

Efeito anticarcinogênico dos flavonoides do tipo antocianina presentes em amora-preta (*Rubus* spp.), identificado por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*wts*) em *Drosophila melanogaster*

*Anticarcinogenic effect of anthocyanin type flavonoids found in blackberry (*Rubus* spp.), identified by the test for detection of epithelial tumor clones (*wts*) in *Drosophila melanogaster**

Monique Danielle Magalhães¹, Álisson Duarte Maciel¹, Priscila Capelari Orsolin²

Resumo

Introdução: A amora-preta (*Rubus* spp.), fruto pertencente à família Rosacea, gênero *Rubus*, forma um grupo diverso e bastante difundido, para o qual se estima existir entre 400 e 500 espécies. Entre os compostos abundantes na amora-preta encontram-se os flavonoides, especificamente da classe das antocianinas, pigmentos vegetais responsáveis pela coloração escura do pseudofruto. Nos últimos anos o interesse por esses pigmentos se intensificou, uma vez que pesquisas têm demonstrado que as antocianinas são compostos bioativos e que possuem capacidade antioxidante, entre vários outros efeitos farmacológicos. **Objetivo:** Avaliar o potencial anticarcinogênico da amora-preta por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*wts*) em *Drosophila melanogaster*. **Método:** Foram preparadas três soluções aquosas de amora-preta, nas proporções de 25%, 50% e 100%. Nessas soluções foram cultivadas *Drosophilas* expostas anteriormente à doxorrubicina na concentração de 0,4 mM, agente conhecidamente cancerígeno, também utilizado como controle positivo na presente pesquisa. Para controle negativo foi utilizada água de osmose reversa. O tratamento foi realizado com todas as larvas descendentes do cruzamento de fêmeas *wts/TM3* com machos *mwh/mwh*. **Resultados:** Os resultados mostraram que a amora-preta apresenta potencial anticarcinogênico estatisticamente significativo nas proporções de 50% e 100%, visto a diminuição da frequência de tumores nessas proporções em relação à frequência registrada no controle positivo. **Conclusões:** Concluímos, portanto, que nestas condições experimentais, a solução aquosa de amora-preta apresenta efeito protetor em relação à ação carcinogênica da doxorrubicina em *Drosophila melanogaster*. Ressaltamos, entretanto, a necessidade de novos estudos com maiores amostras e outros modelos experimentais para se chegar a resultados mais conclusivos.

Palavras-chave: *Rubus*, *Drosophila melanogaster*, antineoplásicos.

1. Acadêmicos de Medicina do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM)

2. Graduada em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), mestre e doutora em Genética e Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

E-mail do primeiro autor: monique@live.ru

Abstract

Introduction: The blackberry (*Rubus* spp.), a fruit belonging to the Rosacea family, *Rubus* genus, composes a diverse and widespread group, in which is estimated the existence of 400 to 500 species. Among the copious compounds in the blackberry are the flavonoids, specifically of the class of anthocyanins, plant pigments responsible for the dark coloring of the fruit. In recent years, interest in these pigments has intensified, seeing that research has shown that anthocyanins are bioactive compounds and have antioxidant capacity, among several other pharmacological effects.

Objective: To evaluate blackberry's anticarcinogenic potential, through the test for detection of epithelial tumor clones (*wts*) in *Drosophila melanogaster*. **Method:** Three aqueous solutions of blackberry were prepared in the proportions 25%, 50% and 100%. In these solutions were cultivated *Drosophilas* previously exposed to doxorubicin at a 0.4 mM concentration, admittedly carcinogenic agent, which was also used for positive control in the present research. For negative control reverse osmosis water was used. The treatment was performed on all larvae descendant of the crossing of females *wts/TM3* with males *mwh/mwh*. **Results:** The results showed that blackberry has an anticarcinogenic potential statistically significant in the proportions of 50% and 100%, considering the decrease in tumor frequency in these proportions in relation to the frequency registered in the positive control group. **Conclusions:** We conclude that, under these experimental conditions, the aqueous solution of blackberry has a protective effect against the carcinogenic action of doxorubicin in *Drosophila melanogaster*. We emphasize, however, the need for new studies with larger samples and other experimental models to achieve more conclusive results.

