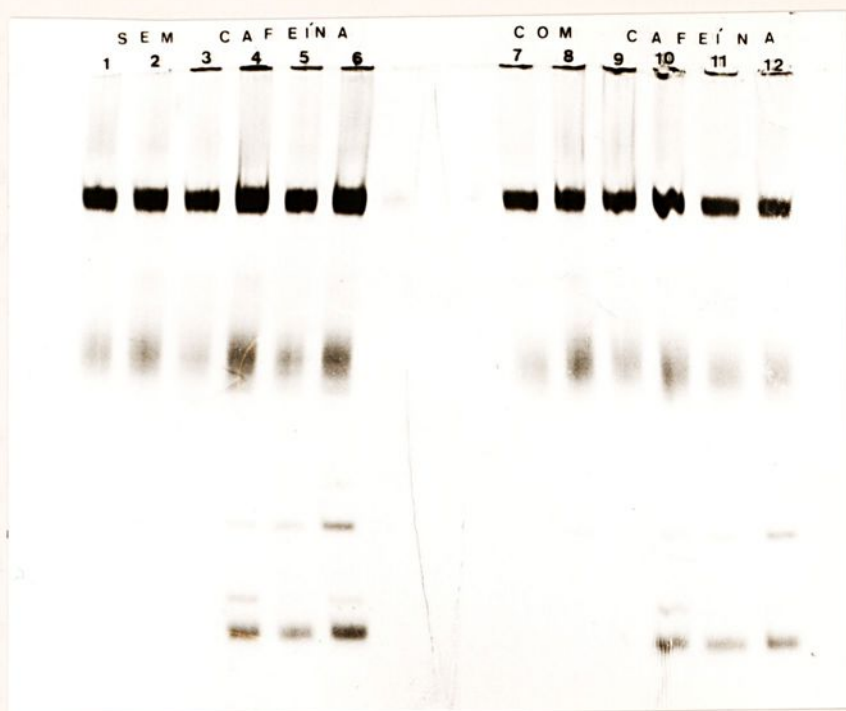


Figura 7. Esterases de adultos fêmeas (1 a 3, 7 a 9) e machos (4 a 6, 10 a 12) con trole, coradas com tampão (1 a 6) ou tampão + cafeína (7 a 12).

IV - DISCUSSÃO

O café, o chá e outras bebidas que contêm cafeína são amplamente consumidas em muitas partes do mundo. Devido a este consumo intenso e devido às propriedades farmacológicas conhecidas da cafeína, sua toxicidade tem sido um assunto de interesse nos anos recentes.

A cafeína foi durante muitos anos incluída na lista de compostos GRAS ("Generally Recognized As Safe"-USA). Entretanto, em 1980, a "Food and Drug Administration" (USA) incluiu um alerta às mulheres grávidas quanto ao consumo da cafeína durante a gravidez (COLLINS e cols., 1987). Esse alerta suscitou não só a revisão dos estudos anteriores como também determinou o início de novos estudos sobre a cafeína.

A *Drosophila* oferece uma variedade de sistemas para o estudo de substâncias tóxicas que atuam na reprodução, no desenvolvimento ou que agem como mutagênicos e carcinogênicos. Uma importante vantagem desse organismo é a sua capacidade de metabolizar os xenobióticos de maneira semelhante aos mamíferos (FOERSTER & WÜRGLE, 1984).

No presente trabalho, foi utilizada a *Drosophila prosaltans* para um estudo do efeito da cafeína em alguns aspectos reprodutivos, do desenvolvimento e cromossômicos. Esses aspectos abrangem a produtividade, o tempo de desenvolvimento, a longevidade, a oviposição, o peso das moscas adultas e o aspecto dos cromossomos mitóticos e politênicos. Buscou-se também algum efeito no padrão de esterases em gel de poli(acrilamida).

Os resultados obtidos indicam que a cafeína al

tera a produtividade reduzindo-a. A produtividade em todos os experimentos em que foi utilizada a cafeína, no meio de cultura, foi significativamente menor que a dos controles, exceto no experimento $C \rightarrow to$. Neste caso, trata-se da concentração mais baixa, utilizada, de cafeína (50 $\mu\text{g/ml}$ de meio de cultura) e embora não significativa, a produtividade nesse meio também foi menor que a do controle.

Os resultados do 1º grupo de experimentos (meios C , $t1$ e $t2$) indicaram que, além da redução da produtividade, a cafeína pode determinar um atraso no início da mesma, uma vez que a porcentagem de descendentes, relativa aos totais, é geralmente menor nos 1ºs tubos dos experimentos tratados, do que nos do controle.

Considerando-se os experimentos $C \rightarrow C$, $C \rightarrow to$, $C \rightarrow t1$, $C \rightarrow t2$ e $C \rightarrow t3$, pode-se dizer que o nível de produtividade acompanha inversamente a concentração de cafeína no meio de cultura, isto é, quanto maior a dose, menor a produtividade.

As diferenças observadas quanto à produtividade de fêmeas, entre os meios tratados, comparados entre si, não foram significativas na maioria dos casos (32 de 34 comparações). Quanto à produtividade de machos, foram significativas em 8 das 34 comparações. Essa diferença significativa na comparação da produtividade dos machos dos experimentos tratados reflete-se na comparação dos totais, cujas diferenças significativas são as mesmas em quatro experimentos.

Dessas observações pode-se tirar a indicação de que a produtividade de machos talvez seja mais afetada pela cafeína do que a produtividade de fêmeas. A maior sensibilidade dos machos a situações adversas tem sido demonstrada em



vários experimentos e observações (HALDANE, 1922; MULLER, 1940; NEI, 1975 e TADEI, 1977).

