

Efeito modulador do óleo de rícino, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*

Modulating effect of castor oil assayed by the detection test of epithelial tumor clones (warts) in Drosophila melanogaster



Matheus Gustavo Soares Santos

Graduando do curso de Medicina Veterinária (UNIPAM). e-mail: soarmatheus@hotmail.com

Rosiane Gomes Silva Oliveira

Professora orientadora (UNIPAM). e-mail: rosianegso@unipam.edu.br

RESUMO: O óleo de rícino é um composto extraído da semente da mamoneira (*Ricinus communis*), que possui diversas atividades no setor médico-farmacêutico, como antioxidante, cicatrizante e anti-inflamatório. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito carcinogênico e anticarcinogênico do óleo de rícino por meio do teste *warts* em *Drosophila melanogaster*. Os resultados mostraram que o óleo de rícino não apresentou aumento significativo ($p > 0,05$) nas frequências de tumores das concentrações isoladas (0,5%, 1% e 1,5%), quando comparadas ao controle negativo (Tween 80 a 1%). Contudo, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando as diferentes concentrações de óleo de rícino foram associadas à doxorubicina e comparadas ao controle positivo (DXR 0,4mM). Sendo assim, nas presentes condições experimentais, o óleo de rícino não apresentou efeito carcinogênico, porém apresentou efeito modulador, pois foi capaz de modular os efeitos induzidos pelo quimioterápico doxorubicina.

PALAVRAS-CHAVE: *Drosophila melanogaster*. Óleo de rícino. *Warts*.

ABSTRACT: The castor oil is a compost extracted from the seed of castor-oil-plant (*Ricinus communis*) that have many applications in medical-pharmaceutical industry, as antioxidant, cicatrizing agent, and anti-inflammatory. In this context, this study aimed to assay the carcinogenic and anticarcinogenic effects of castor oil using the *warts* test in *Drosophila melanogaster*. The results showed that castor oil did not present a significant increase ($p > 0.05$) in tumor frequencies of the isolated concentrations (0.5%, 1% and 1.5%) when compared to the negative control (Tween 80 a 1%). However, there was significant statistical difference ($p < 0,05$) when the different concentrations of castor oil were associated with doxorubicin and compared with the positive control (DXR 0,4mM). Therefore, in this experimental conditions, the castor oil did not preset carcinogenic effects, but presented anticarcinogenic activity, because it could inflect the effects induced by the chemotherapeutic doxorubicin.

KEYWORDS: *Drosophila melanogaster*. Castor oil. *Warts*.

1. INTRODUÇÃO

O emprego de plantas medicinais, para prevenção, tratamento e cura de diversas doenças é uma das mais remotas formas de atividade medicinal da sociedade. Ao longo de décadas, esse método permitiu o desenvolvimento de diversos procedimentos clínicos usuais. Porém, mesmo com o avanço da medicina alopática, as populações carentes ainda apresentam resistência em sua utilização, devido à dificuldade de acesso aos hospitais e de aquisição de medicamentos. Tais dificuldades associadas à fácil obtenção de plantas medicinais contribuem para o seu uso principalmente nos países subdesenvolvidos (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Dentre os países subdesenvolvidos, o Brasil é o país que contém a maior parte da flora, cerca de 15 a 20% do total mundial (BRASIL, 2006). Esta rica diversidade, além de ser uma importante ferramenta de estudo e de exploração de seus recursos, é responsável pela formulação de novas substâncias bioativas, que, associadas à vasta diversidade de tradições, geram um reflexo da imensa medicina popular brasileira (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Nesse âmbito, os produtos naturais são reconhecidamente importantes no desenvolvimento de drogas terapêuticas inovadoras (SANTOS; LANA; SILVA, 2002). Deste modo, as pesquisas farmacológicas e a criação de novas drogas sofrem grandes influências pelas propriedades das plantas medicinais, bem como matérias-primas para fins terapêuticos (WHO, 1998 *apud* BRASIL, 2006).

De acordo com os novos modelos de desenvolvimento social e econômico fundamentados nos recursos renováveis, os vários benefícios do uso de plantas medicinais estão longe de estarem esgotados. As novas ciências e suas necessidades, possivelmente, encontraram soluções no reino vegetal, por intermédio da descoberta e do desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas ou com aplicação na tecnologia farmacêutica e fitoterápica com maior eficácia de ação em variadas enfermidades (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2003).

Em meio aos vários exemplos de substâncias provenientes de plantas consideradas medicinais, destaca-se o óleo de rícino, popularmente conhecido como óleo de mamona. A mamoneira (*Ricinus communis* L.), de acordo com a região, também pode ser conhecida como carrapateira, palma christi, *castor bean*, dentre outros. A mamoneira pertence à família Euphorbiaceae e é uma planta oleaginosa, de origem tropical, provinda da região leste da África (SILVA; CASAGRANDE JÚNIOR; MAGNANI, 2007).

O óleo de mamona (rícino) é extraído da semente, o qual compreende 48,6% (m/m) do seu peso total (SCHNEIDER, 2003). O principal componente do óleo é o ácido ricinoleico (90%), que lhe confere inúmeras aplicações, por se tratar de uma matéria-prima versátil e de fonte renovável (HOFFMAN; MEDEIROS; SOARES, 2007).