Keywords: *Rubus*, *Drosophila melanogaster*, antineoplastic agents.

Introdução

A busca e o uso de plantas com propriedades terapêuticas é uma atividade que vem de geração a geração, descrita com o intuito de preservar a tradição milenar e atestada em vários tratados de fitoterapia.¹ Apesar da cultura do medicamento como fator determinante no tratamento, segundo Argenta *et al.*², as plantas são usadas como o único recurso terapêutico de uma parcela da população brasileira e de mais de 2/3 da

população do planeta. Diversos estudos têm relatado a importância de pigmentos naturais que exercem efeito protetor e/ou inibidor de doenças degenerativas.³

Os flavonoides da classe antocianinas são pigmentos vegetais responsáveis pelas cores laranja, azul, roxa e tonalidades de vermelho e violeta encontrada em flores, frutos, folhas, caules e tubérculos de plantas. Plantas medicinais e condimentares que contêm flavonoides são usadas há milhares de

anos na medicina oriental.⁴ Para Kähkönen e Heionen,⁵ nos últimos anos, o interesse por esses pigmentos se intensificou, uma vez que pesquisas têm demonstrado que as antocianinas e suas respectivas agliconas são compostos bioativos e que possuem capacidade antioxidante, entre vários outros efeitos farmacológicos.

A amora-preta (*Rubus* spp.) pertence à família Rosaceae, gênero *Rubus* e forma um grupo diverso e bastante difundido, para o qual se estima existir entre 400 a 500 espécies.⁶ Alguns estudos já foram realizados para testar a atividade anticarcinogênica da amora-preta. Em pesquisas utilizando linhagens de células cancerígenas humanas, a amora-preta apresentou valores promissores.⁷

Trata-se de um pequeno pseudofruto de clima temperado, possui coloração variando do vermelho púrpura ao azul, devido ao elevado teor de antocianinas.³ É uma planta rústica que apresenta baixo custo de produção, facilidade de manejo, requer pouca utilização de defensivos agrícolas, sendo, por isso, uma alternativa promissora para cultivo na agricultura familiar.⁸

A ingestão de amora-preta pode, também, atenuar processos cerebrais degenerativos. Os metabólitos da sua digestão protegem células neuroblásticas da morte induzida por HP2 em níveis baixos e não tóxicos, próximos das concentrações séricas normalmente encontradas.⁹ Devido à estrutura

frágil da *Rubus* e sua alta atividade respiratória, a vida pós colheita é relativamente curta. Por isso, a importância de sua utilização também nas formas industrializadas, como geleias, sucos, sorvetes e polpas.^{10,11,8}

As moscas-das-frutas do gênero *Drosophila* se enquadram na família Drosophilidae, ordem Diptera, classe Insecta. O gênero vem sendo utilizado em estudos de genética desde 1906, quando foi eleito como animal experimental para pesquisas nessa área. Após isso, iniciaram-se experimentos de ligação realizados por Morgan¹² com *Drosophila melanogaster*, principalmente devido à fácil detecção de vários mutantes. Desde então, diversos trabalhos têm sido realizados com várias das cerca de 2.500 espécies conhecidas de *Drosophila*.¹³

Em estudos com células JB6 (células da epiderme de ratos) pré-tratadas com cianidina-3-glicosídeo, proveniente da amora-preta, houve inibição da ativação e expressão de diversas enzimas (como as enzimas kinases) e fatores envolvidos no processo de formação do câncer de pele pela ação de raios UV-B. O mesmo composto também inibiu a proliferação celular da linhagem A549 de câncer de pulmão.¹⁴ Entretanto, até o presente momento, não existem estudos destinados à avaliação do potencial anticarcinogênico ou carcinogênico da amora-preta em *Drosophila melanogaster*.

