

Avaliação do potencial carcinogênico e anticarcinogênico do aspargo (*Asparagus officinalis* L.) por meio do teste para detecção de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster*

Evaluation of the carcinogenic and anticarcinogenic potential of asparagus (Asparagus officinalis L) by means of the test for detecting epithelial lesions in Drosophila melanogaster

Guilherme Rosa Marques Gomes Melo

Discente do curso de Medicina (UNIPAM)

E-mail: guirmmelo21@gmail.com

Priscila Capelari Orsolin

Professora orientadora; Docente do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

Email: priscilaco@unipam.edu.br

Resumo: O aspargo é um vegetal com valor nutricional, farmacêutico e industrial. É pobre em calorias e gordura, mas rico em fibras e micronutrientes, incluindo vitaminas, minerais e outros fitoquímicos. O objetivo do presente trabalho consistiu em avaliar os efeitos carcinogênico e modulador do extrato de aspargo (EA) por meio do teste para detecção de tumores epiteliais (ETT) em *Drosophila melanogaster*. Para isso, foram preparadas três concentrações: 0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL de EA, utilizadas isoladamente e em associação à doxorrubicina nos tratamentos com *D. melanogaster*. Na maior concentração testada, observou-se efeito carcinogênico do EA, uma vez que houve aumento significativo na frequência tumoral em relação ao controle negativo. Nas menores concentrações testadas (0,625 e 1,25 mg/mL), houve redução na frequência de tumores em relação ao controle positivo, sugerindo atividade moduladora do EA sobre a ação da DRX. Verifica-se, portanto, que o efeito do EA sobre a carcinogênese é dependente da concentração.

Palavras-chave: *Asparagus officinalis* L. Carcinogênese. *Drosophila melanogaster*.

Abstract: Asparagus is a vegetable with nutritional, pharmaceutical and industrial value. It is low in calories and fat, but high in fiber and micronutrients, including vitamins, minerals and other phytochemicals. The aim of the present study was to evaluate the carcinogenic and modulatory effects of asparagus extract (AE) using the test for detection of epithelial tumors (TTE) in *Drosophila melanogaster*. For this, three concentrations were prepared: 0.625; 1.25 and 2.5 mg/mL of AE, used alone and in combination with doxorubicin in treatments with *D. melanogaster*. In the highest concentration tested, the carcinogenic effect of AE was observed, since there was a significant increase in tumor frequency in relation to the negative control. And, in the

lowest tested concentrations (0.625 and 1.25 mg/mL), there was a reduction in the frequency of tumors in relation to the positive control, suggesting modulating activity of the AE on the action of DXR. Therefore, it appears that the effect of AE on carcinogenesis is dependent on concentration.

Keywords: *Asparagus officinalis* L. Carcinogenesis. *Drosophila melanogaster*

1 INTRODUÇÃO

Na contemporaneidade, o câncer é uma das problemáticas mais relevantes no que concerne à saúde pública, tendo em vista sua complexidade, sua magnitude epidemiológica e seu impacto socioeconômico. Ressalta-se que pelo menos um terço dos casos novos de câncer que ocorrem anualmente no mundo poderiam ser prevenidos. Nesse sentido, as políticas públicas em prol da saúde no Sistema Único de Saúde (SUS) e a colaboração na constituição da rede de cuidados integrais à saúde são parte das responsabilidades do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2011).

Conceitua-se neoplasia como uma lesão constituída por proliferação celular anormal, descontrolada e autônoma, em geral com perda ou redução de diferenciação, em consequência de alterações em genes e proteínas que regulam a multiplicação e diferenciação das células. Desse modo, o que distingue uma neoplasia de uma displasia e uma hiperplasia é exatamente a autonomia de proliferação. Quando a ocorrência dessa multiplicação ocorre em um órgão sólido, o maior número de células de uma neoplasia forma um tumor (BRASILEIRO FILHO, 2011).

