

Avaliação do efeito carcinogênico e anticarcinogênico do extrato aquoso de Kiwi (*Actinidia deliciosa*) por meio do teste (*warts*) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Effect Assessment of the carcinogenic and anticarcinogenic of kiwi (Actinidia deliciosa) water extract through the test (warts) in somatic cells of Drosophila melanogaster

Rafaela Ribeiro Furtado

Graduada em Ciências Biológicas (UNIPAM).

E-mail: rafaela_ribeiro13@outlook.com

Jeyson Césary Lopes

Professor orientador (UNIPAM).

E-mail: jeysoncl@unipam.edu.br

Resumo: O kiwi (*Actinidia deliciosa*) é uma excelente fonte de vitamina C. Possui quase o dobro de vitamina C que laranja. É também rico em duas importantes vitaminas lipossolúveis, A e E, que, em conjunto com a vitamina C, têm um elevado poder antioxidante. De posse dessas informações, o presente estudo teve por objetivo avaliar as propriedades carcinogênicas e anticarcinogênicas do kiwi, por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*. Para tanto, larvas de terceiro instar foram tratadas com o indutor de tumor doxorubicina (DXR 0,4mM) e com extrato aquoso de kiwi em três concentrações 60%, 80% e 100%, isoladamente e em associação com DXR. Os resultados demonstraram que o kiwi possui uma proteção mediada pela captura de radicais livres pelas substâncias antioxidantes presentes em sua composição. Também há de se notar que tais moléculas antioxidantes, em quantidades elevadas, induzem danos ao DNA, conferindo ação pró-oxidativa.

Palavras-chave: Antioxidante. Frutas. Vitaminas.

Abstract: Kiwi (*Actinidia deliciosa*) is an excellent source of vitamin C. It has almost twice vitamin C than orange does. It is also rich in two important fat-soluble vitamins: A and E, which combined with vitamin C has high antioxidant power. Based on these pieces of information, the present study aimed to evaluate the carcinogenic and anticarcinogenic effects of kiwi through the test for detection of epithelial tumors clones (*warts*) in *Drosophila melanogaster*. Third instar larvae were treated with tumor inducer doxorubicin (DXR 0,4 mM) and kiwi water extract in three concentrations 60%, 80% and 100%, individually and in association with DXR. The results showed that kiwi presents protection mediated by the capture of free radicals through antioxidants present in its composition. Also, it should be noted that such antioxidant molecules, in high amounts, induce DNA damage, providing pro-oxidative action.

Keywords: Antioxidant. Fruit. Vitamins.

1 INTRODUÇÃO

O consumo de frutas está aumentando cada vez mais nos mercados interno e externo, Isso decorre do crescente reconhecimento dos benefícios à saúde e valor terapêutico desses alimentos. Já não é apenas resultado de gosto pessoal ou preferência, mas sim uma preocupação de saúde, devido à presença de importantes nutrientes nas frutas (SUCUPIRA, 2015).

O consumo de frutas está diretamente ligado a fatores que melhoram a qualidade de vida, diminuindo os riscos de doenças crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares e até mesmo o câncer. Nutrientes e compostos fenólicos contidos em vegetais são os principais responsáveis pela atividade antioxidante, livrando o organismo dos radicais livres. Tais substâncias possuem ação captadora de espécies reativas de oxigênio, que são formados continuamente durante processos metabólicos ou provenientes de fontes exógenas (SOUSA; VEIRA; LIMA, 2011).

Uma excelente fonte de vitamina C, o Kiwi possui quase o dobro desse nutriente quando comparado à laranja. É também rico em duas importantes vitaminas lipossolúveis, A e E, que, em conjunto com a vitamina C, podem ter um elevado poder antioxidante. Possui, ainda, quantidades consideráveis de ácido fólico, necessário na formação dos glóbulos vermelhos, no crescimento dos tecidos e na formação do DNA, o qual parece ter um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares, principalmente nos portadores de distúrbios metabólicos em que há um aumento da homocisteína no sangue, atuando como redutor desta toxina (ANTUNES, 2008).

Os efeitos benéficos atribuídos às propriedades antioxidantes do kiwi decorrem da sua ação redutora frente a espécies reativas de oxigênio. Quando em excesso, essas espécies reativas podem causar danos celulares e contribuir para o surgimento de doenças cardiovasculares, neurológicas e alguns tipos de câncer (SOUSA; VIEIRA; LIMA, 2011).

Uma vez que *Actinidia deliciosa* é um fruto que possui níveis elevados de proteínas, polissacarídeos, ácido ascórbico, entre outros compostos que conferem grande potencial antioxidante, podendo auxiliar em melhora da resposta do organismo frente às diversas doenças, sobretudo no tratamento do câncer, estudos sobre os efeitos carcinogênicos ou anticarcinogênicos de *A. deliciosa* em células de *Drosophila melanogaster* tornam-se importantes para ampliar a gama de conhecimentos acerca das propriedades terapêuticas contidas no fruto.

De posse dessas informações, o presente estudo teve por objetivo avaliar as propriedades carcinogênicas e anticarcinogênicas do fruto kiwi (*Actinidia deliciosa*), por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MUTAÇÃO E CÂNCER

A palavra câncer provém do grego *karkínos* (caranguejo) e é a denominação

usada para representar um conjunto de mais de cem doenças multifatoriais que apresentam, em comum, desordens de crescimento e divisão celular e capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos (INCA, 2012).