Mediante a ricinoquímica (a química do óleo de rícino), diversos produtos podem ser elaborados a partir do óleo em setores médico, farmacêutico e de cosméticos (CANGEMI; SANTOS; CLARO NETO, 2010). Sua principal forma de uso conhecida pela população é como laxante, salvo que o óleo também apresenta propriedades relacionadas a ações germicida, antioxidante, cicatrizante e anti-inflamatória, havendo relatos da sua

utilização em tratamentos contra dores reumáticas, úlceras de pele e micoses (FRAZÃO *et al.*, 2015).

Outra substância encontrada na semente da mamona é a ricina, uma proteína que não é encontrada em nenhuma outra parte da planta. Ela é responsável pela toxidez da torta de mamona, que é um adubo orgânico oriundo do processamento da semente, além de ser uma das mais potentes proteínas tóxicas conhecidas pelo homem. Na área médica ela vem sendo estudada como forma de matar células cancerígenas (HOFFMAN *et al.*, 2007).

O câncer é uma grande complicação da saúde pública, que abrange nível mundial, sendo responsável por mais de 12% das causas de óbitos no mundo, ocasionando aproximadamente 7 milhões de mortes anualmente. De acordo com uma estimativa realizada em 2005 pela International Union Against Cancer (UICC), em 2020 o número de casos de câncer alcançará mais de 15 milhões (INCA, 2006).

A sua definição científica atribui-se ao termo neoplasia, precisamente aos tumores malignos, como sendo uma enfermidade caracterizada pelo crescimento instável de células transformadas (ALMEIDA *et al.*, 2005). A justificativa para este crescimento está intimamente relacionada a princípios genéticos e à exposição dos indivíduos a fatores de risco cancerígenos (INCA, 2006).

Nesse contexto, as grandes corporações de pesquisas que estudam o câncer têm ressaltado a importância de se estudar novas substâncias químicas presentes em alimentos e plantas que possam ser capazes de combater essa doença (SANTOS; LANA; SILVA, 2002). Deste modo, a utilização da *Drosophila melanogaster* como organismo modelo tem sido apresentada como importante ferramenta na identificação do potencial carcinogênico e anticarcinogênico de várias substâncias por meio dos testes biológicos, como o para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) (FONSECA; PEREIRA, 2004). Entretanto, ainda não foi realizada nenhuma pesquisa para avaliar o factível efeito carcinogênico e/ou anticarcinogênico do óleo de rícino em *Drosophila melanogaster*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. CÂNCER

O câncer é um grupo de doenças causadas pelo crescente aglomerado de mutações no genoma de uma célula. Estas mudanças provocam modificações na representação ou função de genes-chave para a conservação da homeostasia celular. Essas alterações genéticas podem modificar uma célula normal em uma célula transformada, que se particulariza por não responder mais aos sinais de comando de proliferação, morte e diferenciação que administram a comunidade celular (BELTRÃO-BRAGA; TEIXEIRA; CHAMMAS, 2006).

O desenvolvimento de diversas formas de câncer é consequência da relação entre fatores endógenos e ambientais, sendo o de maior destaque a dieta inadequada (GARÓFOLO *et al.*, 2004). De acordo com Costa Júnior e Coutinho (2009), maus hábitos alimen-

tares (35%), tabagismo (30%) e um conjunto de condições relacionadas à exposição a radiações ionizantes, submissão a contextos ambientais estressantes, fatores genéticos, ét-nicos e ocupacionais (35%), estão entre as diversas fontes geradoras de processos cancerígenos.

O processo de formação do câncer é conhecido como carcinogênese. Geralmente ele acontece lentamente e pode levar vários anos para que uma célula cancerígena dê início a um tumor perceptível. Simplificadamente, esse processo passa por três estágios antes de originar a neoplasia, sendo eles: iniciação, período em que as células sofrem exposição de um agente carcinogênico (agente oncoiniciador); promoção, quando a célula iniciada sofre efeito dos agentes cancerígenos (oncopromotores), sendo transformada lentamente em uma célula maligna; progressão, fase final caracterizada pelo crescimento descontrolado e pelo surgimento dos primeiros sinais clínicos da doença (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Os principais genes envolvidos na formação de neoplasias são, essencialmente, os que nas células normais estão responsáveis pelo controle do ciclo celular, pela reparação do material genético danificado e pela apoptose. Dentre os genes supressores de tumores, os anti-oncogenes são recessivos, ou seja, o efeito cancerígeno surge quando eles desaparecem ou estão defeituosos nos dois cromossomos do genoma. Já os oncogenes, codificadores de proteínas que favorecem o desvio do controle sobre o processo mitótico e induzem as células a se transformarem em cancerosas, resultam de mutações somáticas e são dominantes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

Os tumores, ou neoplasias, assim designados, formam-se em todo e qualquer tecido e em qualquer faixa etária. Além disso, eles podem conter predisposição de infiltrar-se em tecidos circunvizinhos por contato direto ou por disseminação em regiões distantes, através da circulação linfática ou sanguínea (COSTA JÚNIOR; COUTINHO, 2009).

As neoplasias podem ser classificadas como malignas ou benignas, de acordo com o seu ponto de vista clínico, evolutivo e de comportamento. As malignas apresentam crescimento rápido e provocam perturbações homeostáticas severas que podem ocasionar uma metástase (disseminação em outros tecidos), levando o indivíduo à morte na maioria das vezes. Já uma neoplasia benigna frequentemente não é letal, nem causa sério transtorno ao hospedeiro, constituindo somente uma massa localizada de células que evoluem lentamente (BRASILEIRO FILHO; PEREIRA; GUIMARÃES, 2004).