Considerando-se o número de descendentes produzidos nos experimentos tratados, verifica-se, geralmente, que o retorno das moscas para um meio de menor concentração de cafeína determina um aumento da produtividade e que sua passagem para um meio de maior concentração determina uma redução da mesma. Podemos observar aumento, por exemplo, em $t_2 \rightarrow C$ e $t_2 \rightarrow t_1$ comparados com $t_2 \rightarrow t_2$ e $C \rightarrow t_2$; e $t_3 \rightarrow t_0$ comparado com $C \rightarrow t_3$. Inversamente, podemos observar redução, por exemplo, em $t_0 \rightarrow t_3$ comparado com $t_3 \rightarrow t_0$; em $t_1 \rightarrow t_2$ comparado com $t_2 \rightarrow t_1$. Constitui exceção, o caso de $t_1 \rightarrow C$, em que não se observa melhora na produtividade, comparado com $t_1 \rightarrow t_1$ ou $C \rightarrow t_1$, ao contrário há uma maior redução no número de descendentes.

As variações observadas não acompanham, na mesma magnitude, as variações da concentração de cafeína no meio. Provavelmente estão envolvidos, nestes casos, fenômenos como resistência, possíveis alterações genotípicas ocorridas no tratamento anterior, e mesmo influências ambientais ou variações na quantidade de meio (e conseqüentemente de cafeína) ingerido pelas moscas.

Resistência a agentes mutagênicos e tóxicos, em *Drosophila*, foi descrita por vários autores. Por exemplo, NÖTHEL & ABDALLA (1982) descreveram radioresistência de uma população experimental de *Drosophila melanogaster* relativa à população básica da qual foi derivada. A radioresistência dessa população desenvolveu-se após várias centenas de gerações, sob exposição à irradiação, sendo geneticamente controlada pelos mutantes *rar-1* e *rar-2*. Uma resistência adicional foi



atribuída ao fator genético *rar-3*.

A genética da suscetibilidade aos efeitos tóxicos agudos, provocados pela cafeína administrada intraperitonealmente, foi analisada em duas linhagens endocruzadas de camundongos, as linhagens *SWR* e *CBA*. A primeira sobrevive à dose de 187 mg/Kg, considerada letal, enquanto a segunda geralmente morre em menos de 30 segundos após a aplicação dessa dose. A descendência F_1 do intercruzamento das linhagens era uniformemente sensível à letalidade da cafeína, nas duas direções de cruzamento, indicando que a resposta à cafeína está sob o controle de um único gene autossômico dominante. O intercruzamento dos F_1 produziu 26% de descendentes resistentes e 74% de suscetíveis (SEALE e cols., 1985).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, BARD e cols. (1980) isolaram 4 haplóides resistentes à cafeína, sendo 2 resistentes a 50 mM de cafeína e 2, a 100 mM, e os analisaram geneticamente. Análises de complementação e téttrade indicaram que as 4 mutações são alelos do mesmo locus. As quatro linhagens isoladas demonstraram dominância incompleta quando hibridizadas com a linhagem do tipo selvagem e dominância de alta sobre baixa resistência, quando hibridizadas entre si. Diferenças em resistência à cafeína foram encontradas entre células da linhagem "grande" do tipo selvagem e suas derivadas "petite". Os autores apresentaram hipóteses para explicar as bases moleculares da resistência à cafeína. Primeiro, haveria uma mudança na especificidade enzimática de tal modo, que a cafeína não seria incorporada em um ou mais metabólitos celulares essenciais. Por exemplo, a toxicidade da cafeína poderia ser devida à sua conversão em análogos adenínicos inibidores de ATP, NAD⁺ ou FAD⁺. Segundo, a célula poderia adquirir uma

capacidade aumentada para modificar quimicamente a cafeína, resultando em uma redução nos seus efeitos tóxicos. Terceiro, a permeabilidade da membrana à cafeína poderia ser alterada devido à alteração de uma permease.

O desenvolvimento de tolerância temporária ao efeito comportamental da cafeína "atividade locomotora", foi descrito em ratos tratados diariamente com essa droga (HOLTZMAN & FINN, 1988). Após receber 5 a 10 mg/Kg/dia de cafeína colocada na água de beber, os ratos tornaram-se tolerantes ao efeito estimulante da cafeína na atividade locomotora. A exposição dos ratos a doses diárias mais altas, resultou no desenvolvimento de tolerância completa à estimulação dessa atividade. A sensibilidade completa ao efeito estimulante de cafeína, entretanto, retornou após 2 a 3 semanas do término da sua administração diária, indicando que a falha da resposta à cafeína não resultou de alteração da função motora, pelo menos de forma irreversível.

Quanto às possíveis causas da redução da produtividade, detectada no presente trabalho, a literatura traz alguns resultados que podem auxiliar. Por exemplo, TIMSON (1977) apresenta uma revisão sobre os efeitos da cafeína no aparelho reprodutor e na produção de descendentes. Um dos trabalhos por ele citado é o de PETERSON (1969), o qual mostrou que a cafeína diminui o número de túbulos funcionais nos testículos de ratos e afeta a espermatogênese. Entretanto, em camundongos F_1 do cruzamento das linhagens C57BL X C3H, a cafeína não induziu anormalidade no esperma. Outro trabalho citado, é o de STIEVES (1928) que, em coelhos da linhagem pura russa, obteve a dose letal de cafeína de 0,2 g/Kg do peso corpóreo. Após acostumar-se à cafeína em doses baixas, entre

tanto, esta dose pode ser administrada vários dias sucessivos sem efeito letal e, acima de 0,15 g/kg de peso corpóreo, foi tolerada por meses sem aparente efeito à saúde. Se doses maiores do que estas fossem dadas diariamente, por algum tempo, então apareciam mudanças retrogressivas nas gônadas e, se a cafeína não fosse retirada, podiam levar à esterilidade completa.

Já o trabalho de WEATHESBEE e cols. (1975, in TIMSON, 1977) mostrou que o ovário apresenta maior sensibilidade à cafeína do que os testículos. Mostrou também que animais (hamster chinês) tratados com doses que não levam à atrofia das gônadas podem ter efeitos durante a reprodução. Quando os machos eram tratados dessa maneira, 75% dos descendentes morriam na primeira semana depois do nascimento, enquanto que se as fêmeas fossem tratadas, 72% dos embriões morriam no útero. Uma outra observação do mesmo trabalho é a de que o consumo de cafeína por hamster chinês altera a proporção sexual dos descendentes, aumentando significativamente a porcentagem de fêmeas.