O câncer é uma doença que se caracteriza pela multiplicação e disseminação desordenada de formas anômalas das células do organismo. De modo geral, a terminologia câncer vem para designar diferentes doenças heterogêneas, que surgem por meio de uma série de mutações específicas que se acumula em uma determinada célula, ocasionando desde alterações na atividade gênica até mutações que modificam as atividades celulares, as quais, coletivamente, contribuem para o crescimento dos tumores malignos. (GRIFFITH, 2013).

O câncer surge a partir de alterações genéticas que afetam genes envolvidos nos sistemas de regulação do ciclo celular (BAMSHAD *et al.*, 2010). Essas alterações genéticas podem ser iniciadas por metabólitos reativos endógenos, drogas terapêuticas ou mutágenos que interatuam com o DNA ou com algumas proteínas envolvidas na divisão celular, alterando seu funcionamento normal (RESENDE, 2007).

O ciclo celular possui muitas e complexas formas de controle, como proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparo de DNA, mas essa regulação nem sempre é eficaz. Desse modo, as células normais sofrem ação de um ou mais agentes cancerígenos que causam alterações no DNA e dão origem as células tumorais (BRASILEIRO FILHO; PEREIRA; GUIMARÃES, 2004).

Os proto-oncogenes estão relacionados ao crescimento, diferenciação e proliferação celular normal. Codificam fatores de crescimento, receptores de membrana e proteínas de ligação do DNA (LOPES; OLIVEIRA; PRADO, 2002). Proto-oncogenes normais não causam malignidade, entretanto, após eventos mutacionais, tais genes passam a ser chamados oncogenes que, normalmente, induzem hiperexpressão de sinais de transdução do ciclo celular, promovendo divisões celulares desordenadas e alterações metabólicas (LOURO *et al.*, 2002).

As mutações oncogênicas são notadas nas células cancerígenas, como mutações com ganho de função. Não é uma regra a mutação estar sempre como um alelo para contribuir para a formação do tumor. De modo que se ela estiver presente no DNA codificante de proteínas, o oncogene causa uma mudança na proteína codificada de maneira estrutural, e isso faz com que uma proteína, mesmo que seja estruturalmente normal, seja desregulada (GRIFFITH *et al.*, 2006).

Os genes supressores de tumor têm como finalidade atribuir limites ao ciclo e ao crescimento celular, de modo a suprir algumas prioridades fenotípicas das células tumorais, acarretando uma inibição de algumas propriedades das células malignas (LOURO *et al.*, 2002).

Na interfase do ciclo mitótico, durante o *check point*, o gene p53 induz a síntese da proteína 21 (p21), que exerce função de inibir a ação das quinases dependentes de ciclina (cdks), interrompendo o ciclo celular na fase G1, enquanto o gene *Growth Arrest DNA Damage inducible*(GADD-45), ativado por p53, tem função de reparo do DNA. Quando ocorre o reparo, a p53 é degradada e o ciclo celular continua (CAVALCANTI JÚNIOR; KLUMB; MAIS, 2002). O número de casos de câncer vem aumentando de maneira considerável por toda parte do mundo. Essa doença afeta tanto países desenvolvidos quanto países em desenvolvimento. Tornou um problema de saúde

pública, sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos por ano. De todas as causas de morte, ele representa cerca de 12% em todo o mundo (GUERRA, 2005).

Fatores endógenos e exógenos estão inclusos nas diversas causas do câncer; ambos, entretanto, estão inter-relacionados. As causas exógenas se associam aos hábitos, costumes e ao meio em que se vive, e isso inclui fatores como a alimentação, modo de vida, tabagismo, alta exposição ao sol, entre outros. Já as causas endógenas geralmente são pré-determinadas e estão ligadas ao sistema imunológico e à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Contudo, existem agentes inibidores da carcinogênese, como os antioxidantes, moléculas bloqueadores de radicais livres, que, devido a essa propriedade, destacam-se como sendo o principal grupo anticarcinogênico. (READ; STRACHAN, 2002).

Estudos revelam que cerca de 120 substâncias, sejam elas puras ou isoladas de plantas, são usadas com finalidades terapêuticas, e muitas delas são focadas em tratamentos oncológicos, com base em estudos da medicina popular, fitoquímicos e bio-direcionados (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Entre os fitoquímicos, estão os antioxidantes. Tais substâncias agem na defesa orgânica contra radicais livres e contra a indução do câncer, prevenindo, interceptando e reparando danos (KONG; LILLEHEI, 1998). Os antioxidantes exógenos, componentes da dieta, constituem o principal mecanismo antioxidante não enzimático do organismo, as quais protegem compartimentos apolares e polares do meio biológico, respectivamente. Como exemplo, cita-se tocoferol, ascorbato, carotenoides e compostos fenólicos encontrados em alimentos de origem vegetal, os quais constituem um grupo heterogêneo de antioxidantes não nutrientes (STIPANUK; CAUDILL, 2012).

Antioxidantes e alimentos bioativos têm sido alvo de discussão com relação à melhora na saúde. Portanto, alimentação balanceada, consumo de frutas, verduras e legumes são necessários para se obterem as vitaminas essenciais para o corpo (SIMARELLI, 2006). Com uma boa alimentação várias doenças podem ser evitadas, como câncer que se desenvolve através de uma multiplicação desenfreada.

Uma alimentação inadequada é responsável por vários tipos de câncer. Alimentos com alto teor de gorduras saturadas, colesterol, açúcares e o não consumo de frutas, verduras e fibras acabam contribuindo para o surgimento da doença. Acredita-se que uma boa alimentação associada a atividades físicas contribua para prevenção de mais de três milhões de novos casos de câncer a cada ano (MUNHOZ *et al.*, 2016).