Do ponto de vista clínico, evolutivo e de comportamento, as neoplasias são divididas em duas categorias: benignas e malignas. As neoplasias benignas geralmente não são letais, nem causam sérios transtornos para o hospedeiro, assim podem evoluir durante muito tempo e geralmente não oferecem risco à vida de seu portador. As neoplasias malignas, ao contrário, em geral têm crescimento rápido e grande parte dessas provoca perturbações homeostáticas graves, que acabam levando ao óbito (BRASILEIRO FILHO, 2011).

Em meio aos vários fatores que dão origem à carcinogênese, a dieta vem se destacando, seja como precursora, seja como retardadora ou inibidora da doença. Dessa forma, o desequilíbrio alimentar pode implicar, a médio ou longo prazo, transtornos e patologias prejudiciais ao organismo. A ingestão contínua e desequilibrada de alimentos com alto teor de gorduras saturadas e gorduras hidrogenadas, além de substâncias químicas embutidas em determinados alimentos pode vir a desencadear um estágio inicial neoplásico. Em contrapartida, uma dieta equilibrada, abundante em fibras, vitaminas e proteínas favorece a prevenção ao câncer, podendo ainda auxiliar, juntamente ao tratamento clínico, no retrocesso ou estacionamento do estágio carcinogênico (FIGUEREDO; SILVA, 2001).

O aspargo (*Asparagus officinalis* L.) é um vegetal perene cultivado em áreas temperadas e subtropicais. Essa espécie é economicamente importante, com alto valor nutricional, valores farmacêuticos e industriais (JASHNI *et al.*, 2016). Além disso, é naturalmente pobre em calorias e gordura, mas rico em fibras e muitos micronutrientes, incluindo vitaminas (especialmente K e C), minerais (especialmente

manganês e selênio) e outros fitoquímicos. Na literatura, há estudos referentes ao potencial anticarcinogênico nas células do câncer do cólon, do câncer de rim e do câncer de fígado. As propriedades anticâncer dos espargos parecem estar relacionadas à presença de múltiplos componentes, incluindo a sarsasapogenina e diosgenina, asparaninas, saponinas e vários compostos acetilênicos (KERLEY, 2018).

As autoridades em saúde e nutrição afirmam que os vegetais estão entre os alimentos mais saudáveis. Entretanto, recentemente, um composto presente nos espargos, denominado asparagina, foi associado ao câncer de mama em um estudo feito pelo Cancer Research UK Institute. Pesquisadores notaram que uma dieta rica em asparagina parecia proporcionar metástase a partir de um câncer de mama em camundongos (KERLEY, 2018).

Verifica-se, portanto, que existem contradições descritas na literatura no que concerne às propriedades do aspargo, seja no sentido de causar, seja no sentido de prevenir a carcinogênese. Nesse contexto, é imprescindível que mais estudos experimentais sobre esse vegetal sejam realizados para melhor esclarecer tal dicotomia. Até o referido momento, não há descrição de um estudo a fim de comprovar os efeitos referidos em *Drosophila melanogaster*.

Dessa forma, justifica-se o presente estudo, a fim auxiliar na prevenção do câncer e na promoção de saúde por meio da medicina baseada em evidências. Os dados obtidos por meio de pesquisas científicas no meio acadêmico são fundamentais para a melhor compreensão das nuances envolvidas no complexo processo de patogênese das doenças, especialmente o câncer. Nessa direção, objetivou-se, no presente estudo, analisar o efeito carcinogênico e/ou anticarcinogênico do aspargo (*Asparagus officinalis* L.) por meio do teste para detecção de tumores epiteliais (ETT) em *D. melanogaster*.