Como foi mencionado na Introdução, o trabalho de SEHGAL & SIMÕES (1976) mostrou também a ocorrência de malformações do ovário e esterilidade na maioria das fêmeas, quando ovos e larvas de *Drosophila melanogaster* foram tratados com cafeína e outras drogas.

No presente trabalho, o interesse em verificar um possível efeito da cafeína na oviposição levou a programar o experimento descrito no item 4 de Materiais e Métodos. Os resultados mostraram que a cafeína, presente no meio de cultura ao qual as moscas ficaram expostas 12 horas, inibe a postura de ovos das fêmeas não tratadas e acasaladas, de forma direta, isto é, quanto maior a concentração de cafeína no meio, maior a redução do número de ovos.

Outra observação, no estudo da oviposição, foi a de que as moscas que se desenvolveram nos meios com cafeína também produzem menor número de ovos. Neste caso também, a redução está diretamente relacionada com a dose de cafeína do meio de origem da mosca.



Foram interessantes, também, os resultados do teste de escolha de meios com e sem cafeína, em caixas de população, para oviposição; as moscas mostraram preferência de postura no meio com cafeína em todas as caixas de população em que os dois meios estavam presentes. Contudo, apresentaram também neste caso, redução da postura nas duas placas de Petri das caixas de população, isto é, nos meios com e sem cafeína.

Preferência por solução de cafeína em relação à água, foi demonstrada em ratos, para concentrações muito baixas de cafeína que resultaram em pequena ingestão da droga (HEPPNER e cols., 1986, in GRIFFITHS & WOODSON, 1988). Uma preferência por concentrações de cafeína que resultaram na ingestão de quantidade relevante da droga, para efeitos ativos de comportamento, foi demonstrada somente depois de 14 dias de exposição forçada a concentrações relativamente altas de cafeína (VITIELLO & WOODS, 1975, in GRIFFITHS & WOODSON, 1988).

No caso do teste de preferência de oviposição de *Drosophila*, neste trabalho, entretanto, as moscas não tinham experiência anterior quanto à ingestão de cafeína, pois eram provenientes do meio controle.

De acordo com BOULETREAN-MERLE (1973, in ASHBURNER & WRIGHT, 1980), moscas cruzadas botam seus ovos rapidamente e, se bem alimentadas, continuam a produzir novos folículos em uma taxa equivalente à taxa de postura, enquanto fêmeas virgens retêm seus ovos maduros e não iniciam a postura em número significativo até o quinto ou sétimo dia. Nestas, a taxa de produção de folículos pelo germário é retardada.

Com base nesses dados e nos resultados dos experimentos de oviposição deste trabalho, pode-se supor que o



meio com cafeína exerça uma atração sobre as moscas, que a ele se dirigem preferencialmente, alimentando-se dele. Contudo, a ingestão da cafeína exerceria um efeito bloqueador na produção de novos folículos atrasando ou reduzindo a oviposição. Esse atraso na oviposição poderia explicar também o atraso do início da produtividade observado no experimento anterior.

É possível que a cafeína cause, além de atrasos, outros distúrbios no desenvolvimento dos folículos dos ovos de *Drosophila* como foi observado por DAVRING (1975) sobre os efeitos do 2, 4, 5-T ester, ou mesmo por WEATHESBEE e cols. (1975, opus cit.) sobre os efeitos da cafeína em fêmeas de hamster chinês. É possível também que esses problemas estejam relacionados com distúrbios no reparo e duplicação do DNA, mencionados na literatura em associação com a cafeína. O estudo da ovogênese de moscas criadas com e sem cafeína poderá trazer mais informações sobre esse aspecto.

Muitos estudos têm sido realizados sobre os efeitos da ingestão materna de cafeína, nas características do desenvolvimento de ratos e humanos. TANAKA e cols. (1987), mostraram que a ingestão de cafeína durante longo tempo, por ratas, antes e durante a gravidez, induz a redução do peso da placenta. A ingestão de 1,5 a 3,0 $\mu\text{g/ml}$ ou grama de peso, durante a gravidez causou uma redução significativa no peso do corpo e uma redução, ainda maior, no peso do cérebro dos fetos. POLLARD e cols. (1987) mostraram que a cafeína administrada a ratas durante a gravidez causa um retardo significativo no desenvolvimento do feto de ambos os sexos. A taxa de mortalidade, ao nascimento ou logo após, foi significativamente mais alta e o tamanho das ninhadas significativamente mais



baixo quando estas eram tratadas com 60 mg/Kg. As taxas subsequentes de crescimento também foram afetadas.

GILBERTI & PISTEY (1973, in TIMSON, 1977) verificaram que injeção diária intraperitoneal de 4 a 16 mg de caféi na durante a gravidez de ratos HULZER levou ao aumento significativo na reabsorção e uma diminuição no peso dos descendentes ao nascimento, quando comparado com controles tratados com salina.

BRUYERE e cols. (1988) mostraram que a cafeína administrada a embriões de galinha de três dias produziu anomalias ultra-estruturais e funcionais nas mitocôndrias cardíacas do embrião, abrangendo uma destruição acentuada das cristas, a formação de figuras semelhantes à mielina no interior das mitocôndrias e também edema intracelular. A função da mitocôndria na oxidação do succinato foi inibida. Esses eventos na patogênese celular cardíaca podem, de acordo com os autores levar à morte embrionária da galinha.