2.2. MAMONA (*RICINUS COMMUNIS L.*)

A espécie *Ricinus communis l.* (Figura 1), popularmente conhecida como mamona, é uma planta oleaginosa que se desenvolve de forma nativa em várias áreas do Brasil. Ela apresenta-se em diferentes tamanhos, assumindo forma de arbusto com coloração verde avermelhada. As folhas são lobadas e o fruto afigura-se como uma cápsula tricoca com espinhos (SILVA; MENDES; KAGEYAMA, 2009).



FIGURA 1. Mamoneira (*Ricinus communis* L.).
FONTE: COSTA; SOFIATTI; MACIEL (2013).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de mamona, sendo a região nordeste a de maior produção (FAO, 2013). Por se tratar de uma planta de baixo preço de cultivo, por não ser exigente em termos de clima, solo, manejo cultural, e ainda por oferecer diversos produtos finais, a mamona tornou-se muito importante para a economia brasileira (SILVA, 2007).

Dentre os produtos obtidos da oleaginosa, podem-se citar a torta de mamona, glicerina, ricina, polímero, restos vegetais e o óleo (ANTHONISEN, 2007). Graças a essa diversidade de coprodutos, a mamoneira vem adquirindo grande destaque principalmente no setor oleoquímico, originando indústrias de primeira e segunda gerações, que salientam a ricinoquímica (SCHNEIDER, 2003).

A ricina é uma glicoproteína encontrada no endosperma das sementes da mamona e completamente ausente nas outras partes da planta, bem como no óleo extraído do grão. Ela é classificada como uma filotoxina e é uma das substâncias proteicas mais tóxicas conhecidas pela sociedade, equiparando-se com as do botulismo, difteria e tétano. Na medicina, a ricina tem se destacado como forma de matar células cancerígenas por meio da inibição de síntese de proteínas (ANTHONISEN, 2007).

Desse modo, o fruto da mamoneira exhibe aproveitamento integral, obtendo-se como produto essencial o óleo de rícino, invariável sob diversas circunstâncias de pressão e temperatura. Como subproduto da extração do óleo obtém-se a torta (contém a parte tóxica, a ricina), a qual é amplamente utilizada na adubação e correção de solos após sua preparação (COSTA *et al.*, 2004).

O óleo é obtido da semente de mamona e este se apresenta muito viscoso, espesso, com uma cor que pode variar entre incolor e amarelo. O ácido ricinoleico (ômega 9) é o principal constituinte do óleo de rícino, o que lhe confere características químicas únicas em relação a outros óleos vegetais. Ele é um ácido graxo incomum, que apresenta 18 carbonos, com um grupo carbonila no C₁, uma insaturação *cis* no C₉ e uma hidroxila no C₁₂. Além do ácido ricinoleico, também são encontrados no óleo o ácido didroxiesteárico, oleico, linoleico, linolênico e palmítico. Durante a fase insaponificável do óleo de rícino, pode ser identificado cerca de 1% de esteróis e tocoferóis. Dentre os esteróis encontrados estão β -sitosterol, stigmasterol e campesterol. Quanto aos tocoferóis, identifica-se principalmente o α -tocoferol, que contém grande atividade biológica, com poder antioxidante e potencial vitamínico (SCHNEIDER *et al.*, 2007).

O processo de extração do óleo pode ocorrer de duas maneiras: por meio da prensagem, a frio ou a quente, ou por intermédio de solvente. No entanto, quando o óleo é destinado a fins medicinais, a semente deve passar pelo processo de prensagem a frio, obtendo, assim, um óleo límpido e incolor, livre de ricina e com pequeno teor de impurezas e acidez. Por fim, este ainda deve passar por um processo de refino (SCHNEIDER, 2003).

O óleo de rícino possui diversas aplicações. Ele pode ser utilizado na fabricação de tintas, isolantes e na manufatura de cosméticos e medicamentos farmacêuticos. Também é usado em inúmeros processos industriais, como a fabricação de anilinas, desinfetantes, germicidas, fungicidas e inseticidas, além de nylon e matéria plástica, onde tem grande importância (COSTA *et al.*, 2004).

Na área médica, o óleo também apresenta várias utilidades de grande importância, como, por exemplo, os biopolímeros, uma inovação na produção de órgãos artificiais do corpo humano. O poliuretano, um polímero obtido a partir do óleo de rícino, que passou a ser utilizado como fonte de matéria-prima na fabricação de próteses ósseas, substituiu as pesadas feitas de platina e cimento acrílico (CANGEMI; SANTOS; CLARO NETO, 2010).

De acordo Schneider (2003), em forma de medicamento, o óleo de rícino apresenta efeito purgativo e tem habilidade de penetrar facilmente na pele. Também contém potencial de estimular o fígado, a vesícula e o cólon, e quando absorvido, é convertido em prostaglandinas, impossibilitando alguns dos sintomas de carência dessa substância, como artrites, pressão sanguínea alta e distúrbios menstruais. Além das várias ações citadas, compressas do óleo são usadas para reduzir inflamações e melhorar a assimilação intestinal.

