

## TEMA: Clínica Médica

### AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGENÉTICO E/OU ANTICARCINOGENÉTICO DO ÓLEO DE CÁRTAMO EM *DROSOPHILA MELANOGASTER*, POR MEIO DO TESTE PARA DETECÇÃO DE CLONES DE TUMORES EPITELIAIS

José Diogo David de Souza<sup>1</sup>; Carlos Eduardo Carvalho<sup>1</sup>; Priscila Capelari Orsolin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicos do Curso de Medicina do Centro Universitário de Patos de Minas;

<sup>2</sup>Docente do curso de Medicina do Centro Universitário de Patos de Minas. Doutora em Genética e Bioquímica. E-mail para contato: josediogodavid@hotmail.com

#### RESUMO

O cártamo (*Carthamus tinctorius*) é uma planta cultivada e apreciada desde a antiguidade em todo mundo. De suas sementes é extraído um óleo de elevado valor dietético, muito usado como suplemento alimentar, o denominado óleo de cártamo. Nesta pesquisa, foi utilizado o teste para detecção de clones de tumores epiteliais (Warts) em *Drosophila melanogaster*, com a finalidade de conhecer o potencial anticarcinogênico e/ou carcinogênico do óleo de cártamo. Para tal, larvas *wts+/+mwh*, foram tratadas com o quimioterápico doxorrubicina (0,4mM), reconhecidamente indutor de tumor, como óleo de cártamo (0,5%; 1% e 2%) e com a associação de ambos. O óleo de cártamo não induziu aumento nas frequências de tumores quando comparado ao controle negativo (tween 80 1%). Contudo, na associação com a doxorrubicina foram constatadas reduções, estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), na frequência de tumores induzidos pelo quimioterápico. Dessa forma, nas condições experimentais propostas neste estudo, o óleo de cártamo apresentou efeito anticarcinogênico em células de *D. melanogaster*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Anticarcinogênico. *Carthamus tinctorius*. Óleo de cártamo. Warts.

#### INTRODUÇÃO

Diversos estudos apontam que o aparecimento do câncer está intimamente entrelaçado a uma multiplicidade de causas (etiologia multifatorial), incluindo fatores como tabagismo, inatividade física, alimentação inadequada, excesso de peso, consumo excessivo de álcool, exposição a radiações ionizantes e a agentes infecciosos específicos, entre outros. A suscetibilidade genética manifesta papel crucial nesse processo, mas é a interação entre a suscetibilidade e os fatores ou condições resultantes do modo de vida e do ambiente, que estabelece o processo de adoecimento por câncer (BRASIL, 2006). Nesse contexto, Garófolo *et al.* (2004) reforçam que as diversas formas de evolução dos cânceres mais prevalentes em todo o mundo apresentam relação direta com hábitos alimentares, inferindo-se que cerca de 35% dos vários tipos de câncer estão associados à dietas inadequadas. Há inúmeras evidências científicas de que a alimentação tem um papel importante nos estágios de iniciação, promoção e propagação do câncer, destacando-se entre outros fatores de risco. Acredita-se, também, que uma dieta adequada poderia prevenir de três a quatro milhões de casos novos de cânceres a cada ano. Ainda em relação aos hábitos alimentares,

com o propósito de redução da incidência dessa doença, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) recomenda uma dieta equilibrada, com baixo teor de colesterol, lipídios e ácidos graxos saturados. Em correspondência, recomenda, também, a ingestão aumentada de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados na dieta, substâncias estas abundantes em óleos de origem vegetal, por exemplo (HIPOLITO; KARINA, 2014). As plantas e os produtos naturais delas derivados têm sido utilizados ao longo da história com variados fins. O *Carthamus tinctorius* (açafraão agreste ou açafroa) é uma especiaria conhecida, cultivada e apreciada desde a antiguidade em todo mundo, como matéria corante, aromatizante e medicinal. De suas sementes é extraído um óleo de elevado valor dietético muito usado, atualmente, como suplemento alimentar, o denominado óleo de cártamo, rico em componentes benéficos à saúde (PINTÃO; SILVA, 2008), como as gorduras poli-insaturadas e a vitamina E (EKIN, 2005).