Com base nessas informações contidas na literatura, decidiu-se analisar a velocidade do desenvolvimento e avaliar o peso das moscas tratadas, comparando essas observações com o controle. O estudo da velocidade de desenvolvimento mostrou que o tratamento com cafeína nas concentrações t_2 e t_3 , que correspondem, respectivamente a 1000 $\mu\text{g/ml}$ e 1500 $\mu\text{g/ml}$, leva a um atraso de um dia, quando comparado com os meios C, t_0 e t_1 (controle e concentrações de 50 $\mu\text{g/ml}$ e 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente). Essas observações concordam com os dados de POLLARD e cols. (1987), segundo os quais a cafeína causa um retardo no desenvolvimento dos fetos de ratos de ambos os sexos.

Com base nos trabalhos já mencionados anterior



mente poderíamos admitir que o atraso observado no desenvolvimento das moscas tratadas seja causado por problemas na duplicação e reparo do DNA ou mesmo por problemas relacionados com a atividade mitocondrial na produção de energia, criados pelo tratamento com cafeína.

Com relação à avaliação do peso, é possível que o método empregado seja pouco sensível. Os resultados não mostraram redução de peso das moscas produzidas no meio tratado. Ao contrário, em duas concentrações, de cafeína, isto é, meios t_0 e t_3 houve aumento do peso médio das fêmeas e dos machos. Esses resultados diferem dos obtidos por SEHGAL e cols. (1977) que observaram efeito da cafeína no bloqueio do peso das larvas de *Telmatoscopus albipunctatus*, até o 10º dia. Esse bloqueio mostrou-se reversível após eliminação do tratamento.

O controle da longevidade dos adultos em qualquer organismo é uma função complexa do desenvolvimento que resulta da interação do genoma com os meios interno e externo (GOULD & CLARK, 1983).

GOULD & CLARK (1983) investigaram a ação de duas mutações ligadas ao sexo, de *Drosophila melanogaster*, *AL-2* e *AL-4* e verificaram que elas têm um forte efeito na longevidade média do adulto, reduzindo-a de 60 a 75 dias, que é a média selvagem, para 12 a 18 dias. Para o mutante *AL-4*, foi obtida uma leve indicação de que o foco dos efeitos fisiológicos observados está localizado em algum lugar da região cefálica. É possível porém, de acordo com LINTS & BOURGOIS (1985) e os próprios autores do trabalho (GOULD & CLARK, 1983) que os efeitos, na longevidade, dos genes *AL-2* e *AL-4* sejam devidos a uma lesão que não tem relação especial com o processo de envelhecimento.

Experimentos de seleção para aumento da longevidade de *Drosophila melanogaster* mostraram que esse parâmetro provavelmente não está sob o controle de genes menores com



efeito aditivo, pelo menos nesse organismo (LINTS e cols, 1979, in LINTS & BOURGOIS, 1985). Há entretanto algumas indicações de que ele esteja sob o controle de genes menores com efeito epistático (revisão em LINTS & BOURGOIS, 1985). Em resumo, os resultados mostraram que na *Drosophila melanogaster* a longevidade pode ser considerada como um traço adaptativo que é, pelo menos parcialmente, geneticamente controlado por genes menores com ação epistática.

Um levantamento dos trabalhos relacionados com a longevidade de *Drosophila melanogaster*, publicados na revista *Experimental Gerontology*, de 1964 a 1981, realizado por LINTS & BOURGOIS (1985) mostrou que a longevidade média das fêmeas excede a dos machos em menos do que 50% dos trabalhos. Esses autores citam também dados que mostram que a longevidade média das moscas mantidas em garrafas é $25,4 \pm 0,5$ dias e o máximo de longevidade, 30 dias, sendo, portanto, a diferença entre a média e o máximo, de 4,6 dias. Para moscas mantidas em frascos pequenos, esses valores foram respectivamente $14,3 \pm 0,9$ e 30 dias. Os autores supõem que, no primeiro caso, as mortes foram devidas ao envelhecimento, mas no segundo, muitas mortes foram prematuras e resultantes de outras causas que não o envelhecimento.

Os mesmos autores analisaram 117 tabelas de longevidade para machos e o mesmo número para fêmeas, todas obtidas de trabalhos com *Drosophila melanogaster*. Os autores desenvolveram uma medida da proporção de mortes prematuras versus mortes por envelhecimento e mostraram que a proporção era menor para machos do que para fêmeas (a proporção de mortes por velhice é mais alta nos machos do que nas fêmeas). Eles mostraram ainda que a longevidade potencial das fêmeas é leve



mente maior que a dos machos. Contudo, consideraram também que os trabalhos existentes sobre a longevidade ainda não explicam o problema das diferenças entre fêmeas e machos, satisfatoriamente.

AIGAKI & OHBA (1984, in LINTS & BOURGOIS, 1985) verificaram que, em *Drosophila virilis*, o período reprodutivo ocupa em média 60% da longevidade total e que a proporção dos períodos reprodutivo e pós-reprodutivo variam regularmente, dependendo da longevidade total. Se esta era mais curta do que 10 semanas, o período reprodutivo aumenta com a longevidade total, enquanto o pós-reprodutivo permanecia quase constante (menos de 2 semanas). Em moscas com longevidade maior que 10 semanas, o pós-reprodutivo aumentava, enquanto o reprodutivo era quase constante (8 semanas). Os resultados foram interpretados supondo que as moscas que morrem com mais de 10 semanas, morrem de velhice, enquanto as moscas que morrem antes da décima semana morrem de outras causas. O programa de vida só é aplicado no primeiro caso.

Alguns trabalhos dão ênfase ao controle epigenético da longevidade. Nesse sentido CELLUCI e cols. (1981, in LINTS & BOURGOIS, 1985) examinaram as alterações dos estádios do ciclo de *Drosophila melanogaster* por um agente fuccinolítico, a centrofenoxina. Um resultado interessante é que larvas criadas em meio contendo 0,05 a 1% de centrofenoxina apresentam, no estado adulto, um grande aumento da longevidade se forem mantidos, subsequentemente, em meio sem a substância. Não foram observadas, porém, mudanças significativas na duração do período larval.