2.2 MUTAÇÃO E TESTE PARA DETECÇÃO DE CLONES DE TUMORES EPITELIAIS (WTS) EM *Drosophila melanogaster*

Popularmente conhecida como a mosca das frutas, a *Drosophila melanogaster* é um organismo eucarioto ($2n=8$) amplamente utilizado como organismo modelo em pesquisas envolvendo diferentes áreas da biologia molecular. A *D. melanogaster* é de fácil manutenção em laboratórios, possui ciclo reprodutivo relativamente curto, que varia de 10 a 12 dias, em temperatura aproximada de 25°C, fornece progênie numerosa e possui elevada conservação genética e metabólica em relação a mamíferos (GRAF *et*

al., 1984).

A *D. melanogaster* se desenvolve por meio de ciclos. Na sua fase larval, possui um disco imaginal constituído por uma única camada de células, que se diferenciam nas estruturas da epiderme durante a metamorfose para a fase adulta. O ciclo de diferenciação celular de tais células é altamente semelhante ao que ocorre nas células somáticas dos mamíferos. Entre os proto-oncogenes e supressores de tumores de mamíferos que possuem homologia com genes presentes nesse organismo teste, encontra-se o gene *wts* (EEKEN *et al.*, 2002).

O gene *warts* (*wts*) tem atividade supressora de tumor em *D. melanogaster*. A deleção desse gene acarreta formação de clones de células que são consideravelmente invasivas, ou seja, que têm a capacidade de se desenvolver por todo o corpo da mosca. O marcador *wts* em homozigose é letal nos zigotos, sendo mantido na linhagem estoque juntamente com um balanceador cromossômico (TM3). O cruzamento entre as linhagens *wts/TM3* e *multiple wing hair* (*mwh/mwh*) resulta em larvas heterozigotas (*wts/+*) em que a perda de heterozigose das células do disco imaginal induz a produção de clones de tumores na mosca adulta (FONSECA; PEREIRA, 2004).

2.3 ANTIOXIDANTES E KIWI (*Actinidia deliciosa*)

O excesso de radicais livres no organismo provoca um desequilíbrio denominado estresse oxidativo, que está relacionado com o processo de envelhecimento e desenvolvimento de várias doenças, como doenças cardiovasculares, envelhecimento precoce e câncer. Uma alimentação saudável, rica em frutas e em vegetais antioxidantes, evita os danos celulares e o estresse oxidativo (COSTA; MATIAS, 2014).

O organismo, em suas funções metabólicas normais, produz espécies reativas, geradas nos processos fisiológicos envolvidos na produção de energia, crescimento celular, sinalização intracelular, fagocitose, síntese de substâncias importantes como hormônios e enzimas. O organismo dispõe de um sistema antioxidante para contrabalancear os potenciais negativos. Ao surgir um desequilíbrio no sistema pró-oxidante, ocorre o estresse oxidativo (RAHMAN; BISWAS; KODE, 2006) e (RAJENDRASOZHAN *et al.*, 2008)

Os radicais livres são moléculas liberadas pelo metabolismo celular através de elétrons altamente instáveis e reativos, que podem causar doenças degenerativas, envelhecimento e morte celular (CEPE USP, 2013). Esses danos podem ser gerados em diversas partes das células, como no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana. Seu alvo celular está relacionado com seu sítio de formação (ANDERSON, 1996).

Com o aumento do número de novos casos de câncer, estão sendo desenvolvidas pesquisas com compostos fitoquímicos com propriedades antioxidantes, os quais têm potencial de atuação na prevenção de doenças. Alguns compostos como as vitaminas A, C e E, bem como os carotenoides têm sido estudados devido ao seu grande potencial antioxidante. Tais nutrientes atuam nas células inibindo os danos oxidativos, visto que o processo carcinogênico é marcado por um estado oxidativo crônico (BAU; HUTH, 2011).

O kiwi é rico em vitaminas e minerais e tem alto teor de vitamina C,

aproximadamente o dobro do de uma laranja, por isso desperta grande interesse na dieta (HEIFFIG *et al.*, 2006). Além disso, contém antioxidantes, que são importantes na diminuição da incidência de doenças degenerativas, cardiovasculares, inflamações, disfunções cerebrais e câncer (MACHADO *et al.*, 2010). Assim como mamão, laranja, cenoura, cebola, morango e espinafre, o kiwi está entre os diversos alimentos ricos em compostos antioxidantes, como betacaroteno, vitaminas C e E, e selênio, que podem neutralizar e retirar do organismo os radicais livres (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

As vitaminas C e E e carotenoides precursores de vitamina A possuem uma grande propriedade antioxidante e anti-inflamatória (SONG; GARRET; CHAN, 2015). Em um de seus estudos, Sucupira (2012) afirma que a vitamina C é um dos mais importantes antioxidantes naturais. Sua principal fonte são alimentos cítricos como laranja, goiaba, acerola, kiwi, hortaliças como couve, pimentão e brócolis. Segundo Motohashi *et al.* (2002), o fruto é conhecido por sua atividade anticarcinogênica, atuando ao inibir a multiplicação de determinadas células. Nos estudos de Souza, Marodin e Barradas (1996), foi constatado que *A. deliciosa* possui elevado teor de vitamina C, que auxilia no processo antioxidativo, prevenindo assim danos celulares.

