

Avaliação do efeito anticarcinogênico do extrato de folhas de manga (*Mangifera indica* L.) por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster*

Evaluation of anticarcinogenic effect of the mango leaves extract (Mangifera indica L.) through the test for detection of epithelial tumor clones in Drosophila melanogaster

Nayara Júnia Souza Bontempo

Graduanda do curso de Medicina Veterinária (UNIPAM).

E-mail: nayarajunia@hotmail.com

Priscila Capelari Orsolin

Professora orientadora (UNIPAM).

E-mail: priscilaco@unipam.edu.br

Resumo: A manga é rica em vitamina C e contém ácido gálico e betacaroteno, compostos com função antioxidante amplamente reconhecida. Assim como o fruto, as folhas são ricas em antioxidantes, entre as quais merece destaque a mangiferina, que demonstra atividades farmacológicas em diferentes órgãos e tecidos, com efeito preventivo e terapêutico contra diversas doenças. Alguns estudos têm elucidado que seu uso pode ser feito para auxiliar no tratamento contra o câncer. Nesse contexto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de avaliar o possível efeito anticarcinogênico do extrato aquoso das folhas de manga (*Mangifera indica* L.) por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*. Para tanto, foram preparadas quatro soluções aquosas obtidas a partir das folhas de manga, nas concentrações: 25, 50, 75 e 100g/L. Essas concentrações foram utilizadas isoladamente, em associação com doxorubicina (em sistema de co-tratamento). O tratamento foi realizado com todas as larvas descendentes do cruzamento de fêmeas *wts/TM3* com machos *mwh/mwh*. Os resultados revelam que o extrato das folhas de manga apresentou atividade anticarcinogênica, visto que houve diferença, estatisticamente significativa, na frequência de tumores identificados com a presença do referido extrato em todas as concentrações testadas, quando comparado à frequência de tumores no controle positivo (doxorubicina). Conclui-se, portanto, que, nas presentes condições experimentais, o extrato aquoso de folhas de mangas reduziu a frequência de tumores induzidos pela doxorubicina em *D. melanogaster*.

Palavras-chave: Folhas de manga. *Drosophila melanogaster*. *Wts*. Anticarcinogênico.

Abstract: The mango fruit has vitamin A, gallic acid and beta-carotene, compounds widely known by their antioxidant function. As the fruit, the leaves are rich in antioxidant components, among which stands out mangiferin, demonstrating pharmacological activities in different organs and tissues, with preventive and therapeutic effect against various diseases. Some

studies have elucidated that its use can be made to aid in cancer treatment. In this context, this work was developed with the main objective of evaluating the possible anticarcinogenic effect of aqueous extract of mango leaves (*Mangifera indica* L.) using tests for detection of tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. Four aqueous solutions were prepared from the mango leaves, with the following concentrations: 25, 50, 75 and 100g/L. These concentrations were used alone and in combination with doxorubicin (in cotreatment system). The treatment was performed with all the larvae descendants of females larvae *wts/TM3* and males *mwh/mwh*. The results show that the extracts of mango leaves presented anticarcinogenic activity, as there was statistically significant difference in the frequency of tumors identified with the said extract in all tested concentrations when compared to the frequency of tumors in the positive control (doxorubicin). It follows, therefore, that, in these experimental conditions, the aqueous extract of mango leaves reduced the frequency of tumors induced by doxorubicin in *D. melanogaster*.

Keywords: Mango leaves. *Drosophila melanogaster*. Wts. Anticarcinogenic.

1 INTRODUÇÃO

As células do nosso corpo são programadas para se desenvolver, crescer, se diferenciar e morrer em resposta a um complexo sistema de sinais bioquímicos. A manifestação de um clone de células livres dessas limitações de programação e desenvolvimento resulta numa proliferação inadequada que pode desencadear um câncer (JORDE; CAREY; BAMSHAD, 2010).

O câncer é definido como uma enfermidade multicausal crônica, caracterizada pelo crescimento descontrolado das células, que desencadeia a formação de uma massa celular denominada neoplasia ou tumor. Tais alterações são decorrentes de danos em genes específicos envolvidos no controle do ciclo celular (JORDE; CAREY; BAMSHAD, 2010). Esses genes são constantemente afetados por metabólitos, reativos endógenos, drogas terapêuticas e mutágenos ambientais que alteram a sua normalidade (RESENDE, 2007).