Em relação ao potencial antimicrobiano do óleo de mamona, o ácido ricinoleico exerce seu efeito na estrutura da parede celular bacteriana, coagulando e desnaturando proteínas. Especificamente, age modificando a permeabilidade da membrana plasmática por íons de potássio e hidrogênio. Conseqüentemente, a variação dos gradientes de íons leva à danificação dos principais processos da célula, como transporte de elétrons, etapas da fosforilação e outras reações que dependem de enzimas, ocasionando a perda do controle quimiostático da célula afetada, provocando, assim, a morte bacteriana (GIL *et al.*, 2012). Além do efeito antimicrobiano do óleo, seu detergente exerce atividade antifún-

gica, sendo utilizado na inibição do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos (TAKANO *et al.*, 2007).

2.3. DOXORRUBICINA

A doxorubicina (DXR) é um antibiótico antineoplásico glicosídico, pertencente à classe das antraciclinas (ANT), isolado de cultura do fungo *Streptomyces peucetius* var. *caesioides* (NASCIMENTO; MARTINS, 2005). Apesar de existirem diversos fármacos utilizados em tratamentos oncológicos, a doxorubicina é a mais utilizada contra a maioria dos tumores em animais e seres humanos (CRAIG; STITZEL, 2014). De acordo com Chu e Sartorelli (2006), a DXR contém amplo espectro contra tumores malignos hematológicos e sólidos, como carcinomas de mama, endométrio, testículo, tireoide, estômago, fígado, ovário, pulmão e endométrio, no entanto, seu uso é reduzido em consequência de sua cardiotoxicidade.

Essa classe de antibiótico contém uma estrutura de anel tetracíclico ligado a um açúcar incomum, a daunosamina. Todos os compostos citotóxicos desse grupo possuem constituintes quinona e hidroquinona em anéis adjacentes, o que lhes possibilita ser doadores e aceptores de elétrons (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). Esse anel, capaz de sofrer redução de um elétron, produz radicais livres (RL) de oxigênio, envolvendo-se na transferência de elétrons. Por conseguinte, essas substâncias intensamente ativas conseguem reagir com macromoléculas teciduais normais e malignas (CRAIG; STITZEL, 2014).

Quanto ao seu mecanismo de ação, a doxorubicina une-se ao DNA e impede tanto a síntese de DNA quanto a de RNA, mas sua fundamental ação citotóxica é mediada pelo efeito da enzima topoisomerase II, cuja atividade é muito intensa nas células em desenvolvimento. Após os filamentos serem cortados, a doxorubicina insere-se entre pares de bases no DNA estabilizando o complexo DNA-topoisomerase II, suspendendo o processo neste ponto (RANG *et al.*, 2011).

Em razão da sua capacidade de ocasionar necrose tecidual, a doxorubicina não é administrada por via subcutânea ou intramuscular. Consequentemente, é administrada por via intravenosa, já que não é totalmente absorvida quando administrada por via oral (BASTOS; CARNEIRO; SOUSA; 2014).

Nesse contexto, as principais toxidades geradas pela doxorubicina acometem o coração e a medula óssea. Em casos agudos, o fármaco provoca arritmias cardíacas transitórias e depressão da função do miocárdio. Os efeitos menos severos incluem flebite e esclerose das veias utilizadas para injeção e hiperpigmentação dos leitos ungueais e sulcos da pele (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

2.4. TESTE PARA DETECÇÃO DE CLONES DE TUMORES EPITELIAIS (WARTS) EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

A espécie *Drosophila melanogaster* (Figura 2), popularmente conhecida como mosca da fruta, é usada para monitorar danos genéticos causados por agentes químicos, com um histórico de mais de 50 anos. Ela também tem sido utilizada intensamente em

curtos testes para a investigação, mutação e identificação de agentes cancerígenos e/ou anticancerígenos (NEPOMUCENO, 2015).



FIGURA 2. Casal de *Drosophila melanogaster*: o macho (direita) é menor e contém o pente sexual indicado pelas setas, e a fêmea (esquerda) é maior e não apresenta o pente sexual.

FONTE: SILVA (2011)

A *D. melanogaster* é um organismo eucarionte, pertencente à ordem Díptera, com $2n = 8$ cromossomos, sendo 3 pares de autossomos e 1 par sexual. Na sua forma adulta, possui aproximadamente 2 mm de comprimento, três pares de pernas e apenas um par de asas, já que o segundo par foi alterado e está dentro de pequenos apêndices denominados halteres, que auxiliam na aerodinâmica para o voo. Essa mosca tem sido largamente usada pelos pesquisadores por ser de fácil manutenção em laboratório e por ter um ciclo reprodutivo curto (cerca de 10 dias a 25° C), fornecendo um grande número de indivíduos por progênie (SNUSTAD; SIMMONS, 2006).

Dentre as várias vantagens que fazem dela organismo teste em pesquisas de substâncias com atividade genotóxica, destaca-se a semelhança das suas reações metabólicas com as dos mamíferos, o que também oferece grande grau de similaridade com humanos, tornando propícias inúmeras pesquisas na indução e na propagação de tumores nessas moscas, o que fornece novas informações sobre a carcinogênese. Vários proto-oncogenes e supressores de tumores de mamíferos são conhecidos em *Drosophila* (EEKEN *et al.*, 2002).

No seu ciclo de vida, o zigoto transfigura-se em larva de primeiro instar, que é móvel e se alimenta rapidamente (frutas maduras, fermentos e outros). À proporção que a larva cresce, ela ultrapassa sua cutícula de quitina, abandonando-a e desenvolve uma nova, compreendendo o segundo instar do desenvolvimento. Um maior crescimento resulta em outra cutícula para produzir a larva de terceiro instar, a qual aparece por volta de cinco dias após a fertilização. O corpo da larva diminui e a cutícula se espessa e acumula pigmento na medida em que se transforma no revestimento quitinoso da pupa. Já as estruturas adultas, como cabeça, asas e pernas, desenvolvem-se no envoltório pupal

a partir dos discos imaginiais, presentes na larva como pequenos agrupamentos de células que multiplicam (SNUSTAD; SIMMONS, 2012).