A. deliciosa é caracterizada pelo seu baixo valor calórico e pelo elevado valor nutricional, sendo rica em vitaminas, minerais, açúcares, ácidos orgânicos e fibras, além de ser uma fonte rica de compostos bioativos, como os flavonóides, que possuem efeitos benéficos para a saúde humana (WILLS; LIM; GREENFIELD, 1986; TAVARINI *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2010).

Anami (2016) obteve elevadas concentrações de substâncias antioxidantes em frutos de *Actinidia deliciosa*, identificando altos teores de vitamina C, compostos fenólicos e flavonoides. Vários estudos mostram que o crescimento de células cancerígenas pode ser inibido com os extratos dos frutos de *Actinidia deliciosa*, além de seu efeito protetor contra lesões oxidativas do DNA (SONG, 1984 *apud* PAL *et al.*, 2015) e (COLLINS *et al.*, 2001).

O organismo humano desenvolveu mecanismos de defesa contra a ação dos radicais livres, incluindo o sistema enzimático de defesa (catalase, superóxido dismutase) e o não enzimáticos como ácido úrico, melanina. No entanto, fontes externas de antioxidantes são fundamentais no combate aos radicais livres, principalmente os obtidos da alimentação de origem vegetal, incluindo hortaliças e frutas (LAGUERRE; LECONTE; VILLENVEVE, 2007).

A vitamina C (ácido L-ascórbico) é um composto de caráter hidrossolúvel, importante na regulação do organismo. Ela previne uma série de doenças como o escorbuto, contribui na prevenção e na absorção de colágeno, de ferro inorgânico além de fortalecer o sistema imunológico (LEE; KADER, 2000).

Frutas e legumes, em geral, possuem valor nutricional, uma vez que são fontes de vitaminas, carotenos, compostos fenólicos, e outras substâncias bioativas. Testes *in vivo* e *in vitro* mostram os efeitos antioxidantes dos carotenoides, flavonoides e compostos fenólicos (FARNHAM, 2003). De acordo com Correa *et al.* (2000), existe uma correlação significativamente positiva entre o alto consumo de frutas ricas em vitaminas e substâncias antioxidantes e risco diminuído de câncer gástrico, além de fortalecimento do sistema imune.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAL VEGETAL

Frutos maduros e frescos de *A. deliciosa* foram obtidos em uma frutaria da cidade de Patos de Minas, MG (18°31'40.34"S e 46°32'19.75"O). Posteriormente, a espécie foi identificada, registrada e armazenada no herbário *Mandevilla* sp. Em seguida, o fruto foi levado para o laboratório de Citoenética e Mutagênese localizado no Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM.

3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO

O extrato aquoso foi obtido a partir de 100g de *A. deliciosa*, conforme técnica descrita por Caceres *et al.* (2002). Foram pesadas, descascadas e maceradas as 100g de polpa do fruto e, posteriormente, dissolvidas em água osmose reversa, na proporção 1:2 (p:v). O extrato foi então filtrado em filtro millipore® (0,22 µm) e armazenado por, aproximadamente, 24 horas, em frasco âmbar estéril, mantido sob refrigeração. No tratamento, foram utilizadas as concentrações de 100, 80 e 60%, isoladas e em associação com doxorubicina (0,4mM).

3.3 CONTROLE POSITIVO: DOXORRUBICINA

Cloridrato de Doxorubicina, CAS: 23214-92-8, é um antibiótico das antraciclinas, extraído a partir do processo de fermentação do fungo *Streptomyces peuceitius* var. *Caesius* (SILVA; CAMACHO, 2005). Por se tratar de um antibiótico antitumoral, desencadeia efeitos, geralmente, por meio da ação direta sobre o material genético, promovendo mutações e desenvolvimento de tumores (CHABNER; CALABRESI, 1996). No presente trabalho, foi utilizado como controle positivo na concentração de 0,4 mM, lote GPL5112, estocado no Laboratório de Citogenética e Mutagênese – LABCIM, do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM.

3.4 TESTE PARA A DETECÇÃO DE CLONES DE TUMOR EPITELIAL (*wts*) EM *Drosophila melanogaster*

3.4.1 Cruzamento

Para o teste de detecção de tumor em *Drosophila melanogaster*, foram utilizadas duas linhagens distintas, a linhagem multiple wing hair (*mwh/mwh*) e a linhagem warts (*wts/TM3*). O cruzamento foi realizado entre machos *mwh/mwh* e fêmeas virgens da linhagem *wts/TM3*. As linhagens permaneceram acasalando por aproximadamente 8 horas e foram transferidos para frascos de postura contendo meio adequado a base de fermento e açúcar, para proceder a postura dos ovos.

Desse cruzamento, foram obtidas larvas com dois genótipos distintos *wts* +/- *mwh* e *mwh/TM3*, as quais foram tratadas com três diferentes concentrações do extrato da polpa de kiwi (60, 80 e 100%), isoladas e em associação com DXR (0,4mM).

3.4.2 Tratamento

Para o tratamento com o extrato aquoso de kiwi, as larvas, oriundas do cruzamento supracitado, foram transferidas para frascos contendo 1,5 g de meio alternativo (purê de batatas) com as diferentes concentrações de extrato de *Actinidia deliciosa* (Adel) isolado ou em associação com doxorrubicina. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo, e a água osmose reversa como controle negativo. Devido à fotossensibilidade do composto doxorrubicina, os frascos foram revestidos com papel alumínio.