As neoplasias malignas constituem-se a segunda causa de morte na população desde 2003, representando aproximadamente 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados no Sistema de Informações Sobre Mortalidade.¹⁵ Segundo Santos e Cruz (2001),¹⁶ a terapia nutricional com antioxidantes concomitante à administração de drogas antineoplásicas apresenta vários benefícios ao tratamento de pacientes oncológicos. A oferta de vitaminas antioxidantes como a A, E e C associada a essas drogas resulta em menores efeitos colaterais e permite que a continuidade do tratamento empregado não seja prejudicada, pois a toxicidade causada pelas drogas antineoplásicas é fator limitante desta terapia.

Diante do exposto, este estudo objetivou avaliar o efeito anticarcinogênico da amora-preta (*Rubus* spp.), por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*, observando a frequência de clones de tumores manifestados nesse organismo.

Métodos

Agente químico: Doxorrubicina – DXR

Como agente indutor de tumor e controle positivo foi utilizada a DXR, comercializada como Adriblastina®. A mesma é produzida pelo laboratório Pfizer sob a forma de pó liofilizado injetável de 50mg em embalagem contendo 1 frasco-ampola (Farmacêutico responsável José

Cláudio Bumerad. CRF-SP nº 437146).¹⁷ O referido composto foi utilizado na concentração de 0,4 mM, utilizando água osmose reversa como solvente para preparação.¹⁸

Teste para detecção de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster*

Para realização do teste *wts* (*warts*) foram utilizadas duas linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*: *wts* e *mwh*, portadoras dos marcadores genéticos *warts* (*wts*, 3-100) e *multiple wing hairs*, (3-03). A linhagem *wts* foi fornecida pelo Bloomington *Drosophila* Stock Center, da Universidade de Indiana nos Estados Unidos (USA), registrado sob o número: Bloomington/7052. Já a linhagem *mwh/mwh* foi cedida pelo Dr. Ulrich Graf (Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Science, ETH Zurich, Schwerzenbach, Switzerland).

Os estoques destas linhagens são cultivados no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM, mantidas em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura de *D. melanogaster*. Esse meio é composto por 820 mL de água; 25g de fermento; 11 g de ágar; 156 g de banana e 1g de nipagin. As linhagens são conservadas dentro de uma incubadora B.O.D. 411 D, a uma temperatura em torno de 25° C e 60% de umidade.¹⁸

Cruzamento e coleta de ovos

Para a realização dos cruzamentos, os machos e as fêmeas foram acondicionados em frascos contendo meio de cultura próprio para postura, onde as fêmeas depositaram seus ovos (após acasalamento). Para obtenção de larvas heterozigotas de 72 horas (*wts +/+ mwh*) foi realizado o cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3, Sb1* com machos *mwh/mwh*. As larvas descendentes deste cruzamento foram tratadas com amora-preta em três diferentes concentrações: 25%; 50% e 100%. As concentrações foram preparadas a partir da polpa congelada vendida comercialmente. Considerou-se a polpa pura como a concentração máxima (100%) e foram realizadas diluições com água de osmose reversa a fim de se formar soluções com concentrações de 50% e 25%.

A coleta dos ovos descendentes dos cruzamentos entre fêmeas virgens *wts/TM3, Sb1* com machos *mwh/mwh*, ocorreu durante um período de 8 horas, em frascos contendo meio de cultura próprio para postura, uma base sólida de ágar e uma camada de fermento biológico suplementado com sacarose.¹⁸

Tratamento

Larvas de 3º estágio foram submetidas a um tratamento crônico, por um período de, aproximadamente, 48 horas (quando sobem às paredes dos frascos). Estas larvas foram colocadas em frascos de vidro contendo 1,5 g

de purê de batatas (meio alternativo para *Drosophila melanogaster*) e 5 mL de amora-preta nas três diferentes concentrações testadas, controle positivo e controle negativo. Para controle positivo foi utilizada a DXR (0,4 mM) e, para controle negativo, água de osmose reversa.¹⁸

Metade das larvas foi submetida a um esquema de cotratamento (tratamento associado e simultâneo) com a DXR e as diferentes concentrações de amora-preta testadas, visando identificar o efeito na redução de danos induzidos pela DXR.