2 METODOLOGIA

2.1 CLORIDRATO DE DOXORRUBICINA (DXR)

O cloridrato de doxorubicina (Fauldoxo®, lote 19B1091), Libbs Farmacêutica Ltda, São Paulo, SP, Brasil, antibiótico citotóxico da classe das antraciclina, foi utilizado como agente indutor de tumor na concentração de 0,4 mM, concentração comprovadamente carcinogênica em *D. melanogaster* (VASCONCELOS *et al.*, 2017). Trata-se um agente não específico do ciclo celular, assim apresenta ação seja nas células em divisão, seja nas células na fase de repouso. Sua principal ação citotóxica ocorre durante a fase S no ciclo celular. Ademais, há inibição da síntese proteica e reações de oxidação, o que implica formação de radicais livres (RODASKI; DE NARDI, 2004; WITHROW, 2007).

2.2 EXTRATO DE ASPARGO

O aspargo (*Asparagus officinalis* L.) utilizado no presente estudo foi adquirido em um supermercado na cidade de Patos de Minas-MG, *in natura*, em setembro de 2019. A preparação do extrato da parte aérea (parte comestível do aspargo) foi feita de

acordo com a técnica denominada extração de Soxhlet. (KMCH COLLEGE OF PHARMACY, 2018).

A priori, 450g de aspargo foram colados em placas de Petri e deixados por 48 h em estufa A 63°C. A posteriori ao processo de secagem do vegetal, este foi triturado. Após a trituração, foi obtida uma amostra em pó, que foi colocada em um saco poroso, para assim ser alocada na câmara de dedal do aparelho Soxhlet. O extrator consiste em um balão de fundo redondo, tubo de sifão, caminho de destilação, adaptador de expansão, condensador, entrada de água de resfriamento, saída de água de resfriamento, fonte de calor e dedal. O solvente de extração é coletado no balão de fundo redondo e aquecido usando uma fonte de aquecimento como manta de aquecimento. A temperatura de aquecimento é construída sobre o solvente empregado na extração. Devido ao calor, o solvente no balão de fundo se vaporiza no condensador e goteja de volta ao dedal da amostra. Quando o conteúdo líquido atinge o braço do sifão, o conteúdo líquido é esvaziado novamente no frasco inferior (KMCH COLLEGE OF PHARMACY, 2018).

O processo de secagem é importante para a extração de materiais vegetais, pois os vegetais frescos possuem as enzimas ativas que produzem os constituintes ativos intermediários e reações metabólicas, de modo que a secagem é importante para a pré-preparação para extração de materiais vegetais (THASE; HOWLAND, 1995).

A amostra de aspargo ficou por 24 horas no extrator, submetida à técnica de Soxhlet. Assim, foi obtida uma amostragem densa do vegetal que foi deixada novamente em estufa por 24 horas para secagem. Após a segunda secagem, o material foi diluído em uma solução de 940 mL de água, 50 mL de álcool etílico e 10 mL de Tween 80 (1%), assim foi preparada a solução mãe de extrato de aspargo. Com base em estudo de Shao e colaboradores (1996), foram determinadas as concentrações que foram utilizadas no experimento: 0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL.

2.3 TESTE PARA DETECÇÃO DE CLONES DE TUMORES EPITELIAIS EM *Drosophila melanogaster*

Duas linhagens mutantes de *D. melanogaster* (*wts* e *mwh*) portadoras dos marcadores genéticos *warts* (*wts*, 3-100) e *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-03) foram manipuladas durante os testes do presente trabalho. Os estoques dessas linhagens são cultivados no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM, mantidas em frascos 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 com temperatura em torno de 25°C e 60% de umidade.

2.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para realização do tratamento, machos *mwh/mwh* e fêmeas virgens *wts/TM3,Sb1* foram colocados (simultaneamente) em recipientes de acasalamento e, a posteriori, em frascos próprios para a postura de ovos e a obtenção de larvas heterozigotas *wts+/+mwh*.