No presente trabalho foi estudado o efeito da cafeína na longevidade de moscas virgens e acasaladas. Os re-



sultados mostraram que a longevidade média de fêmeas e machos virgens, ambos não submetidos ao tratamento com cafeína, não diferem significativamente. O tratamento com cafeína causa redução significativa da longevidade de ambos os sexos quando comparados com o respectivo controle.

A comparação das longevidades médias de fêmeas e machos virgens tratados, mostra que, de 7 casos de diferenças significativas, entre os 12 tipos de experimentos, em seis a longevidade média das fêmeas foi superior à dos machos, o que talvez possa estar relacionado com o fato indicado por vários trabalhos em *Drosophila*, e já mencionado, de que os machos são mais sensíveis do que as fêmeas às variações do meio.

De modo geral, porém, pode-se dizer que esses indivíduos de uma mesma espécie, são bastante variáveis, independentemente do sexo, quanto à sensibilidade à substância testada neste trabalho.

O estudo das moscas acasaladas controle, quanto à longevidade, mostra que a reprodução reduz esse parâmetro em ambos os sexos, mas mais fortemente nas fêmeas do que nos machos. Isto pode indicar um desgaste maior causado pelo esforço fisiológico da produção contínua de óvulos nas fêmeas fecundadas, determinando sua mortalidade precoce. CORRADI (1979) analisou as taxas de mortalidade de fêmeas e machos mantidos juntos ou separados, tendo verificado que a taxa de mortalidade das fêmeas era maior que a dos machos, quando mantidos juntos, enquanto na condição separada a mortalidade dos machos foi superior à das fêmeas.

O tratamento com cafeína reduz significativamente a longevidade das fêmeas acasaladas, em comparação com o controle, em apenas 1 dos 12 experimentos e aumenta significativamente a longevidade dos machos.



tivamente a longevidade em 4 experimentos e não significativa^u mente em 5. O tratamento com cafeína, no caso dos machos acasalados mostra diferença significativa em apenas dois tipos de experimentos quando comparados com o controle, sendo, em ambos os casos por redução. Talvez seja possível supor que o bloqueio da ovogênese causado pela cafeína represente uma economia de energia que, em última análise, pode beneficiar as fêmeas.

A comparação das longevidades médias entre fêmeas virgens e acasaladas e entre machos virgens e acasalados, todos tratados com cafeína, mostrou quatro diferenças significativas para as fêmeas com redução nas acasaladas em todos os casos, além de redução não significativa em todos os demais experimentos. Quanto aos machos, foram significativas cinco diferenças, sendo quatro devidas ao aumento da longevidade nos acasalados. Em todos os demais experimentos, embora não significativa, houve diferença devida ao aumento da longevidade nos acasalados.

Das comparações realizadas, pode-se deduzir que a redução da longevidade das fêmeas acasaladas tratadas, provavelmente, decorre mais do acasalamento do que do efeito da cafeína, na maioria dos casos, pelo menos. Nos machos, porém, o acasalamento parece, antes, minimizar, na maioria dos casos, os efeitos deletérios da cafeína.

Assim, como o acasalamento reduz a longevidade das fêmeas controle ao mesmo nível das tratadas ou até mais, em alguns casos, a hipótese de redução da produtividade pela cafeína por redução da longevidade pode ser descartada ou minimizada, reforçando como explicação, a hipótese de efeito deletério da cafeína na produção de ovos, na fecundação, ou no desenvolvimento do embrião.



O interesse no estudo citogenético das moscas submetidas aos tratamentos com cafeína decorreu das informações contidas na literatura sobre a propriedade dessa substância em induzir poliploidia (por exemplo, ESPINO & VASQUEZ, 1981), células binucleadas por inibição da citocinese e células germinativas tetraplóides mononucleadas por fusão nuclear (LA PEÑA e cols., 1981) e células binucleadas com cromatina fortemente dispersa (TERASAKA & NIITSU, 1987).

Foram analisadas células mitóticas dos gânglios cerebrais e células politênicas da glândula salivar. Não foram observadas diferenças visíveis, ao nível das observações realizadas, entre as moscas tratadas e as não tratadas. Talvez possam ser encontradas diferenças em outros tecidos que não os analisados no presente trabalho, tais como células meióticas e tecido adiposo ou túbulos de Malpighi, ou em indivíduos submetidos ao tratamento com cafeína durante várias gerações, ou mesmo utilizando outras doses de cafeína.

Também não foram encontrados indivíduos morfológicamente anormais embora a literatura contenha vários trabalhos que indicam que a cafeína atua como teratogênico, causando malformações quando administrada oralmente em ratos e humanos (SMITH e cols., 1987; BRUYERE e cols., 1988).

Os estudos de eletroforese em gel de poliacrilamida de isoenzimas esterásicas também não mostraram alterações do padrão dessas enzimas que possam ser atribuídas à cafeína, na fase do desenvolvimento analisada (adultos) e nas condições do presente experimento.

Como mostrado, entretanto, o presente trabalho sugere fortemente um efeito deletério da cafeína sobre a produtividade de imagos, a oviposição, a longevidade e a veloci-

dade de desenvolvimento, em *Drosophila prosaltans*. Maiores informações quanto à forma de ação deverão ser obtidos em experimentos adicionais que permitam avaliar algumas das hipóteses apresentadas.

Assim, a *Drosophila*, considerada um excelente instrumento para pesquisas de ação tóxica e mutagênica, e recomendada como tal, reforça, por este trabalho, que a cafeína é uma substância que merece maior consideração quanto a seus efeitos, tendo em vista principalmente ser de amplo consumo pela humanidade.



V - RESUMOS E CONCLUSÕES

Quatro concentrações de cafeína ($t_0=50$ $\mu\text{g/ml}$, $t_1 = 100$ $\mu\text{g/ml}$, $t_2 = 1000$ $\mu\text{g/ml}$ e $t_3 = 1500$ $\mu\text{g/ml}$) foram administradas a *Drosophila prosaltans*, objetivando detectar possíveis efeitos sobre a produtividade, a oviposição, a longevidade dos adultos, a velocidade do desenvolvimento ovo-adulto, o peso dos adultos, a morfologia dos cromossomos mitóticos e politênicos e as esterases.