O câncer é caracterizado como uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos, sendo que um terço da população será vítima dessa doença durante a vida (RANG *et al.*, 2007). Branco (2005) ressalta que os tumores malignos não são importantes apenas pela gravidade e frequência com que ocorrem, mas também pela evolução dessa frequência, que tem aumentado a nível mundial.

Há vários indícios de que a alimentação tem um papel importante nos estágios de iniciação, promoção e propagação do câncer, destacando-se entre outros fatores de risco. Entre as mortes por câncer atribuídas a fatores ambientais, a dieta contribui com cerca de 35% e, se estivesse adequada, poderia prevenir de três a quatro milhões de casos novos de cânceres a cada ano. Diante desse cenário, fica clara a necessidade de desenvolvimento de novas ações para o controle e tratamento do câncer (GLANZ, 1997).

Nesse contexto, os centros de pesquisas têm ressaltado a necessidade de se analisar o efeito de substâncias químicas na ação contra essa doença. Com isso, diversas substâncias já foram e continuam sendo testadas com esse propósito (SANTOS; LANA; SILVA, 2002). Entre estas, estudos sugerem que as folhas de manga

(*Mangifera indica* L.) apresentam atividade eficiente no controle da proliferação de células tumorais (JAGETIA; BALIGA, 2005).

A manga é rica em vitamina C e oferece ao corpo ácido gálico, um polifenol com atividade antioxidante. Entre os carotenoides, possui betacaroteno, que também tem função antioxidante amplamente reconhecida (ACHKAR, 2015). Assim como o fruto, as folhas são ricas em antioxidantes, entre os quais merece destaque a mangiferina (BARRETO *et al.*, 2008). A mangiferina demonstra atividades farmacológicas em diferentes órgãos e tecidos, manifestando efeito preventivo e terapêutico contra diversas doenças (CANUTO, 2009). Vários estudos têm verificado que seu uso pode ser feito para auxiliar no tratamento contra o câncer, sendo mais eficaz em casos de cânceres de mama e do cólon (PETRIN, 2012).

Diante do exposto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de avaliar os possíveis efeitos anticarcinogênicos do extrato aquoso das folhas de manga (*Mangifera indica* L.) por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER

O câncer é a segunda causa de morte no mundo desenvolvido, ficando atrás, apenas, de doenças cardíacas (WEI *et al.*, 2009). Apesar de toda evolução tecnológica da área médica nas últimas décadas, o conhecimento acumulado sobre os fatores causadores do câncer ainda não foi suficientemente compreendido, sendo possível incluir causas tão diversas quanto a própria evolução da doença (COSTA JÚNIOR; COUTINHO, 2015).

As células possuem um mecanismo de reparo do DNA, por isso o câncer não se desenvolve rapidamente. Diante disso, a existência de células alteradas significa que estas escaparam dos mecanismos homeostáticos intracelulares, que as levariam a apoptose. Se estes mecanismos não forem capazes de reparar o DNA ou de encaminhar a célula a apoptose, ela resistirá e se fixará na população. À medida que essas células se duplicam, as mutações se acumulam, acarretando a manifestação da neoplasia (BRAGA; TEIXEIRA; CHAMMAS, 2006).

De acordo com Amendola e Vieira (2005), ainda que as células disponham de mecanismos de reparo eficientes na remoção da maior parte das lesões adentradas em seu DNA, uma pequena parte delas não chega a ser reparada ou é reparada incorretamente. Os genes mais suscetíveis a sofrer as mutações são os genes que garantem a ordem dos eventos do ciclo de divisão celular, os genes que consertam erros na replicação do material genético e os que promovem e mantêm o estado de diferenciação celular (BELIZÁRIO, 2002).

Existem certas substâncias químicas que promovem um aumento nas frequências de mutações, o que se explica devido ao aumento na produção de radicais livres (MULLER *et al.*, 2007). Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças degenerativas, tais como as cardiopatias, a aterosclerose e os problemas pulmonares (STAHL; SIES,

1997). Os danos no DNA causados pelos radicais livres também desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e de carcinogênese (POULSEN; PRIEME; LOFT, 1998).