Análise das moscas

Após o tratamento, todas as moscas foram coletadas e armazenadas em frascos devidamente identificados, contendo etanol a 70%. Posteriormente, elas foram colocadas em placa escavada contendo glicerina e analisadas numa lupa estereoscópica para visualização e contagem da presença de tumores, com auxílio de um pincel para manusear as moscas, de acordo com a descrição de Justice *et al.*¹⁹

Embora todas as moscas tenham sido coletadas, somente as moscas adultas de pelos longos e finos, portadoras do balanceador cromossômico (*TM3, Sb1*), foram analisadas. As moscas adultas que apresentaram pelos curtos e grossos foram descartadas, uma vez que não possuíam o gene em estudo.

Para registrar a frequência de tumores foi utilizada uma planilha padrão, que separa quantitativamente a incidência de tumores nas regiões do olho, cabeça, asa, corpo, perna, halteres e o total por mosca, em cada concentração testada.

Análise estatística

As diferenças estatísticas, entre as frequências de tumores das concentrações testadas e os controles foram calculadas utilizando o teste U, não paramétrico, de Mann-Whitney, empregando o nível de significância $< 0,05$.²⁰

Resultados e discussão

Os resultados encontrados demonstram efeito anticarcinogênico significativo nas concentrações de amora 100% e 50%. Na concentração de 25% houve redução do número de tumores, no entanto a diferença não foi estatisticamente significativa. Na concentração 100% houve uma redução ainda maior de tumores quando comparado ao controle positivo, o que reflete que o efeito é dose dependente. A frequência de tumores de acordo com as concentrações pode ser observada na Tabela 1.

No controle negativo, onde água de osmose reversa foi utilizada, observa-se uma frequência de 0,19 tumores por mosca. Essa pequena indução pode ser explicada pela predisposição genética que as moscas têm de

desenvolver tumores. No controle positivo foi utilizado DXR, em que foi observada frequência de 0,90 tumores por mosca, constatando a diferença significativa do controle positivo em relação ao negativo de acordo com o Teste de Mann-Whitney, com nível de significância acima de 5%.

As moscas que não foram submetidas ao cotratamento com DXR, mas foram expostas a solução de amora (isoladamente), nas concentrações de 25%, 50% e 100%, apresentaram frequências de 0,17, 0,12 e 0,21 tumores por mosca, respectivamente. Este resultado aponta que a amora-preta, quando comparada ao controle negativo, não induziu uma quantidade de tumores, estatisticamente significativa, para ser considerada carcinogênica.

No tratamento associado (amora-preta + DXR) observaram-se frequências de tumores de 0,55; 0,38; 0,23 nas concentrações de 25%, 50% e 100%, respectivamente. Pode-se observar que os valores são menores em comparação ao controle positivo, principalmente nas concentrações de 50% e 100%, onde os valores foram considerados significativos. Na concentração de 25%, apesar de notar-se uma redução no número de tumores por mosca, esse valor não foi estatisticamente significativo. Tais resultados evidenciam que a amora-preta reduziu danos induzidos pela DXR em células de *D. melanogaster*.

Tabela 1 - Frequência de clones de tumores observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, tratada com doxorubicina (controle positivo), água osmose reversa (controle negativo) e diferentes concentrações de amora-preta.