Como descrito anteriormente, a *D. melanogaster* é utilizada em diversas pesquisas devido à alta similaridade de genes entre esta e os mamíferos. Dentre os diversos tipos de pesquisas destacam-se os testes para avaliação de efeitos mutagênicos e carcinogênicos. A exemplo, tem-se o teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) para avaliar o efeito carcinogênico e/ou anticarcinogênico de inúmeros compostos, como medicamentos, produtos naturais, entre outros (FONSECA; PEREIRA, 2004).

O teste faz uso de um gene marcador, o *warts* (*wts*), um gene mutante recessivo e letal em homozigose nos zigotos. Devido a essa letalidade, o alelo *warts* é preservado na linhagem estoque com a presença de um balanceador cromossômico (*TM3*). Por meio do cruzamento entre as linhagens *wts/TM3* e *mwh/mhw* são adquiridas larvas heterozigotas (*wts/+*). Caso ocorra a perda da heterozigose, nas células do disco imaginal, serão originados clones tumorais. Os clones são viáveis em conjuntos de células isoladas da larva, porém se manifestam como tumores nas moscas adultas (SIDOROV *et al.*, 2001).

Em relação à sua localização, o gene *wts* encontra-se no cromossomo 3R1005A5, o qual é importante no controle da quantidade e direção da proliferação celular e da morfogênese normal. A deleção desse gene acarreta no desenvolvimento de clones de células grandes e arredondadas (semelhante a verrugas) em vários segmentos da mosca). No entanto, a sua ausência também provoca hipertrofia apical das células epiteliais do disco imaginal (SILVA, 2011).

Os discos imaginiais das larvas de *Drosophila* dispõem de apenas uma única camada celular que se desenvolve nas estruturas epidérmicas das moscas adultas, durante o processo de metamorfose. Essas células apresentam um ciclo celular similar ao das células somáticas de mamíferos (COSTA; OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2011).

3. METODOLOGIA

3.1. AGENTES QUÍMICOS

3.1.1. ÓLEO DE RÍCINO (*RICINUS COMMUNIS* L.)

O óleo utilizado no procedimento foi adquirido comercialmente como Óleo de Rícino 100% e, em seguida, diluído em Tween 80 a 1%, para se obter as concentrações usadas no experimento, as quais foram de 0,5%, 1% e 1,5%.

Esse composto foi produzido pelo laboratório Farmax, pertencente ao lote 0059, registro CAS 8001-79-4, comercializado na forma de frasco, contendo 30 mL.

3.1.2. DOXORRUBICINA

O cloridrato de doxorubicina (DXR), comercializado como Adriblastina®, foi o composto utilizado como controle positivo na presente pesquisa, uma vez que possui efeito genotóxico e carcinogênico comprovado (CARDOSO; NEPOMUCENO, 2015; ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2012). O mesmo foi utilizado na concentração de 0,4 mM,

preparada a partir da diluição de 0,03538g de Adriblastina em 25 mL de água osmose reversa.

Esse medicamento foi produzido pelo laboratório Pfizer, referente ao lote 5PL5023, registro CAS 25316-40-9 e vendido na forma de ampola, contendo 50mg. O medicamento foi armazenado no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas, em temperatura ambiente, protegido da luz, respeitando orientações do fabricante.

3.2. TESTE PARA DETECÇÃO DE CLONES DE TUMORES EPITELIAIS EM *DROSOPHILA MELANOGASTER*

3.2.1. LINHAGENS ESTOQUE, CRUZAMENTO E TRATAMENTO

Para realização do teste *wts*, foram utilizadas duas linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster* (*wts* e *mwh*). Os estoques destas linhagens foram mantidos no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas, em frascos de ¼ de litro, contendo meio de cultura próprio para *D. melanogaster*. Estas foram conservadas dentro de uma incubadora, a temperatura de 25° C e 60% de umidade.

Para a obtenção de larvas heterozigotas (*wts* *+/+* *mwh*) de 72 horas, foi realizado o cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3, Sb1* com machos *mwh/mwh*. Após o acasalamento, os machos e as fêmeas foram transferidos para frascos contendo meio de cultura próprio para postura, uma base sólida de ágar (3% de ágar em água) e uma camada de fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*) suplementado com sacarose, onde as fêmeas depositaram seus ovos. A coleta dos ovos ocorreu por um período de 8 horas. Após 72 horas \pm 4 horas, as larvas foram lavadas com água osmose reversa e coletadas com o auxílio de uma peneira de malha fina.

As larvas de terceiro instar foram submetidas a um tratamento crônico de 48 horas. Para tanto, grupos de aproximadamente 100 larvas foram colocados em frascos contendo 1,5 g de purê de batatas (meio alternativo para *Drosophila*) umedecidos com 5mL de diferentes concentrações do óleo de rícino (0,5%, 1,0 % e 1,5%), isoladas ou em associação com o quimioterápico doxorubicina (0,4 mM) em sistema de cotratamento. Também foram incluídos um controle negativo (Tween 80 a 1%) e um controle positivo (DXR 0,4 mM). Todo experimento foi realizado em triplicata.