Os radicais livres são gerados por meio do metabolismo e podem causar mutações ao DNA. O organismo possui vários mecanismos que atuam eliminando tais radicais a partir da urina ou bloqueando seus efeitos para evitar a ocorrência de danos. A alimentação rica em compostos antioxidantes pode auxiliar na eliminação do oxigênio dos radicais. As vitaminas C e E, por exemplo, podem doar elétrons, bloqueando sua atividade; e componentes alimentares polifenólicos podem ativar a resposta antioxidante e aumentar a expressão de enzimas desintoxicantes (PIETTA, 2000).

Nesse contexto, verifica-se que algumas substâncias presentes nos alimentos podem ter efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos, enquanto outras podem atenuar ou anular esses efeitos. Por isso, muitos compostos presentes nos alimentos, tanto naturais, como adicionados ou produzidos durante o processamento, já foram e continuam sendo testados quanto à mutagenicidade ou à antimutagenicidade em diferentes sistemas experimentais (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

2.2 ANTIOXIDANTES

Na tecnologia alimentar, um antioxidante é definido como uma substância que, em pequenas quantidades, é capaz de impedir ou retardar a oxidação de materiais ou moléculas facilmente oxidáveis (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004). Essas defesas antioxidantes podem ser naturalmente produzidas ou consumidas por meio da dieta. Juntando-se aos efeitos protetores dos antioxidantes endógenos, a inclusão de antioxidantes na alimentação é de fundamental importância e o consumo de frutas e vegetais está relacionado com a redução do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo dos radicais livres (POMPELLA, 1997).

Os antioxidantes obtidos da dieta são indispensáveis para a defesa apropriada contra oxidação e, portanto, têm papel crucial na manutenção da saúde. Acredita-se que pelo menos parte do efeito benéfico de uma alimentação rica em frutas e vegetais está na variedade de antioxidantes vegetais que podem funcionar como suplementos essenciais no combate a várias doenças. Eles previnem os danos provocados pelos radicais livres, oferecendo a estes o elétron que lhes falta, assim o radical livre estabiliza-se (SHILS *et al.*, 2009). As vitaminas e o betacaroteno são considerados excelentes antioxidantes, capazes de sequestrar os radicais livres com grande eficiência (NEDEL, 2005).

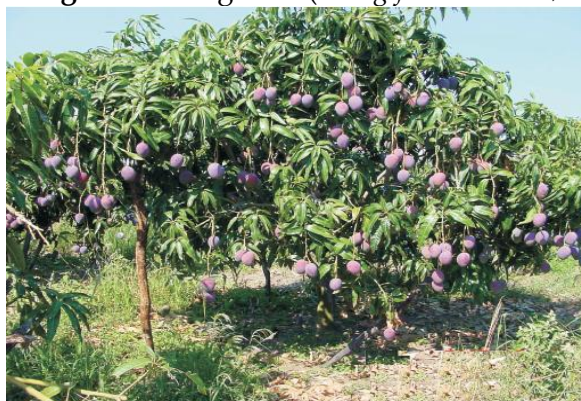
Para se proteger do estresse oxidativo, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente, antes que ele cause lesão. Essa linha de defesa é constituída por algumas enzimas, tais como glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px, entre outros (VASCONCELOS *et al.*, 2014).

Alimentos que contêm propriedades antioxidantes como o betacaroteno, as vitaminas C e E e o selênio podem atuar neutralizando e retirando do organismo os radicais livres. O mamão, a laranja, a cenoura, a cebola, o morango e a manga estão entre esses alimentos (VASCONCELOS *et al.*, 2014). A manga (folhas, caule e frutos) possui componentes bioativos com alto teor de vitaminas A e C e ácidos palmítico e málico. Possui, ainda, outros antioxidantes que ajudam na proteção contra câncer, doenças cardíacas e alergias (PETRIN, 2012).