## **OBJETIVOS**

Avaliar o efeito carcinogênico e/ou anticarcinogênico do óleo de cártamo em *Drosophila melanogaster*, por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*). Avaliar se o óleo de cártamo é capaz de interagir com a doxorubicina, reduzindo os tumores induzidos por essa substância e, se positivo, quantificar em quais segmentos do corpo da *D. melanogaster* haverá maior redução. Verificar se haverá relação de dependência entre as frequências de tumores observadas e as concentrações testadas de óleo de cártamo. Identificar se óleo de cártamo possui efeito tóxico em *D. melanogaster*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **ÓLEO DE CÁRTAMO**

O óleo de cártamo foi adquirido comercialmente na farmácia universitária do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). O produto é produzido através de manipulação e comercializado em cápsula mole de gelatina, molde 18 oblongo, cor natural, suspensão oleosa de cor amarelada e livre de material estranho com peso médio do conteúdo de 1000,00 mg/caps, contendo óleo de cártamo (*Carthamus tinctorius*). Lote: 4800; data de fabricação: 15/04/16; prazo de validade: 10/04/17. O mesmo foi utilizado no experimento nas seguintes concentrações: 0,5%; 1% e 2%.

### **DOXORRUBICINA**

O agente indutor de tumor utilizado na presente pesquisa foi o cloridrato doxorrubicina, comercializado como Adriblastina® RD. A mesma é produzida pelo laboratório Pfizer sob a forma de pó liofilizado injetável de 50mg, em embalagem contendo 01 frasco-ampola. Lote: 5PL5023; data de fabricação: 02/2015; prazo de validade: 02/2019. A DXR foi utilizada na concentração de 0,4 mM.

### **TESTE PARA DETECÇÃO DE TUMORES EPITELIAIS EM *Drosophila melanogaster***

Para realização do referido teste genético foram utilizadas duas linhagens mutantes de *D. melanogaster* (*wts* e *mwh*) portadores dos marcadores genéticos *warts* (*wts*, 3-100) e *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-03). Os estoques dessas linhagens são mantidos em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura de *D. melanogaster* (820 mL de água; 25g de fermento; 11 g de ágar; 156 g de banana e 1g de nipagin), a uma temperatura de aproximadamente 25°C e 60% de umidade. Para obtenção de larvas heterozigotas *wts+/+mwh* foi realizado o cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3* com machos *mwh/mwh*. Desse cruzamento, todas as larvas obtidas foram utilizadas no tratamento experimental.

### **PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

Larvas de 3º estágio resultantes do cruzamento acima descrito foram submetidas a um tratamento crônico, por um período de, aproximadamente, 48 horas. Estas larvas foram colocadas em frascos de vidro contendo 1,5g de purê de batatas nas seguintes concentrações: óleo de cártamo 0,5%; óleo de cártamo 1%; óleo de cártamo 2%; óleo de cártamo 0,5% + doxorrubicina 0,4 mM; óleo de cártamo 1% + doxorrubicina 0,4 mM; óleo de cártamo 2% + doxorrubicina 0,4 mM; controle positivo: doxorrubicina 0,4 mM + Tween-80 1%; controle negativo: Tween-80 a 1%. Após o tratamento, todas as moscas foram coletadas e armazenadas em frascos contendo etanol 70%. Em sequência foram colocadas em placa escavada contendo glicerina e analisadas (uma a uma) em uma lupa estereoscópica para visualização e contagem dos tumores, de acordo com a descrição de Justice *et al.* (1995). Embora todas as moscas sejam coletadas, somente indivíduos adultos de pelos longos e finos foram analisados. As moscas adultas que apresentam pelos curtos e grossos foram descartadas, uma vez que não possuem o gene *wts* (gene em estudo). Para registrar a frequência de tumores foi utilizado uma planilha padrão, que separa quantitativamente os tumores encontrados por regiões do corpo da mosca: olhos, cabeça, asas, pernas, halteres e o total de tumores por mosca, em cada concentração testada.

### **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As diferenças estatísticas entre as frequências de tumores das concentrações testadas de óleo de cártamo e os controles (positivo e negativo) foram calculadas usando o teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney ( $\alpha=0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados demonstram a ação anticarcinogênica do óleo de cártamo nas concentrações 0,5%; 1% e 2%. Os testes para carcinogenicidade do óleo de cártamo não foram estatisticamente significativos em nenhuma concentração. É possível observar a frequência de clones de tumores por segmento da *Drosophila melanogaster* na Tabela 1.