As larvas de 72 horas, resultantes do cruzamento anteriormente descrito, foram transferidas para frascos contendo 1,5 g de purê de batata (meio alternativo para a *Drosophila*), aos quais foram adicionados 5mL de três diferentes concentrações de extrato de aspargo (0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL), para avaliação da atividade carcinogênica. Para avaliação da anticarcinogenicidade foram preparadas soluções com as mesmas concentrações de aspargo mencionadas anteriormente, associadas ao quimioterápico DXR (em sistema de cotratamento). Simultaneamente foram preparados frascos com controle positivo, contendo somente DXR (em concentração de 0,4 mM) e controle negativo (solução com água, álcool e tween 80 a 1%). As larvas ficaram acondicionadas nesses recipientes até a metamorfose, com a formação das moscas adultas. Nesse momento, foram coletadas e posteriormente analisadas em lupa estereoscópica.

Foram selecionadas para análise apenas as moscas portadoras do gene em estudo (*wts*), que, em termos de fenotipagem, caracterizam-se pela presença de tricomas finos e longos. Por não possuírem o gene em estudo, as moscas com tricomas grossos e curtos não foram analisadas, sendo descartadas. As moscas foram analisadas individualmente, com o auxílio de lupa estereoscópica e sobre uma placa escavada contendo glicerina. Todos os tumores nas regiões da cabeça, olhos, asas, corpo, pernas e halteres foram analisados e contabilizados.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças estatísticas reveladas pelas frequências de tumores das três concentrações testadas, além dos controles positivo e negativo, foram calculadas utilizando-se o teste *U*, de Mann-Whitney, empregando-se o nível de significância $\alpha = 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos indivíduos tratados com extrato de aspargo (EA) nas concentrações de 0,625mg/mL, 1,25mg/mL e 2,5mg/mL, as frequências de crescimento tumoral foram, respectivamente, 0,18; 0,08 e 0,11 tumores/mosca, como pode ser observado na Tabela 1. A frequência de tumores no controle negativo foi 0,08. A partir desses dados, infere-se que o extrato de aspargo foi carcinogênico na maior concentração testada, uma vez que houve diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$).

Tabela 1—Frequência de tumores observados nos descendentes heterozigotos de *Drosophila melanogaster* tratados com controle negativo, controle positivo (DXR) e diferentes concentrações de extrato de aspargo (EA) isoladas e associadas à DXR

Concentrações	Indivíduos (moscas)	Tumores encontrados						Total	Frequência
		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter		
Controle negativo	200	0	0	1	16	0	0	17	0,08
DXR 0,4 mM	200	11	15	26	60	11	7	119	0,60*
EA 0,625 mg/mL	200	0	0	1	20	2	0	23	0,11
EA 1,25 mg/mL	200	0	0	2	13	2	0	17	0,08

EA 2,5 mg/mL	200	1	0	5	28	3	0	37	0,18*
EA 0,625 mg/mL + DXR	200	1	3	10	35	10	3	63	0,31**
EA 1,25 mg/mL + DXR	200	0	4	7	52	6	1	70	0,35**
EA 2,5 mg/mL + DXR	200	0	5	11	95	9	10	132	0,66

Diagnóstico estatístico de acordo com o Teste Mann-Whitney. Nível de significância $p = 0,05$

* Valor considerado diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

** Valor considerado diferente do controle positivo ($p < 0,05$).

DXR, Doxorubicina.

EA, Extrato de aspargo.

Fonte: Dados da pesquisa.

A propriedade pró-neoplásica evidenciada na concentração de 2,5 mg/mL pode estar relacionada a uma maior biodisponibilidade da asparagina nessa concentração, que, segundo Knott *et al.* (2018), influencia fortemente o potencial carcinogênico. A asparagina é um aminoácido não-essencial presente em abundância nos aspargos. Demonstrou-se que a expressão da asparagina sintetase no tumor primário de um paciente foi mais fortemente correlacionada com a recidiva metastática posterior em um modelo funcional de heterogeneidade do câncer de mama. Limitar a asparagina pela redução da asparagina sintetase, tratamento com L-asparaginase ou restrição dietética da asparagina reduziu a metástase. Por outro lado, o aumento da expressão da asparagina na dieta ou da asparagina sintetase forçada promoveu a progressão metastática (KNOTT *et al.*, 2018).