Os resultados mostraram fundamentalmente o seguinte:

1. A cafeína, nas quatro concentrações utilizadas reduz a produtividade. Observa-se neste caso uma relação dose-efeito, isto é, quanto maior a concentração de cafeína no meio, maior a redução do número de descendentes.
2. Um dos grupos de experimentos de produtividade indicou que, além da redução, a cafeína pode determinar um atraso no início da mesma, uma vez que a porcentagem de descendentes relativa aos totais é geralmente menor nos primeiros tubos da série de repiques dos experimentos tratados do que nos primeiros tubos do controle.

3. A produtividade de machos nos experimentos tratados foi um pouco mais prejudicada do que a das fêmeas, indicando talvez uma maior sensibilidade daquele sexo aos efeitos da cafeína.
4. Verificou-se também que, geralmente, a transferência das moscas de um meio de maior concentração para um meio de menor concentração de cafeína determina um aumento da produtividade e que sua transferência para um meio de maior concentração do que do meio de origem determina uma redução da mesma, quando comparadas com a produtividade das que permaneceram nos meios de origem.
5. A velocidade de desenvolvimento ovo-adulto das moscas criadas nos meios controle, t_0 e t_1 não diferiu entre si, sendo em média de 24 dias, enquanto nas moscas criadas nos meios t_2 e t_3 foi em média de 25 dias, mostrando assim um retardo no desenvolvimento, às concentrações de 1000 e 1500 $\mu\text{g/ml}$ de cafeína no meio, talvez envolvido com o DNA e a reprodução celular.
6. Moscas criadas em meio controle e colocadas para por ovos em meio com cafeína mostraram redução no número de ovos de for



ma direta, isto é, quanto maior a concentração de cafeína no meio, maior a redução. Da mesma forma, fêmeas criadas nos 4 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. E quando submetidas a um teste de livre-escolha para ovipositar nos meios com ou sem cafeína, as fêmeas criadas no meio controle preferiram meio com cafeína mas apresentaram redução do número de ovos, tanto no meio com como no meio sem cafeína. Para explicar, admitiu-se que o meio com cafeína exerça uma atração sobre as moscas, que a ele se dirigem, preferencialmente, alimentando-se dele; porém, a cafeína ingerida exerceria um efeito bloqueador na produção de novos folículos, atrasando ou reduzindo a oviposição.

7. A longevidade foi analisada em fêmeas e machos virgens e acasalados, em ambos os casos tratados com cafeína ou não. A longevidade média de fêmeas e machos virgens não tratados não diferiu significativamente embora a das primeiras tenha sido ligeiramente superior (60 a 58 dias). Em ambos os sexos tratados com cafeína houve redução da longevidade, embora não proporcional à concentração de cafeína no meio. O acasa-

lamento reduziu a longevidade de fêmeas e machos controle, mas mais acentuadamente das primeiras do que dos segundos. Isto pode indicar um desgaste maior causado pelo esforço fisiológico da produção contínua de óvulos, nas fêmeas fecundadas, determinando sua mortalidade precoce. Em alguns experimentos tratados, as fêmeas apresentaram longevidades maiores do que o controle sugerindo talvez um benefício causado pelo bloqueio da oviposição pela cafeína.

8. A pesagem das moscas tratadas e não tratadas mostrou que a introdução de cafeína no meio de cultura não reduz o peso médio das moscas fêmeas e machos quando comparadas com o respectivo controle. Ao contrário, um pequeno aumento ocorreu, para fêmeas e machos, nas concentrações t_0 e t_3 .
9. Não foram observadas diferenças, visíveis ao nível das observações realizadas, entre as moscas tratadas e controle, quanto à morfologia dos cromossomos mitóticos e politénicos.
10. Os resultados do estudo das esterases das moscas adultas tratadas e controle, em géis de poliacrilamida, não indicaram alterações do padrão de bandas, causadas pelo tratamento com cafeína.

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Four different concentrations of caffeine ($t_0 = 50 \mu\text{g/ml}$, $t_1 = 100 \mu\text{g/ml}$, $t_2 = 1000 \mu\text{g/ml}$ e $t_3=1500 \mu\text{g/ml}$) were administered to *Drosophila prosaltans*, aiming to detect the possible effects on productivity, oviposition, longevity of adults, rate of development egg-adult, weight of adults, morphology of mitotic and polytene chromosomes and esterases.

The results showed mainly the following:

1. Caffeine in the four analyzed concentrations decreases the productivity of progeny. A relation dose-effect was observed, that is, the greater the caffeine concentration in the culture medium, the greater the reduction in the number of descendants.
2. Changing the flies grown in a culture medium of greater caffeine concentration to a culture medium with lower caffeine concentration, an increase of the productivity is observed. The opposite was also true.
3. The productivity of males in the treated experiments was a little more impaired by caffeine than the productivity of females, denoting a possible greater sensitivity of

the first mentioned sex to the effects of this drug.

4. One of the experimental groups on productivity suggested that, besides reducing the progeny number, caffeine may cause a delay in the start of reproduction, since the percentage of progeny in the first tubes relative to the total progeny was smaller in the treated experiments than in the control ones.
5. The rate of development egg-adult of flies grown in the control medium and in **t0** and **t1** media was the same, being equal to 24 days, on the average, while that of flies grown in the **t2** and **t3** media was on the average equal to 25 days. Thus, the results show that caffeine in the concentration of 1000 $\mu\text{g/ml}$ and 1500 $\mu\text{g/ml}$ of culture medium causes a delay in the development process, perhaps involved with DNA and cell reproduction.
6. Flies grown in the control culture medium and later put to lay eggs in the media with caffeine showed a decrease in the number of eggs layed in a normal way, that is, the great the caffeine concentration, the greater the decrease of egg number.