**Tabela 1** - Frequência de clones de tumor observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, tratada com óleo de cártamo e doxorrubicina.

Tratamento Óleo de Cártamo (concentração %)	DX R (m M)	Número de moscas	Número de tumores por mosca (total de tumores)						
			Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter	Total
0	0	200	0,00 (0)	0,00 (0)	0,02 (4)	0,01 (2)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,03 (6)
0	0,4	200	0,01 (2)	0,06 (13)	0,64 (129)	0,31(62)	0,03 (6)	0,01 (2)	1,07 (214)*
0,5	0	200	0,00 (0)	0,00 (1)	0,02 (4)	0,01 (2)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,03 (7)
1	0	200	0,00 (0)	0,00 (0)	0,02 (5)	0,01 (2)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,03 (7)
2	0	200	0,00 (0)	0,00 (1)	0,02 (4)	0,00 (1)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,03 (6)
0,5	0,4	200	0,00 (0)	0,01 (3)	0,12 (25)	0,02 (5)	0,00 (1)	0,00 (0)	0,17 (34)**
1	0,4	200	0,00 (0)	0,01 (2)	0,09 (18)	0,03 (7)	0,00 (1)	0,00 (0)	0,14 (28)**
2	0,4	200	0,00 (0)	0,00 (0)	0,05 (10)	0,03 (7)	0,01 (2)	0,00 (0)	0,09 (19)**

Diagnóstico estatístico de acordo com Mann-Whitney Teste. 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) ( $p \leq 0,05$ )

DXR, Doxorrubicina

Para o controle negativo utilizou-se Tween 80 (1%), observando-se a frequência de 0,03 tumores por mosca. Esta discreta indução de tumores ocorre devido à predisposição genética do organismo teste. Já o controle positivo, 0,4 mM de Doxorrubicina (DXR), induziu uma frequência de 1,07 tumores por mosca. Isso atesta que a linhagem responde a indução tumoral, já que houve diferença de tumores estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo. A quimioterapia antineoplásica atua alterando o DNA da célula tumoral a fim de conter seu crescimento. No entanto,

como a substância age sistemicamente, as células saudáveis também podem sofrer tais alterações, ocorrendo efeito oncogênico (GRIFFITHS *et al.*, 2006). Assim, torna-se relevante a avaliação dos efeitos cancerígenos do óleo de cártamo. As larvas que não foram submetidas ao tratamento com DXR, mas somente tratadas com a solução do óleo de cártamo, nas concentrações de 0,5%; 1% e 2% apresentaram frequências de 0,03; 0,03 e 0,03 tumores por mosca, respectivamente. Este resultado certifica que o óleo de cártamo, quando comparado ao controle negativo, não induziu aumento na frequência de tumores ( $p > 0,05$ ) e, portanto, não apresentou efeito carcinogênico. O tratamento das larvas com a associação da DXR na concentração de 0,4 mM com o óleo de cártamo nas concentrações de 0,5%; 1% e 2% resultaram em frequências de tumores de 0,17; 0,14 e 0,09, respectivamente. É possível observar que estes três valores são significativamente menores ( $p < 0,05$ ), em comparação com o controle positivo. Diante disso, evidencia-se que a solução de óleo de cártamo é capaz de reduzir tumores induzidos pela DXR em *Drosophila melanogaster*. Observa-se, ainda, que a redução aumenta com o aumento da concentração. O cártamo é uma das mais ricas fontes de ácido linoleico, por vez o AL apresenta uma gama de isômeros cada qual podendo exercer funções particularizadas ou conjuntas. O CLA (ácido linoleico conjugado) - uma família de isômero do ácido linoleico - em forma de suplemento é necessário para manter uma boa saúde, pois é extremamente difícil de obter um nível otimizado de CLA apenas seguindo uma dieta normal. Existem evidências que ácidos graxos de ocorrência natural na alimentação promovem a saúde e diminuem a prevalência de câncer, entre eles está o CLA (LEE *et al.*, 2005). Ha, Storkson e Pariza (1990) estudaram a ação anticarcinogênica do CLA em camundongos submetidos à indução de câncer de estômago por benzopireno e observaram que animais tratados com CLA apresentaram metade da quantidade de neoplasmas, quando comparados ao controle. Apenas o isômero cis-9, trans-11 foi encontrado nos fosfolipídios do estômago dos camundongos, demonstrando que este seria o isômero responsável pela ação anticarcinogênica. O mecanismo de ação do CLA estaria relacionado com a propriedade antioxidante do composto, em especial do isômero cis-9, trans-11. Tal isômero inibiria reações do tipo Fenton e, conseqüentemente, os danos causados pelos radicais hidroxila nas membranas celulares, diretamente relacionados com o desenvolvimento de diversos processos patológicos, inclusive aqueles de iniciação e promoção de alguns tipos de câncer (HA; STORKSON; PARIZA, 1990). Enquanto o ácido linoleico (LA) exerce diferentes efeitos na carcinogênese, indo da inibição a neutro ou mesmo promovendo a proliferação, o CLA, ácido linoleico conjugado sempre mostra efeitos inibitórios sobre a proliferação celular maligna em todas as linhagens de células cancerosas humanas testadas (colon, mama, próstata, fígado, bexiga, glioblastoma) e ele é particularmente eficaz contra as células mais malignas. O mecanismo de ação principal do CLA em todas essas linhagens de células foi aumentar muito o PPAR-alfa e diminuir o PPAR-beta/delta o que provocou apoptose ou necrose das células malignas. Quando o PPAR-gama