Segundo estudo feito pelo Cancer Research UK Institute, uma dieta abundante em asparagina pareceu proporcionar metástases a partir de um câncer de mama em camundongos. Parte adicional do estudo demonstrou que a asparagina foi restrita e a redução do composto limitou a disseminação do câncer de mama. Além disso, pesquisadores examinaram registros humanos e descobriram que os tumores de mama que produzem mais asparagina têm maior probabilidade de se tornarem metastáticos (KERLEY, 2018).

Ao avaliar os indivíduos de *D. melanogaster* tratados com extrato de aspargo nas concentrações de 0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL, associado à DXR, observaram-se as seguintes frequências tumorais: 0,31; 0,35 e 0,66 tumores por mosca, respectivamente. Nos indivíduos tratados apenas com o controle positivo, DXR, a frequência foi 0,60 tumor por mosca. Com isso, observa-se uma redução, estatisticamente significativa ($p < 0,05$), nos indivíduos tratados com as duas menores concentrações de EA em relação à frequência de tumores do controle positivo, o que evidencia que o EA, nas concentrações 0,625 mg/mL e 1,25 mg/mL, atuou reduzindo a frequência tumoral induzida pela DXR. Sob essa perspectiva, nota-se que o aspargo em menores concentrações parece exercer efeito modulador frente a agentes neoplásicos, o que provavelmente justifica-se pelo fato de apresentar compostos antioxidantes em grande concentração, como os fenólicos e flavonoides, porém com menor fração de asparagina (CISOWSKA *et al.*, 2019).

Em publicação no International Journal of Oncology, em 2013, uma pesquisa avaliou os mecanismos anticancerosos de um extrato metanólico de brotos de *A. officinalis* L. em células humanas de carcinoma de cólon e suas células metastáticas

derivadas. As propriedades quimiopreventivas do composto também foram avaliadas em um modelo de carcinogênese do cólon. O referente estudo revelou que após sete semanas de tratamento com o aspargo, o cólon de ratos exibiu uma redução de 50% do número de lesões pré-neoplásicas (focos de criptas aberrantes). Em conjunto, os dados obtidos nessa pesquisa destacam os efeitos quimiopreventivos do *A. officinalis* L. na carcinogênese do cólon e sua capacidade de promover a homeostase celular normal (BOUSSEROUÉL *et al.*, 2013).

Nesse experimento, demonstrou-se que um extrato metanólico de aspargos ativa a via do receptor de morte TRAIL nas células de adenocarcinoma do cólon humano SW480 e em suas células SW620 metastáticas resistentes a TRAIL derivadas. Esse extrato também sensibilizou essas células à apoptose induzida por TRAIL, por meio da regulação positiva dos receptores de morte (DR4/DR5) e a ativação associada da caspase-8 e caspase-3, levando finalmente à morte celular (BOUSSEROUÉL *et al.*, 2013).

Liu *et al.* (2009) verificaram que a asparanina A, uma saponina esteroide extraída de *Asparagus officinalis* L., induz parada de fase G2/M do ciclo celular e apoptose de maneira independente de p53 em células HepG2 de carcinoma hepatocelular humano. Esses dados indicam que a asparanina A mostra promessa como agente preventivo e ou terapêutico contra o hepatoma humano.

Bousserouel *et al.* (2013) verificaram que o extrato de aspargo exerceu vários efeitos anticarcinogênicos e protetores na mucosa colônica nos estágios iniciais. No nível molecular, o extrato de aspargo exibiu efeitos multirecionados na mucosa colônica pré-neoplásica, incluindo a inibição de mediadores pró-inflamatórios celulares como IL1 β , TNF- α , MMP-7 e MMP-9, em associação com um aumento da expressão dos mediadores de defesa do hospedeiro como α -defensina-5 e lipocalina 2. Destaca-se nesse estudo, o potencial quimiopreventivo do extrato de aspargo na carcinogênese do cólon e sua capacidade de promover a homeostase celular normal.