Tratamentos			Número de tumores analisados							Frequência (Nº de tumores/mosca)
Amora (%)	DXR (mM)	Número de moscas analisadas	Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter	Total	
0	0	200	6	2	8	17	5	0	38	0,19
0	0,4	200	3	11	98	39	28	1	180	0,90 *
25	0	200	1	1	16	11	4	0	33	0,17 ns*
50	0	200	0	7	1	4	12	0	24	0,12 ns*
100	0	200	0	3	7	20	11	0	41	0,21 ns*
25	0,4	200	0	9	51	31	18	0	109	0,55 ns**
50	0,4	200	1	5	23	28	19	0	76	0,38 **
100	0,4	200	1	3	24	13	5	0	46	0,23 **

Teste de Mann-Whitney. Nível de significância $P \leq 0,05$

* Valor considerado diferente do controle negativo ($P \leq 0,05$).

** Valor considerado diferente do controle positivo (DXR 0,4 mM) ($P \leq 0,05$).

ns*, valores considerados não significativos, quando comparados com o controle negativo.

ns**, valores considerados não significativos, quando comparados com o controle positivo.

DXR, doxorubicina.

A DXR tem seu mecanismo de ação baseado na intercalação com a molécula de DNA (causando ruptura de filamento único e filamentos duplos), bem como pela produção de radicais livres de semiquinona e oxigênio altamente reativos e tóxicos.²¹

Embora os mecanismos pelos quais a amora-preta reduziu danos ao DNA, induzidos pela DXR, não tenham sido

diretamente avaliados nesta pesquisa, acredita-se que possam estar associados ao efeito antioxidante das antocianinas presentes nesse pseudofruto. Segundo Prior (2003),²² as antocianinas possuem uma estrutura química adequada para a ação antioxidante, sendo capazes de doar elétrons ou átomos de hidrogênio para radicais livres, neutralizando essas substâncias danosas ao organismo.

Estudos mostram que o consumo de frutas e hortaliças ricas em compostos bioativos podem prevenir vários tipos de doenças crônicas não transmissíveis.²³

Os resultados obtidos na presente pesquisa, evidenciando efeito anticarcinogênico da amora-preta, corroboram com resultados obtidos em outros estudos envolvendo organismos teste e procedimentos experimentais diferentes. Ding *et al.* (2006)¹⁴ ao avaliarem a atividade anticarcinogênica *in vivo* da amora-preta, observaram que a antocianina cianidina-3-glicosídeo, proveniente desse pseudofruto, reduz o número de tumores malignos e não malignos na pele de ratos, previamente tratados para desenvolver tais tumores. Esse composto também, em ratos desprovidos de pelos, reduziu o tamanho desses tumores e inibiu metástases e a invasão de novos tecidos.

Os extratos de amora-preta apresentam um grande potencial na prevenção e combate ao câncer, e já foi demonstrada supressão significativa da mutagênese induzida por ultravioleta-C (UV-C) em *Salmonella typhimurium*²⁴. Algumas frações do extrato de amora-preta têm, também, a capacidade de inibir a enzima hialuronidase e, quando comparadas com aspirina, demonstra efeitos anti-inflamatórios mais pronunciados.²⁵

Segundo Vizzotto,²³ o extrato aquoso de amora-preta inibe a atividade de enzimas metaloproteinases, podendo, assim, interferir

na etapa de progressão do câncer, haja vista que a expressão anômala dessas enzimas contribui para metástases de câncer, servindo como um mecanismo para invasão tecidual.

Conclusão

Nas presentes condições experimentais o extrato da polpa de amora-preta (*Rubus* spp.) apresentou efeito protetor em relação à ação carcinogênica da doxorrubicina em *D. melanogaster*, uma vez que houve redução significativa na frequência de tumores nos indivíduos cotratados com amora-preta e doxorrubicina.

Ressalta-se a necessidade de novos estudos com maiores amostras e outros modelos experimentais para se chegar a resultados mais robustos.

Referências

1. Correa Junior C, Ming LC, Scheffer MC. Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas. 2ª ed. Jaboticabal: Ed. Jaboticabal/FUNEP; 1994.
2. Argenta SC, Argenta LC, Giacomelli SR, Cezarotto VS. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. *Vivências*. 2011; 7(12): 51-60.
3. Ferreira DS, Rosso VV, Mercadante AZ. Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus* spp.). *Rev Bras Frutic*. 2010; 32(3):664-674.