3.4.3 Análises das moscas

Após a metamorfose, as moscas adultas foram transferidas para recipientes contendo etanol 70% para conservação do corpo dos indivíduos. Na análise, apenas as moscas portadoras do gene marcador *wts* foram analisadas. Tais indivíduos são caracterizados por tricomas fenotipicamente selvagens (pelo longo). Já moscas com tricomas curtos foram descartadas. Posteriormente, os indivíduos foram analisados individualmente em placa escavada, contendo glicerina, por meio de lupa estereoscópica e com auxílio de pinças entomológicas. A posição de cada tumor foi observada e transcrita para uma planilha padrão, que separa quantitativamente a incidência de tumores nas regiões dos olhos, cabeça, asas, corpo, pernas, halteres e o total de tumores por mosca, em cada concentração analisada.

3.4.4 Análises estatísticas

Para avaliar se houve ou não diferença estatística entre os tratamentos com as diferentes concentrações em Kiwi e os controles, foi utilizado o teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney, utilizando-se um nível de significância = 0,05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A *Drosophila melanogaster* é muito utilizada para testes laboratoriais de diversas substâncias, e sua eficiência para a indução de tumores pode ser observadas nos trabalhos de Furtado e Nepomuceno (2012), Alves e Nepomuceno (2012). Do mesmo modo, o presente trabalho também fez o uso desse organismo teste com intuito de avaliar a frequência de formação de tumores epiteliais de diferentes concentrações do extrato aquoso de *A. deliciosa*.

Neste contexto, devido à necessidade de um alto número de indivíduos para a análise estatística, a taxa de mortalidade das larvas, mensurado pela quantidade de indivíduos que completaram a metamorfose, deve ser inferior a 70%. Concentrações com índice de toxicidade maior que 70% são excluídas. Em todas as concentrações testadas, obtiveram-se taxas de sobrevivência superiores a 80% (Gráfico 1), incluindo-se os controles positivo (DXR 0,4 mM) e negativo (água osmose reversa). Dessa forma, as concentrações escolhidas para o presente estudo foram as concentrações de 60, 80 e

100%.

Análise dos indivíduos com fenótipo “pelo longo” gerou os resultados apresentados na Tabela 1, a qual mostra a frequência de tumores encontrados em diferentes segmentos do corpo de *Drosophila melanogaster*, tratadas com diferentes concentrações de extrato aquoso de *Actinidia deliciosa*, bem como os controles água osmose reversa e doxorrubicina na concentração de 0,4mM.

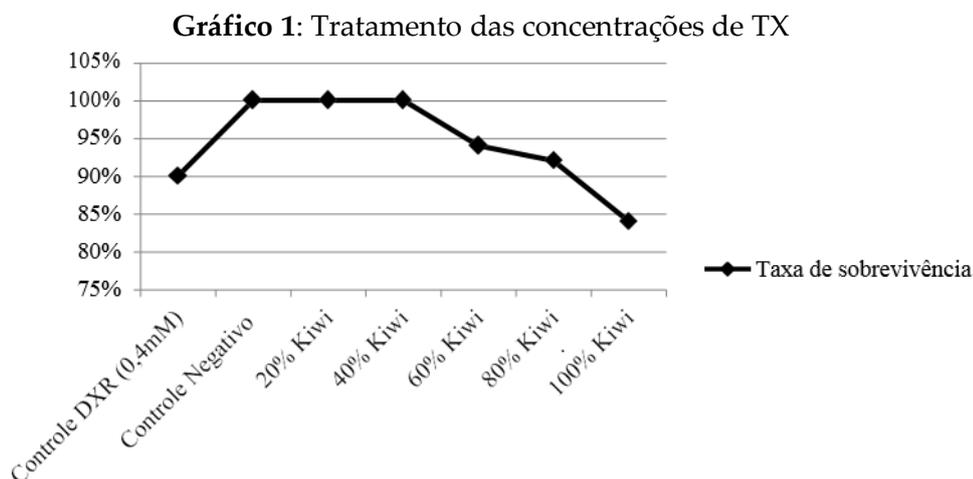


Tabela 1: Frequências de clones de tumores observados descendentes heterozigotos em *Drosophila melanogaster*, tratadas com doxorrubicina e diferentes concentrações do extrato aquoso de *Actinidia deliciosa*.

Tratamentos			Número de tumores analisados						
Adel (%)	DXR (mM)	Nº de Δ	Olhos	Cabeça	Asas	Corpo	Pernas	Halteres	Total
0	0	150	0 (0)	8 (0,05)	7 (0,04)	9 (0,06)	6 (0,04)	1 (0,01)	31 (0,21)
0	0,4	150	8 (0,05)	132 (0,88)	323 (2,15)	319 (2,12)	86 (0,57)	76 (0,5)	944 (6,29)*
60%	0	150	0 (0)	11 (0,73)	8 (0,05)	12 (0,08)	1 (0,01)	1 (0,01)	33 (0,22)
80%	0	150	6 (0,04)	28 (0,18)	25 (0,16)	3 (0,02)	12 (0,08)	0 (0)	74 (0,49)*
100%	0	150	1 (0,01)	43 (0,28)	121 (0,8)	72 (0,48)	24 (0,16)	19 (0,12)	280 (1,86)*
60%	0,4	150	7 (0,04)	168 (1,12)	237 (1,58)	176 (1,17)	145 (0,96)	107 (0,71)	838 (5,58)
80%	0,4	150	6 (0,04)	94 (0,62)	120 (0,8)	140 (0,93)	74 (0,49)	84 (0,56)	518 (3,45)**
100%	0,4	150	4 (0,03)	56 (0,37)	52 (0,34)	73 (0,48)	45 (0,3)	33 (0,22)	262 (1,75)**

Diagnóstico estatístico de acordo com o 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) ($p \leq 0,05$). DXR, doxorrubicina.