Also females grown in the 4 concentrations of caffeine and them, put to lay eggs in the control medium showed a decrease in the number of eggs, following directly the caffeine concentration in the growth medium. When submitted to a free choice test to lay eggs in the control medium or in the caffeine medium, the females grown in the control medium showed preference for the medium with caffeine. However, the number of eggs layed decreased in both the control and the caffeine media. It was supposed that the caffeine media attracts the flies preferentially and that the caffeine eaten by them blocks the production of new follicles delaying or reducing the number of eggs.

7. The longevity of virgin and crossed males and females grown in the control and in the treated media was analysed. The mean longevity of virgin, control males and females dit not differ significantly although in the females it was slightly greater than in the males (respectively 60 and 58). The longevity of both treated, virgin males and females was reduced in comparison to the controls, but the reduction did not follow the caffeine concentration in the media. Crossing



reduced the longevity of the control males and females but more strongly of the latter. This may indicate a greater weakening caused by the effort of continuous production of eggs by the fertilized females, leading to the shortening of their longevity. In some treated experiments, the females showed greater longevity than their controls, suggesting a possible benefit brought about by the blockage of egg production caused by caffeine.

8. The weighing of the control and the treated flies did not show any effect of the caffeine in reducing the mean weight of adults. On the contrary, a small increase of the weight of males and females was detected in the concentration t_0 and t_3 .
9. Mitotic and polytene chromosome of the control and treated flies from different concentrations of caffeine were examined but no morphological change was detected which could be ascribed to the drug.
10. The esterases of the adult, treated and control flies were studied in polyacrilamide gels but also in the case no change in the banding pattern was found which could be caused by caffeine.



VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, H.Y.; KARAKI, H. & URAKAWA, N. Inhibitory effects of caffeine on contractions and calcium movement in vascular and intestinal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 93: 267-274, 1988.
- ASHBURNER, M. & WRIGHT, T.R.F. *The Genetics and Biology of Drosophila*, Volume 2d, Academic Press INC. (London) LTD, 1980, 702p.
- ATHERTON, D. & GALL, J. Salivary gland squashes for in situ nucleic acid hybridization studies. *Drosophila Inf. Serv.* 49: 131-133, 1972.
- BALACHANDRAN, R. & SRINIVASAN, A. Caffeine inhibits DNA polymerase I from *Escherichia coli*: studies in vitro. *Carcinogenesis*, 3(2): 151-153, 1982.
- BARD, M.; NEUHAUSER, J.L. & LEES, N.D. Caffeine resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 141: 999-1002, 1980.
- BICUDO, H.E.M. de C. Chromosomal polymorphism in the saltans group of *Drosophila*. I. The saltans subgroup. *Genetica* (Holanda), 44:520-552, 1973a.
- BICUDO, H.E.M. de C. Reproductive isolation in the saltans group of *Drosophila*. I. The saltans subgroup. *Genetica* (Holanda), 44:313-329, 1973b.



- BICUDO, H.E.M.de C. Estudo citogenético de espécies de *Drosophila* do complexo mulleri (Grupo saltans) com ênfase à regulação da atividade organizadora nucleolar. pp. 202, IBILCE, UNESP, 1979.
- BICUDO, H.E.M. de C.; HOSAKI, M.K.; MACHADO, J. & MARQUEZ, M. C.N. Chromosomal polymorphism in the Saltans Group of *Drosophila*. II. Further study on *D.prosaltans*. *Genetica* (Holanda), 48:5-15, 1978.
- BOURNIAS-VARDIABASIS, N. & TEPLITZ, R.L. Use of *Drosophila* embryo cell cultures as an in vitro teratogen assay. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 2: 333-341, 1982.
- 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*, 8(1): 9-13, 1988.
- CERON, C.R. Padrão de esterases no desenvolvimento de *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos. (Tese de Doutorado), USP, São Paulo, 1988.
- CERON, C.R. & SANTOS, J.R. A method for drying polyacrylamide slab gels. *Arq. Biol. Tecnol.*, 31(1): 232, 1988.
- CHAUDHURI, M.M. & GHOSH, S. Effect of caffeine on macromolecular synthesis in *Sarcoma-180* mouse ascites cells. *Indian Journal of Experimental Biology*, 20:433-436, 1982.



- CHINNICI, J.P. & BETTINGER, D.A. Effects of aflatoxin B1 and caffeine on viability in natural strains of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 44:263-266, 1984.
- COLLINS, T.F.X.; WELSH, J.J.; BLACK, T.N.; WHITBY, K.E. & O'DONNELL, M.W. Jr. Potential reversibility of skeletal effects in rats exposed in utero to caffeine. *Ed. Chem. Toxic.*, 25(9): 647-662, 1987.
- CORRADI, M.A.S. Esforço reprodutivo e idade em populações experimentais de *Drosophila hydei* (Tese de Doutorado), USP, São Paulo, 1979.
- 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*. 107(2): 465-476, 1983.
- DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins. *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 121:404-427, 1964.
- DÄVRING, L. Effects of a 2,4,5-T ester on early oogenesis, fertility and development in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas*, 80: 255-262, 1975.
- 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*, 84:91-99, 1981.

- DEMEREK, M. & KAUFMANN, B.P. *Drosophila Guide*. The Lord Baltimore Press, Baltimore, Maryland, 1945.
- 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*, 82:295-304, 1981.
- ESPINO, F.J. & VASQUEZ, A.M. Chromosome numbers of *Saintpaulia ionantha* plantlets regenerated from leaves cultured in vitro with caffeine and colchicine. *Euphytica*, 30:847-853, 1981.
- FOERSTER, R.E. & WÜRGLE, F.E. In vitro studies on the metabolism of aflatoxin B1 and aldrin in testes of genetically different strains of *Drosophila melanogaster*. *Arch. Toxicol.*, 56:12-17, 1984.
- GOULD, A.B. & CLARK, A.M. Behavior of life-shortening genes in genetic mosaics of *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 23:1-10, 1983.
- GRIFFITHS, R.R. & WOODSON, P.P. Reinforcing properties of caffeine: Studies in humans and laboratory animals. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 29:419-427, 1988.
- HALDANE, J.B.S. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *J. Genet.* 12:101-109, 1922.
- HERNÁNDEZ, P.; MINGO, R.; GONZALEZ-FERNANDEZ, A. & LOPEZ-SAEZ, J.F. Relationship of chromosomal damage induced by caffeine to growth temperature and ATP level in proliferating cells. *Mutation Research*, 164:327-333, 1986.