4. Andersen OM, Jordheim M. The anthocyanins. In: Andersen OM, Markham KR. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton: CRC Press; 2006. 471-553.
5. Kähkönen MP, Heinonen M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. J Agric Food Chem. 2003; 51(3): 628-633.
6. Jepson RG, Craig JC. The American heritage science dictionary. 1st ed. North America: Houghton Mifflin Company; 2005.
7. Seeram NP, Adams LS, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller HS, et al. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. J Agric Food Chem. 2006; 54(25): 9329-9339.
8. Mota RV. Caracterização física e química de geleia de amora-preta. Ciênc Tecnol Aliment. 2006;26(3): 539-543.
9. Tavares L, Figueira I, Macedo D, McDougall GJ, Leitão MC, Vieira, HLA, et al. Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. Food Chem. 2012; 131(4): 1443-1452.
10. Agar IT, Streif J, Bangerth F. Effect of CO₂ and controlled atmosphere (CA) on the ascorbic and dehydroascorbic acid content of some berry fruits. Postharvest Biol Tec. 1997; 11(1): 47-55.
11. Antunes LEC. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. Cienc Rural. 2002; 32(1):151-158.
12. Morgan TH. Sex-limited inheritance in *Drosophila*. Science. 1910; 32(812): 120-122
13. Wheeler MR. The *Drosophilidae*: a taxonomic overview. In: Ashburner M, Thompson JN, Carson HL. The Genetics and Biology of *Drosophila*. 3th ed. London: Academic Press; 1981.
14. Ding M, Feng R, Wang SY, Bowman L, Lu Y, Qian Y, et al. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. J Biol Chem. 2006; 281(25): 17359-17368.
15. Rohenkohl CC, Carniel AP, Colpo E. Consumo de antioxidantes durante tratamento quimioterápico. ABCD arq bras cir dig. 2011; 24(2): 107-112.
16. Santos HS, Cruz WMS. A Terapia Nutricional com Vitaminas Antioxidantes e o Tratamento Quimioterápico Oncológico. Revista Brasileira de Cancerologia. 2001; 47(3): 303-308.
17. Adriblastina® RD (cloridrato de doxorubicina). Responsável técnico: José Cláudio Bumerad. Guarulhos: Pfizer, 2013. Bula de Remédio.
18. Vasconcelos MA, Orsolin PC, Silva-Oliveira RG, Nepomuceno JC, Spanó MA. Assessment of the carcinogenic potential of high intense-sweeteners through the test for

detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. Food and Chemical Toxicology.2017; 101: 1-7.

19. Justice RW, Zilian O, Woods DF, Noll M, Bryant PJ. The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog o-f human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. Genes Dev. 1995; 9(5): 534-546.

20. Rocha HM, Delamaro MC. Abordagem metodológica na análise de dados de estudos não-paramétricos, com base em respostas em escalas ordinais. Gestão da Produção, Operações e Sistemas .2011; 3(2): 77-91.

21. Almeida VL, Leitão A, Reina LCD, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MTP. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celular não específicos que

interagem com o DNA: uma introdução. Quím Nova. 2005; 28(1): 118-129.

22. Prior RL. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. Am J Clin Nutr. 2003; 78(3): 570-578.

23. Vizzotto M. Compostos bioativos e atividade antioxidante em genótipos de amora-preta. Informe Agropecuário.2012; 33(268): 84-88.

24. Tate P,Stanner A, Shields K, Smith S, Larcom L. Blackberry extracts inhibit UV-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA100. Nutr Res. 2006; 26(2): 100-104.

25. Marquina MA, Corao GM, Araujo L, Buitrago D, Sosa M. Hyaluronidase inhibitory activity from the polyphenols in the fruit of blackberry (*Rubus fruticosus* B.). Fitoterapia.2002; 73(7-8): 727-729.