3.2.2. ANÁLISE DAS MOSCAS

Decorrido o período de metamorfose das larvas, os indivíduos adultos foram coletados e transferidos para frascos, devidamente identificados, contendo etanol a 70%. Apenas as moscas de pelos longos e finos foram analisadas, ou seja, somente as moscas portadoras do genótipo (*wts* *+/+* *mwh*). As moscas que apresentaram pelos curtos e grossos foram desprezadas, uma vez que não possuem o gene em estudo.

A análise ocorreu em lupa estereoscópica com auxílio de pinças entomológicas. A localização e o número de tumores encontrados foram registrados em um diagrama padrão obedecendo às estruturas do corpo da mosca (olho, cabeça, asa, corpo, perna, halteres).

3.3. 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 $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho fez uso do teste para detecção de clones de tumores epiteliais em células somáticas de *Drosophila melanogaster* para avaliar o potencial carcinogênico e/ou anticarcinogênico de diferentes concentrações do óleo de rícino (0,5%, 1% e 1,5%), isoladas ou associadas à DXR (0,4 mM). Para isso, como controle negativo foi utilizado Tween 80 a 1% e como controle positivo DXR 0,4 mM. Foram analisados 200 indivíduos de cada concentração e os resultados dessa análise são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1. Frequência de clones de tumor observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, tratadas com diferentes concentrações de óleo de rícino, isoladas e associadas ao quimioterápico doxorubicina (DXR 0,4 mM)

Tratamentos		Número de moscas analisadas	Número de tumores analisados							Frequência (Nº de tumores/mosca)
Óleo de Rícino (%)	DXR (mM)		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter	Total	
0	0	200	2	7	6	16	8	1	40	0,20
0,5	0	200	1	19	12	9	6	0	47	0,23
1,0	0	200	0	10	11	5	5	0	31	0,15
1,5	0	200	1	8	8	6	4	1	28	0,14
0	0,4	200	22	60	237	112	80	28	539	2,69 *
0,5	0,4	200	1	13	39	16	9	4	82	0,41 **
1,0	0,4	200	0	15	14	14	7	1	51	0,25 **
1,5	0,4	200	1	11	25	9	6	0	52	0,26 **

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância $p \leq 0,05$.

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

** Valor considerado diferente do controle positivo (DXR 0,4mM) ($p < 0,05$).

DXR, doxorubicina.

Conforme apresentado na Tabela 1, os indivíduos tratados apenas com Tween apresentaram uma baixa frequência de tumores devido à predisposição genética da *Drosophila melanogaster*. Ao analisar a frequência de tumores dos indivíduos tratados apenas

com DXR, é possível notar um aumento significativo ($p < 0,05$) na frequência de tumores, quando comparado ao controle negativo, indicando que a DXR atua como agente indutor de tumor, o que é comprovado segundo Machado e Nepomuceno (2010 e Vasconcelos *et al.* (2017).

Ao avaliar os resultados dos indivíduos tratados com as diferentes concentrações isoladas do óleo de rícino (Tabela 1), é possível observar que nenhuma das concentrações utilizadas apresentou aumento significativo ($p > 0,05$) na frequência de tumores, quando comparadas ao controle negativo, o que indica ausência de efeito carcinogênico nas três concentrações testadas (0,5 %, 1,0%, 1,5%).

Tais resultados encontrados na pesquisa corroboram com informações da literatura. Rowe, Sheskey e Owen (2006) demonstraram que derivados do óleo de rícino não exibem efeitos tóxicos ou irritativos em testes de toxicidade crônica e aguda em animais experimentais. Hirai *et al.* (1994) também demonstraram, por meio do teste de micronúcleo, que o óleo de rícino hidrogenado não apresentou efeito genotóxico em ratos, nos quais os autores utilizaram como grupo-controle solução salina fisiológica e Mitomicina C. Posteriormente, durante um estudo de aberração cromossômica em células V79 de hamsters chineses, utilizando como controle positivo Mitomicina C e Dimetilnitrosamina, Hirai *et al.* (1994) demonstraram novamente seu efeito não genotóxico.

Todavia, ao avaliar os resultados encontrados na associação entre as diferentes concentrações do óleo de rícino e DXR (Tabela 1), é possível notar que as três concentrações do óleo de rícino apresentaram efeito modulador sobre a toxicidade da DXR. Tal efeito pode ser observado pela redução significativa na frequência de tumores ($p < 0,05$), indicando que o óleo de rícino possui efeito modulador sobre a ação da DXR.

O efeito modulador, na presente pesquisa, pode estar relacionado com as propriedades antioxidantes do composto testado. De acordo com Oloyede (2012), mesmo em baixas concentrações (0,00625 mg/mL), o ácido ricinoleico, principal componente do óleo de rícino, demonstrou capacidade em inibir, *in vitro*, a oxidação induzida pelo ferro, além de ser eficiente no sequestro de radicais hidrogênio e peróxido de hidrogênio. Bianchi e Antunes (1999) complementam que substâncias com potencial antioxidante são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por agentes exógenos, evitando assim a formação de lesões e perda da integridade celular. Shan, Aw e Jones (1990) também ressaltam que os antioxidantes podem inibir o processo de lipoperoxidação, o qual está associado aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos. Como um dos mecanismos de ação da DXR é a geração de radicais livres, essa pode ser uma das vias pelas quais o óleo de rícino promoveu redução na frequência de tumores quando associado à doxorubicina.