diminuiu houve drástica queda da proliferação celular maligna (MAGGIORA *et al.*, 2004). O mecanismo de ação do CLA no tratamento do câncer ocorre basicamente por apoptose, podendo ser induzida por danos ao DNA ou por privação dos fatores de crescimento. O processo de morte celular induzida ocorre por ativação de proteínas denominadas caspases, proteases que clivam seus substratos especificamente após resíduos de aspartato (RANG *et al.*, 2007). Há dois tipos de caspases: as iniciadoras (efetoras) e as executoras. As caspases efetoras iniciam uma via que resulta na clivagem de constituintes celulares, DNA, componentes do citoesqueleto e enzimas. Ao final, a célula é reduzida a um agregado de entidades delimitadas por membranas que finalmente são fagocitadas por macrófagos. Em indivíduos saudáveis, o CLA induz a apoptose, o que é evidenciado pela redução na expressão dos elementos anti-apoptóticos, especificamente o gene BCL-2 (CLEMENT, 1994).

## CONCLUSÕES

O teste para a detecção de clones de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster* foi eficiente para identificar o potencial anticarcinogênico do óleo de cártamo nas concentrações testadas. Porém, novas pesquisas devem ser realizadas com outros organismos teste para um melhor esclarecimento deste efeito redutor de tumor.

## REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **A situação do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2006.
- CLEMENT, I. P. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. **Cancer Research**, v.54, n.5, p.1212- 1215, 1994.
- EKIN, S. Resurgence of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Utilization: A global view. **Journal of Agronomy**, v.4, n.2, p. 83-87, 2005.
- GARÓFOLO, A. *et al.* Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.17, n.4, p.491-505, out./dez., 2004.
- GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* **Introdução à genética**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- HA, Y. L.; STORKSON, J.; PARIZA, M. W. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of ted linoleic acid. **Cancer Res**, v.50, p.1097-101, 1990.
- HIPPOLITO, K. P. P.; KARINA, A. R. Importância da nutrição na prevenção e no tratamento e neoplasias. **Interciência & Sociedade**, v.3, n.2, p.51-59, 2014.

JUSTICE, R. W. *et al.* The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. **Genes & Development**, v.9, p.534-546, 1995.

LEE, K. W. *et al.* Role of the conjugated linoleic acid in the prevention of cancer. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v.45, n.2, p.135-44, 2005.

MAGGIORA, M. *et al.* An overview of the effect of linoleic and conjugated-linoleic acids on the growth of several human tumor cell lines. **Int J Cancer**, v.112(6), p.909-19, 2004.

PINTÃO, A. M.; SILVA, I. F. da. **A verdade sobre o açafrão**. [Portugal]: [s.n.], 2008. Disponível em: <[http://www2.iict.pt/archive/doc/A\\_Pintao\\_wrkshpplts\\_medic.pdf](http://www2.iict.pt/archive/doc/A_Pintao_wrkshpplts_medic.pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2016.

RANG, H. P. *et al.* **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.