- HOLTZMAN, S.G. & FINN, I.B. Tolerance to behavioral effects of caffeine in rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 29: 411-418, 1988.
- JOHNSON, F.M. ; KANAPI, C.G.; RICHARDSON, R.H.; WHEELER, M.R. & STONE, W.S. XVIII. An operational classification of *Drosophila* esterases for species comparison. *Univ. Texas Publ.*, 6615: 517-532, 1966.
- KAWANO, T. & SIMÕES, L.C.G. Morphogenetic effects of caffeine on *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata, Planorbidae). *Developmental Biology*, 90(3): 281-302, 1987.
- KIHLMAN, B.A. Effects of caffeine on the genetic material. *Mutation Research*, 26: 53-71, 1974.
- KIHLMAN, B.A. ; HANSSON, K. & ANDERSSON, H.C. The effects of post-treatments with caffeine during S and G2 on the frequencies of chromosomal aberrations induced by thiotepa in root tips of *Vicia faba* and in human lymphocytes in vitro. *Mutation Research*, 104: 323-330, 1982.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- LA PEÑA, A.; PUERTAS, M.J. & MERINO, F. Bimeiosis induced by caffeine. *Chromosoma*, 83(2): 241-248, 1981.
- LÉGER, L. La caffeine, um insecticide? *La Recherche*, 16 (165): 554-555, 1985.
- LINTS, F.A. & BOURGOIS, M. Aging and lifespan in insects with special regard to *Drosophila*: Review 1982-1984. *Review of Biological Research in Aging*, 2:61-84, 1985.
- LOPRIENO, N.; BARALE, R. & BARONCELLI, S. Genetic effects of caffeine. *Mutation Research*, 26: 83-87, 1974.

- MACPHEE, D.G. & LEYDEN, M.F. Effects of caffeine on ultraviolet-induced base-pair substitution and frameshift mutagenesis in *Salmonella*. *Mutation Research*, 143:1-3, 1985.
- MULLER, H.J. Bearings of the *Drosophila* work on systematics. In: HUSLEY, J.S. ed., The new systematics. Oxford, Clarendon Press, 1940, p. 185-268.
- NATHANSON, J.A. Caffeine and related methylxanthines: Possible naturally occurring pesticides. *Science*, 226(4671): 184-187, 1984.
- NEI, M. *Molecular population genetics and evolution*. Amsterdam, North-Holland Publishing CO, 1975.
- NICOLETTI, B. An efficient method for salivary gland chromosome preparations. *Drosophila Inf. Serv.*, 33: 181-182, 1959.
- NÖTHEL, H. & ABDALLA, H.I. Investigations on radiosensitive and radioresistant population of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 92(1): 123-132, 1982.
- 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*, 81:75-80, 1981.
- PALADINO, A.P. & CAVOLINA, P. Caffeine effects on tumor manifestation in the tu-pb stock of *D.melanogaster*. *Drosophila Information Service*, 60: 83-84, 1984.
- * 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*, 22: 1-15, 1987.
- SANDLIE, I. & KLEPPE, K. Effect of caffeine on nucleotide pools in *Escherichia coli*. *Chem. Biol. Interactions*, 40: 141-148, 1982.
- SCHOFF, P.K. & LARDY, H.A. Effects of fluoride and caffeine on the metabolism and motility of ejaculated bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 37:1037-1046, 1987.
- SCOTT, N.R.; STAMBUK, D.; CHAKRABORTY, J.; MARKS, V. & MORGAN, M.Y. Caffeine clearance and biotransformation in patients with chronic liver disease. *Clinical Science*, 74:377-384, 1988.
- SEALE, T.W.; JOHNSON, P.; RODERICK, T.H.; CARNEY, J.M. & RENNERT, O.M. A single gene difference determines relative susceptibility to caffeine-induced lethality in SWR and CBA inbred mice. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 23:275-278, 1985.
- SEHGAL, S.S. & SIMÕES, L.C.G. Preliminary results on the effects of neurotropic drugs on *Drosophila melanogaster*. *Ciência e Cultura*, 28(8): 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.*, 21: 174-181, 1977.
- SMITH, S.E.; McELHATTON, 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.*, 25(2): 125-133, 1987.



SRINIVASAN, A.; REDDY, E.P.; SARMA, P.S. & SCHULZ, R.A.

Inhibition of RNA-dependent DNA polymerase activity of oncornaviruses by caffeine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 91(1): 239-246, 1979.

STAVRIC, B.; KLASSEN, R.; WATKINSON, B.; KARPINSKI, K.;

STAPLEY, R. & FRIED, P. Variability in caffeine consumption from coffee and tea: possible significance for epidemiological studies. *Fd. Chem. Toxic.*, 26(2):111-118, 1988.

STEINER, W.W.M. & JOHNSON, W.E. Techniques for electrophoresis of Hawaiian *Drosophila*. *US International Biological Program. Island Ecosystems IRP. Tech. Report*, 30:1-21, 1973.

STUDIER, W.F. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J. Mol. Biol.* 79:237-248, 1973.

TADEI, W.P. Estudo cromossômico, do isolamento reprodutivo e do Estado-de-ser-adaptado de populações experimentais de *Drosophila prosaltans* e *Drosophila saltans* (Tese de Doutorado) - USP, São Paulo, 1977.

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

TERESAKA, O. & NIITSU, T. Unequal cell division and chromatin differentiation in pollen grain cells. I. Centrifugal, cold and caffeine treatments. *Botanical Magazine Tokyo*. 100: 205-216, 1987.

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

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.* 51 (12): 3281-3286, 1987.