Conforme Tabela 1, quando comparada ao controle negativo, a DXR respondeu

conforme o esperado, induzindo uma frequência significativamente aumentada de clones de tumores, quando comparada ao controle negativo. Resultados similares foram encontrados nos estudos de Magalhães, Maciel e Orsolin (2017), em que se utilizou DXR como controle positivo para avaliar o efeito anticarcinogênico da amora-preta (*Rubus spp*) e em que se obtiveram resultados positivos quanto ao uso da DXR. Resultados semelhantes também foram observados nos estudos de Ribeiro e Machado (2016). Vista a eficácia da DXR como indutor de tumor, o seu uso como controle positivo se torna cada vez mais relevante em testes com *Drosophila melanogaster*.

A análise dos resultados do extrato aquoso do kiwi testado isoladamente mostrou aumento nas frequências de clones de tumor, de maneira dose dependente, sendo esse aumento significativo ($p < 0,05$), apenas nas concentrações de 80 e 100%, indicando assim um efeito carcinogênico. Ao avaliar os resultados do extrato aquoso de *A. deliciosa* em associação com DXR, os resultados revelaram redução nas frequências de tumores de maneira dose dependente em todas as concentrações testadas. Todavia, a concentração de Kiwi 60% associada com DXR, embora tenha apresentado efeito redutor com frequência de 5,58 tumores por mosca, não foi significativo estatisticamente, entretanto, nas concentrações de 80% e 100%, houve redução significativa na frequência de tumores (3,45 e 1,75, respectivamente), mostrando que o extrato aquoso de *A. deliciosa* teve ação moduladora de doxorrubicina.

Sabe-se que a DXR age nas células tumorais através do bloqueio do ciclo celular, induzindo o processo de apoptose (KATAMRAJU *et al.*, 2000). É um quimioterápico não específico do ciclo celular. Desse modo, atua tanto nas células que estão sofrendo divisão quanto nas células que estão em repouso, mas sua principal ação é observada durante a fase S do ciclo celular (NEUWALD, 2009).

Entre os mecanismos de ação da DXR, a literatura aponta como os principais: i) intercalação no DNA, levando a inibição da síntese de macromoléculas; ii) geração de radicais livres, levando a danos ao DNA e peroxidação lipídica; iii) alquilação vinculativa ao DNA; iv) formação de ligações cruzadas à molécula de DNA; v) interferência com o desenrolamento ou separação das fitas de DNA e atividade das helicases; vi) efeitos diretos na membrana; vii) indução de danos ao DNA por meio da inibição da enzima topoisomerase II e viii) indução de apoptose em resposta à inibição da enzima topoisomerase II (MINOTTI *et al.*, 2004).

Durante o processo de metabolização, é possível que a DXR entre em reação com a enzima citocromo P450 redutase e gere intermediários de radicais semiquinonas, os quais reagem com oxigênio, produzindo radicais de ânion superóxido que podem gerar peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila que atacam o DNA e oxidam suas bases (CHABNER, 2006).

Desse modo, como a DXR induz lesão ao DNA mediada por radicais livres, os antioxidantes reagem com os radicais livres de modo a prevenir o efeito prejudicial ao organismo. Algumas frutas são ricas em substâncias antioxidantes, as quais ajudam a prevenir doenças cardiovasculares, envelhecimento precoce, câncer, entre outras (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005).

Grande parte dos antioxidantes encontrados em frutos é vitamina C, polifenóis e principalmente flavonoides. A vitamina C tem um potencial protetor contra a

oxidação descontrolada no meio aquoso da célula, pois possui um alto poder redutor. Já os polifenóis são substâncias que tem o poder de neutralizar as moléculas de radicais livres (KLIMCKAC *et al.*, 2007). Nesse sentido, Gomes *et al.* (2012) complementam que o kiwi *in natura* e sua poupa possuem vitamina C em elevadas concentrações.

Esses resultados sugerem que, em altas doses, os antioxidantes presentes no extrato aquoso da *A. deliciosa* podem se comportar como pró-oxidantes, passando a induzir danos no DNA, tendo efeito genotóxico, corroborando os resultados apresentados no presente trabalho, em que *A. deliciosa* apresentou efeito carcinogênico nas concentrações de 80 e 100% quando comparados ao controle negativo.

Ribas e Machado (2018) sugerem efeito pró-oxidante do extrato de folha de romã (*Punica granatum*) em altas concentrações. Segundo Rocha *et al* (2015), algumas substâncias, quando associadas com outras, podem se comportar como oxidantes ou, dependendo das concentrações, como pró-oxidante. Castro (2007), em seus estudos com *Drosophila melanogaster*, observou efeito pró-oxidante em extrato aquoso de pequi (*Caryocar brasiliense*), em que o processo de concentração do extrato para aumentar a concentrações de carotenoides e as vitaminas A, C podem exercer efeito genotóxico.

Bernardes *et al.*(2011), ao analisarem a concentração de fenóis totais e atividade antioxidante da ameixa, da laranja, da maçã e do kiwi, verificaram que *A. deliciosa* apresentou as maiores taxas de sequestro de radicais livres, atividade antioxidante, por meio do teste de DPPH, bem como as maiores concentrações de fenóis totais. Resultados semelhantes foram obtidos por Tripthi *et al.*, (2017), em que o extrato aquoso de *A. deliciosa* foi testado em ratos da linhagem Balb-c e apresentou efeito *scavenger* com 80% de eficácia para radicais superóxido, além de apresentar efeito protetor contra hepatotoxicidade.