A redução na frequência de tumores no cotratamento entre DXR e o óleo de rícino pode, ainda, estar relacionada à capacidade de ativação de mecanismos antiproliferativos pelo óleo de rícino. Said *et al.* (2007) descreveram que em células conjuntivais humanas, o óleo de rícino induziu significativamente a apoptose por meio da ativação do receptor P2X7 e da Caspase 3 e ainda atribuíram tais achados ao alto teor de ácido ricinoleico no óleo.

Outra hipótese para justificar os resultados descritos pode estar relacionada às propriedades anti-inflamatórias da presente substância estudada. Valderramas (2006),

em um modelo experimental de edema de orelha de camundongo, demonstrou uma inibição de 75% da inflamação induzida pelo ácido aracônico por meio do polímero de poliuretano do óleo de rícino, além de ressaltar sua ação por inibição de enzimas como a fosfolipase A, ciclooxigenases (COXs) e/ou lipoxigenase. Contudo, sabe-se que uma das isoformas das COXs, a COX-2 se expressa em neoplasias e está relacionada à proliferação celular e reações inflamatórias (PRADA *et al.*, 2011). Sendo assim, pode-se conceber que a inibição desta enzima com o óleo de rícino estaria relacionada a ações anticarcinogênicas.

5. CONCLUSÃO

Nas presentes condições experimentais, o óleo de rícino apresentou potencial efeito modulador sobre a DXR e não demonstrou efeito carcinogênico. Tais resultados sugerem a realização de novos estudos, com diferentes organismos testes e outras metodologias, para explorar as propriedades terapêuticas do óleo de rícino sobre o câncer.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V.L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, 28(1): 118-129, 2005.
- ANTHONISEN, D. Co-produtos da mamona - Sistema de produção da mamona. *Embrapa Clima Temperado*, 2007. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mamona/SistemaProducaoMamona/co_produtos.htm>. Acesso em: 10 jan. 2016.
- BASTOS, C.; CARNEIRO, S.; SOUSA, A. *Doxorrubicina: o outro lado da cura*, 2014. Disponível em: <<http://anabesousa.wix.com/doxorrubicina>>. Acesso em: 20 fev. 2016.
- BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; TEIXEIRA, V. R.; CHAMMAS, R. *Aspectos moleculares da transformação celular: conceitos e implicações*, in: WAITZBERG, Dan Linetzky. *Dieta, nutrição e câncer*. São Paulo: Atheneu, 2006, cap. 6, pp. 79-87.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Free radicals and the main dietary antioxidants. *Revista Nutrição*, 12(2): 123-130. 1999.
- BRANDÃO, M. G. L. *et al.* *Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em minas gerais*, 2010. Disponível em: <http://www.cedeplar.ufmg.br/seminarios/seminario_diamantina/2010/D10A022.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos.

Departamento de Assistência Farmacêutica. *Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos*. Brasília-DF, 2006.

BRASILEIRO FILHO, G; PEREIRA, F. E. L; GUIMARÃES, R. C. Distúrbios do Crescimento e da Diferenciação Celular, n: *Patologia Geral*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, pp. 238-260.

BIANCHI, M.L.; ANTUNES, L, M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta, *Revista de Nutrição*, 12(2): 123-130, 1999.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*. 12 ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

CALIXTO, J. B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! *Ciência Hoje*, 21 (1234), 26-30, 1997.

CANGEMI, J. M.; SANTOS, A. M.; CLARO NETO, S. A revolução verde da mamona. *Química e Sociedade*, vol. 32, n. 1, 2010.

CARDOSO, A.C. M.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação do efeito modulador do óleo de alho (*Allium Sativum L.*) sobre a carcinogenicidade da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. *Perquirere*, 12(1):160-175, 2015.

CHU, E.; SARTORELLI, A. C. Quimioterapia do Câncer, in: KATZUNG, B., G. *Farmacologia: básica e clínica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap. 55, p. 751-777

COSTA, A. G. F.; SOFIATTI, V.; MACIEL, C. D. G. *Manejo de plantas daninhas na cultura da mamoneira*, 2013. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/95075/1/Cap-6.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

COSTA, H. M; RAMOS, V. D; ABRANTES, T. A. S; CASTRO, D. F; VISCONDE, L. L. Y; NUNES, R. C. R. Efeito do óleo de mamona em composições de borracha natural contendo sílica. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 14(1):46-50, 2004.

COSTA JUNIOR, A. L; COUTINHO, S. M. G. *O câncer: algumas informações, crenças e atitudes*. Brasília, DF: [s.n.], 2009.

COSTA, W.F; OLIVEIRA, A.B; NEPOMUCENO, J. C. Lapachol as anepithelial tumor inhibitor-agent in *Drosophila melanogaster* heterozygote for tumor suppressor gene *wts*. *Genetics and Molecular Research*, 10(4): 3236-3245, 2011.

CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. *Farmacologia Moderna com Aplicações Clínicas*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

EKEN, J. C. J *et al*. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous

for the tumor supressor gene wts. *Enviromental and Molecular Mutagenesis*, v. 40, p. 277-282, 2002.

FAO. Food and Agriculture Organization (FAO). *Faostat*, 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 08 jan. 2016.

FONSECA, C. A.; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. *Infarma*, 16(7-8):51-54, 2004.