Shao *et al.* (1996) notaram atividade citotóxica do aspargo. Eles reprimiram o crescimento de células HL-60 de leucemia humana em cultura e a síntese macromolecular de uma maneira dependente da dose. Saponinas de caules antigos de aspargos exerceram potencial atividade repressiva no crescimento tumoral e metástase de células de câncer de mama, cólon e pâncreas.

Em suma, há estudos que demonstram efeito anticâncer do aspargo em modelos experimentais, porém encontram-se publicações que evidenciam fator pró-câncer de compostos presentes nesse vegetal. Nessa direção, infere-se que os resultados da presente pesquisa, ora constatando potencial carcinogênico, ora ratificando potencial modulador do aspargo (*Asparagus officinalis* L.), dependendo da concentração testada, vão ao encontro da dicotomia apresentada na literatura.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste para a detecção de clones de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster* permitiu identificar a propriedade moduladora do extrato de aspargo sobre a ação da DXR nas concentrações de 0,625mg/mL e 1,25mg/mL. Já na concentração 2,5 mg/mL foi observado potencial carcinogênico. Logo, a dualidade e

ambivalência de efeitos do extrato de *Asparagus officinalis* L. corroboram achados da literatura. Sugere-se que a concentração de aspargo e, conseqüentemente, de seus componentes ativos, como a asparagina, sejam determinantes para a determinação desse efeito.

REFERÊNCIAS

BOUSSEROUËL, S. *et al.* Methanolic extract of white asparagus shoots activates TRAIL apoptotic death pathway in human cancer cells and inhibits colon carcinogenesis in a preclinical model. **International Journal of Oncology**, Athens, n. 43, p. 394-404, 2013.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: Patologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

CISOWSKA, J. K. *et al.* Composition of polyphenols of asparagus spears (*Asparagus officinalis*) and their antioxidant potential. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 49, n. 4, 2019.

FIGUEREDO, V. A.; SILVA, C. H. C. A influência da alimentação como agente precursor, preventivo e redutor do câncer. **Universitas Ciências da Saúde**, v. 1, n. 2, p. 317-325, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **ABC do câncer**. Rio de Janeiro, 2011.
Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf.

JASHNI, H. K. *et al.* Efeitos do extrato aquoso das raízes de *Asparagus officinalis* L. sobre os níveis de hormônio do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e o número de folículos ovarianos em ratos adultos. **International Journal of Reproductive BioMedicine**, v. 14, n. 2, p. 75-80 fev. 2016.

KERLEY, C. **Can asparagus cause cancer or can it help prevent cancer?**. 2018.
Disponível em: <https://nutritionstudies.org/can-asparagus-cause-cancer-can-help-prevent-cancer/>.

KMCH COLLEGE OF PHARMACY. Significant role of soxhlet extraction process in phytochemical research. **Mintage Journal of Pharmaceutical & Medical Sciences**, v. 7, 2018.

KNOTT, S. *et al.* Asparagine bioavailability governs metastasis in a model of breast cancer. **Nature**, v. 554, p. 378-381, 2018.

LIU, W. *et al.* Asparanin A induces G(2)/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 381, n. 4, p.700-705, 2009.

RODASKI, S.; DE NARDI, R. B. **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos**. Curitiba: Maio, 2004.

SHAO, Y. *et al.* Anti-tumor activity of the crude saponins obtained from asparagus. **Cancer Letters**, v. 104, n. 1, p. 31-36, 1996.

THASE, M. E.; HOWLAND, R. H. Biological processes in depression: an update and integration. **Handbook of Depression**, New York, v. 2, p. 213-279, 1995.

VASCONCELOS, M. A. *et al.* Assessment of the carcinogenic potential of high intensesweeteners through the test for detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v.101, p. 1-7, 2017.

WITHROW, S. J. **Small animal clinical oncology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007.