Rush *et al.* (2006), analisando, através do Ensaio Cometa o potencial genoprotetor do extrato de *A. deliciosa*, verificou uma significativa atividade protetora do extrato sobre o reparo do DNA contra danos induzidos por radicais livres, sendo essa atividade protetora atribuída aos teores elevados de substâncias antioxidantes.

Os autores acima mencionados corroboram os dados obtidos no presente trabalho, uma vez que o extrato aquoso de *A. deliciosa* apresentou efeito modulador de DXR, verificando proteção ao DNA contra mutações induzidas pela DXR, sugerindo, com base na literatura estudada, que essa proteção pode ser atribuída a seus elevados níveis de agentes antioxidantes.

5 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais delineadas e com base na literatura consultada, pode-se concluir que o extrato aquoso de *Actinidia deliciosa* apresenta efeito modulador dos danos induzidos pela doxorrubicina em *Drosophila melanogaster*, sendo esta proteção mediada pela captura de radicais livres pelas substâncias antioxidantes presentes em sua composição. Também há de se notar que tais moléculas antioxidantes, em quantidades elevadas, induzem danos ao DNA, conferindo ação pró-oxidativa.

REFERÊNCIAS

- ALVES, Élcio Moreira; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação do efeito anticarcinogênico do látex do avelãs (*Euphorbia tirucalli*), por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em. **Perquirere**, v. 9, n. 2, p. 125-140, 2012.
- ANAMI, J. M. Caracterização química e da atividade antioxidante em frutos de diferentes genótipos de kiwi (*Actinidia deliciosa*). 39f. **Trabalho de conclusão de curso** (Curso de graduação em Engenharia Agrônômica). Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Catarinense – Rio do Sul, 2016.
- ANDERSON, D. Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutat Res.**, v. 1, n.350, p. 103-108,1996.
- ANTUNES, M. D. Kiwi: da produção à comercialização. Universidade do Alagôas: **Ciências da Terra**, 2008.
- BAMSHAD, M. J. *et al.* **Genética Médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 350 p.
- BAU, F. C; HUTH, A. Fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento do câncer gástrico e de esôfago. **Revista contexto e saúde**, Ijuí, v. 11, n. 21, p. 16-24, 2011.
- BERNARDES, N. R; TALMA, S. V; SAMPAIO, S. H; NUNES, C. R; ALMEIDA, J. A. R; OLIVEIRA, D. B. Atividade antioxidante e fenóis totais de frutas de Campos dos Goytacazes RJ. **Perspectivas Online**, v.1, p.53-59, 2011.
- BRASILEIRO FILHO, Geraldo; PEREIRA, Fausto Edmundo Lima; GUIMARÃES, Romeu Cardoso. Distúrbios do Crescimento e da Diferenciação Celular In: BRASILEIRO FILHO, Geraldo. **Bogliolo: patologia geral**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, cap. 8, p.173-234.
- CACERES, A. *et al.* Qualidade de kiwis minimamente processados e submetidos a tratamento com ácido ascórbico, ácido cítrico e cloreto de cálcio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 679-685, Brasília-DF, 2002.
- CASTRO, Antônio Joaquim de Souza *et al.* Atividade recombinogênica induzida pelo extrato aquoso de pequi (*Caryocar brasiliense*) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, 57f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.
- CAVALCANTI JÚNIOR, Geraldo Barroso; KLUMB, Claudete Esteves; MAIA, Raquel C. p53 e as hemopatias malignas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 419-427, 2002.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos

GRAF, U.; WURGLER, F. E.; KATZ, A. J. *et al.* Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, v.6, p.153-188, 1984.

GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* **Introdução a genética**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

GRIFFITH, A. J. F. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

GUERRA, Maximiliano Ribeiro *et al.* Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Rev bras cancerol**, v. 51, n. 3, p. 227-34, 2005.

HEIFFIG, L. S. *et al.* Caracterização físico-química e sensorial de frutos de kiwi minimamente processado armazenados sob refrigeração. **Revista Ibero-americana de Tecnologia Postcosecha**, v. 8, n. 001, p. 26-32, Hermosillo-México, 2006.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2012. 129 p.

JAUREGUI, E.; PERALTA, E.; CARRILLO, G. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 48, n. 2, p. 85-88, 1995.

JORDE, L. B. *et al.* Genética do câncer. In: JORDE, L. B. *et al.* **Genética médica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. cap. 11, p. 261-284.

KATAMRAJU, S.; KONOREV, E. A.; JOSEPH, J.; KALYANARAMAN, B. Doxorubicin-induced apoptosis and endothelial cells and cardiomyocytes is ameliorated by nitrene spin traps and ebselen. Role of reactive oxygen and nitrogen species. **J. Biol. Chem.**, n. 275. p. 33585-33592. 2000.

KLIMCZAK, I. *et al.* Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3-4, p. 313-322, 2007.

KONG, Q.; LILLEHEI, K. O. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. **Med Hypotheses**, Denver, v. 51, n. 5, p.405-409, 5 maio 1998.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENUEVE, P. Evaluation of the ability of antioxidant counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Review. **Progress in Lipid Research**, v.46, p. 244-282, 2007.

LEE, D. B. *et al.* Quercetin, the active phenolic component in kiwifruit, prevents hydrogen peroxide-induced inhibition of gap-junctine intercellular communication. **British Journal of Nutrition**, v.104, p.164-170, 2010.

LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Post harvest Biology and Technology**, v. 20, p. 207 – 220, 2000.

LOPES, A. A.; OLIVEIRA, A. M. PRADO, C. B. C. Principais genes que participam da formação de tumores. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 2, n. 2, 2002.

LOURO, I. D. *et al.* **Genética Molecular do Câncer**. 2. ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

MACHADO, M. I. R. *et al.* **Poder antioxidante e vitamina C de polpas de kiwi nacional e chileno**. Rio Grande do Sul, 2010.

MAGALHÃES, M. D.; MACIEL, A. D.; ORSOLIN, P. C. 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. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, v. 6, n. 1, 2017.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SAVATORELLI, E.; CAIRO, C.; GIANNI, A. L. Antracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Rev. Pharmacol**, v.56, p. 185-229, 2004.

MOTOHASHI, N. *et al.* J. Cancer prevention and. therapy with kiwi fruit in Chinese folklore medicine: a study of kiwi fruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 357-364, 2002.

MUNHOZ, M. P. *et al.* Efeito do exercício físico e da nutrição na prevenção do câncer. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 37, n. 2, p. 09-16, 2016.

NEUWALD, E. B. Avaliação hematológica, bioquímica e eletrocardiográfica de cães com diferentes neoplasias tratadas com doxorubicina. 93 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias na área de Morfologia, Cirurgia e Patologia Animal). Universidade federal do Rio Grande do Sul. Pós-graduação em Ciências veterinárias. Rio Grande do Sul. 2009.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quím Nova**, v.32, n.3, p. 689-702, 2009.

PAL, R. S. *et al.* Physicochemical and Antioxidant Properties of Kiwifruit as a Function of Cultivar and Fruit Harvested Month. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.58, n. 2, p. 262-271, 2015.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Ed. Varela, 2005. 95 p.

PINTO, A. P.; CRUM, C. P. Natural history of cervical neoplasia: defining progression and its consequence. **Clinical Obstetrics And Gynecology**, v. 43, n. 2, p.352-362, jun. 2000.

PITOT, H. C. Stages in neoplastic development. In: SCHOTTENFELD, D.; FRAUMENI JUNIOR, J. F. **Cancer Epidemiology and Prevention**. Nova Iorque: Oxford University Press. 1996. p. 65-79.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **Eur J Pharmacol**, n. 533, p. 222-39, 2006.

RAJENDRASOZHAN, S.; YANG, S. R.; EDIRISINGHE, I.; YAO, H.; ADENUGA, D.; RAHMAN, I. Deacetylases and NF-kappaB in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD. **Antioxid Redox Signal**, n. 10, p. 799- 81, 2008.

READ, A. P.; STRACHAN, T. **Genética Molecular Humana**. 2. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002.

RESENDE, P. A. Avaliação citogenética da resposta ao tratamento quimioterápico em mulheres portadoras de câncer de mama. 2007. 76 f. **Dissertação** (Mestrado em Patologia Clínica) - Programa de Pós-graduação em Patologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2007.

RIBAS, A. V. S.; MACHADO, N. M. Efeito carcinogênico e anticarcinogênico do extrato aquoso da folha da romã (*Punica Granatum*), por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (warts) em. **Perquirere**, v. 15, n. 1, p.269-284, 2018.

RIBEIRO, C. R.; MACHADO, N. M. Avaliação do efeito anticarcinogênico do cogumelo do sol (*Agaricusblazei*), por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (warts) em. **Revista Perquirere**, v. 13, n. 2, p. 203-217, 2016.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. cap.1. p. 21-27.

ROCHA, L. D. L. S. *et al.* Drosophila: um importante modelo biológico para a pesquisa e ensino de genética. **ScireSalutis**, Aquidabã, v.3, n.1, p.37-48, 2013.

RUSH, E.; FERGUSON, L. R.; CUMIN, M.; THAKUR, V.; KARUNASINGHE, N.; PLANK, L. Kiwi fruit consumption reduces DNA fragility: a randomized controlled pilot study in volunteers. **Nutrition Research**, v. 26, n. 5, p. 197–201, 2006.

SILVA, C.E.V.; CAMACHO, A. A. Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento

prolongado com doxorrubicina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 57, n. 3, p. 300-306, jun. 2005.

SIMARELLI, M. **Frutas do Brasil. Frutas e derivados**. 1. ed. Ano 01. abr. 2006.

SONG, M; GARRETT, W. S; CHAN, A. T. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. **Gastroenterology**, v. 148, n. 6, p. 1244-1260, 2015.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais, **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 3, p. 202-210, jul./set. 2011.

SOUZA, P. V. D.; MARODIN, G. A. B.; BARRADAS, C. I. N. **Cultura do kiwi**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1996, 104 p.

STIPANUK, M. H.; CAUDILL, M. A. **Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition**. 3. ed. St. Louis: Elsevier, 2012. 968 p.

SUCUPIRA, N. R. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

SUCUPIRA, N. R. *et al.* Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2015.

TAVARINI, S. *et al.* Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. **Food Chemistry**, v. 1072, p.82-288, 2008.

TRIPTHI, S.; MAHAMMAD, S. B.; SATISH, S.; KARUNAKARA, H. A Review on *Actinidia deliciosa*. **International Journal of Pharma and Chemical Research**, v. 3, n. 1, p. 103-108, 2017.

WILLS, R. B. H.; LIM, J. S. K.; GREENFIELD, H. Composition of Australian Foods. **Food Technology in Australia**, 1986.