FRAZÃO, A. *et al.* Rícino. *Tua Saúde*. 2015. Disponível em: <<http://www.tuasaude.com/ricino/>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

GARÓFOLO, A. *et al.* A dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. *Revista de Nutrição*, 17(4): 491-505, out./dez., 2004.

GIL, P.C. N. *et al.* Efeito da inclusão de ácido ricinoleico proveniente do óleo de mamona (*Ricinus communis* L.), sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos de cavalos. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*. São Paulo, v. 10, n. 1, 2012.

HIRAI O. *et al.* Mutagenicity tests of polyoxyethylene hydrogenated castor oil 60 (HCO-60). *The Journal of Toxicological Sciences*, 19(2):89-96. 1994.

HOFFMAN, L. V.; MEDEIROS, E. P.; SOARES, L. S. *Ricina: um impasse para utilização da torta de mamona e suas aplicações*. Campina Grande, PB. 2007.

INCA: Instituto Nacional do Câncer. *A situação do câncer no Brasil*. Rio de Janeiro, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

MACHADO, N. M.; NEPOMUCENO, J.C. Efeito modulador da vitamina K contra a ação carcinogênica da doxorubicina, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. *Perquirere*, 7(1):180-193, 2010.

NASCIMENTO, M. C. M. O.; MARTINS, A. S. Cardiomiopatia induzida pela adriamicina: uma revisão. *Arquivos de Ciências e Saúde*, 12(2):111-115, 2005.

NEPOMUCENO, J. C. Using the *Drosophila melanogaster* to Assessment Carcinogenic Agents through the Test for Detection of Epithelial Tumor Clones (Warts). *Adv Tech Biol Med* v. 3, n. 149, 2015.

OLOYEDE, G. K. Antioxidant Activities of Methyl Ricinoleate and Ricinoleic Acid Dominated *Ricinus communis* Seeds Extract Using Lipid Peroxidation and Free Radical Scavenging Methods. *Research Journal of Medicinal Plants*, v. 6, p. 511-520. 2012.

ORSOLIN, P. C.; SILVA-OLIVERA, R. G.; NEPOMUCENO, J. C. Assessment of the mutagenic, re-combinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2012): 2598–2604.

PRADA, J.; QUEIROGA, F. L.; GREGÓRIO, H.; PIRES, I. Evaluation of Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Mast Cell Tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 47(1):31-36. 2012.

RANG, H. P. *et al.* *Farmacologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 5 ed. London: Pharmaceutical Press, 2006.

SANTOS, F. L.; LANA, R. P.; SILVA, M. T. C. Ácido linoléico conjugado: estratégia para elevação do ácido linoléico conjugado em vacas de leite. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*. n. 24, 2002.

SAID, T. *et al.* Benefits and Side Effects of Different Vegetable Oil Vectors on Apoptosis, Oxidative Stress, and P2X7 Cell Death Receptor Activation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(1): 5000-5006. 2007.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. *Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos*. Porto Alegre: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, cap. 15, p. 371-400, 2003.

SCHNEIDER, R. C. S. *Extração, caracterização e transformação do óleo de ricino*. 2003. 240 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SCHNEIDER, R. C. S. *et al.* Componentes minoritários do óleo de mamona (*Ricinus communis* L.). *Tecno-lógica*, Santa Cruz do Sul, 11(1-2): 41-46, 2007.

SHAN, X.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther*, 47(1):61-71. 1990.

SIDOROV, R. A.; UGNIVENKO, E. G.; KHOVANOVA, E. M.; BELITSKY, G. A. Induction of tumor clones in *Drosophila melanogaster wts/+* heterozygotes with chemical carcinogenes. *Mutation Research*, 498 (2001):181-191.

SILVA, B. B.; MENDES, F. B. G.; KAGEYAMA, P. Y. *Desenvolvimento econômico, social e ambiental da agricultura familiar pelo conhecimento agroecológico*. Espinheira-Santa. Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009. Disponível em: <<http://www.lcb.esalq.usp.br/extension/DESAAFCA/espinheirasanta.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

SILVA, R. G. *Efeito modulador do ômega-3 sobre a mutagenicidade e carcinogenicidade da Doxorubicina em células somáticas de Drosophila melanogaster*. 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

SILVA, S. D. A.; CASAGRANDE JÚNIOR, J. G.; MAGNANI, M. Sistema de produção da mamona. *Embrapa clima temperado*, 2007. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mamona/SistemaProducaoMamona/introducao.htm>>. Acesso em: 16 dez. 2015.

SILVA, V. Programa Biodiesel do Ceará. Empresa de assistência técnica e extensão rural do Ceará – EMATERCE. *A cultura da mamona*, 2007.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. Cellular reproduction and model genetic organisms, in: *Principles of genetics*. 4. ed. Wiley, 2006. cap. 2, pp. 17-41.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. *Fundamentos de genética*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

TAKANO, E. H. *et al.* Inibição do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos por detergente derivado de óleo da mamona (*Ricinus communis*). *Ciência Rural*, Santa Maria, 37(5): 1235-1240, 2007.

VALDERRAMAS, A. C. *Estudo da atividade anti-inflamatória de Ricinus communis (Euphorbiaceae)*. 2006. 54 f. Dissertação (Mestrado Fisiologia Oral)- Universidade do Sagrado Coração, Bauru, São Paulo, 2006.

VASCONCELOS, M. A. *et al.* 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*, 101 (2017): 1-7.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura?. *Química Nova*, 28(3): 519-528, 2005.