2.3 MANGA (*Mangifera indica* L.)

A mangueira (*Mangifera indica* L., Figura 1) é uma frutadeira perene de porte arbóreo, dotada de copa frondosa, pertencente à família Anacardiaceae. Oriunda da Índia, a mangueira é, atualmente, cultivada em diversas partes do globo terrestre, existindo diferentes variedades (PINTO, 2008). A mangicultura representa a segunda maior cultura tropical, sendo a manga um dos frutos mais consumidos no mundo, na forma *in natura* ou como polpa, sucos, néctar, doces e geleias (BARRETO *et al.*, 2008).

Figura 1. Mangueira (*Mangifera indica* L.)



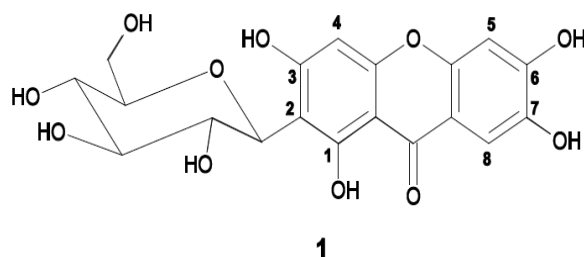
Fonte: CANUTO (2009).

A despeito da importância econômica da mangicultura e do largo consumo da fruta, a mangueira possui uso medicinal pouco conhecido pela população brasileira, mas bastante difundido em outros países. Algumas comunidades rurais africanas utilizam-na para o tratamento de doenças crônicas (diabetes e artrite) e também como anti-inflamatório e analgésico (OJEWOLE, 2005). Na Índia, as sementes são tradicionalmente indicadas para tratar a diarreia (SAIRAM *et al.*, 2003). A resina, extraída do caule, é empregada medicinalmente contra disenteria e sífilis (PIO-CORRÊA, 1974). Entre as diferentes partes da *M. indica* utilizadas com fins medicinais, a folha representa uma das mais ricas fontes de compostos fenólicos e mangiferina (BARRETO *et al.*, 2008).

Estudos farmacológicos demonstraram que extratos da mangueira possuem atividades antiviral, antibacteriana, analgésica, anti-inflamatória (PARDO-ANDREU *et al.*, 2008) e imunomodulatória (MAKARE; BODHANKAR; RANGARI, 2001). Além disso, seu extrato hidroalcoólico exibe propriedades hipoglicemiante e hipolipidêmica (OJEWOLE, 2005).

A manga é quimicamente rica em diferentes classes de compostos fenólicos antioxidantes, tais como ácidos e ésteres, derivados da benzofenona, flavanoides, antocianinas, flavonóis, heterosídeso e heterosídeoantônicos (ex.: mangiferina). A mangiferina (Figura 2) é um composto polifenólico amplamente encontrado em pteridófitas e angiospermas, de forma predominante nas folhas e na casca do caule (BARRETO *et al.*, 2008).

Figura 2. Estrutura química da mangiferina



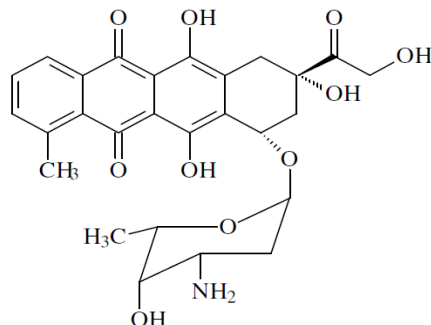
Fonte: CANUTO (2009).

A mangiferina demonstra atividades farmacológicas em diferentes órgãos e tecidos, exercendo efeito preventivo e terapêutico contra uma considerável gama de doenças. Basicamente, por meio de uma ação removedora de radicais livres, a mangiferina protege neurônios, coração, fígado, rins e estômago contra os efeitos nocivos de radicais livres, prevenindo ou retardando o surgimento de doenças neurodegenerativas, de processos inflamatórios e, até mesmo, de neoplasias (CANUTO, 2009).

2.4 DOXORRUBICINA

A doxorubicina (DXR, Figura 3) é um antibiótico antineoplásico antracíclico isolado de culturas do fungo *Streptomyces peucetius var. caesi* (CALABRESI; CHABNER, 1996), que produz seus efeitos, principalmente, por meio de ação direta sobre o DNA (RANG *et al.*, 2007).

Figura 3. Fórmula estrutural da doxorubicina



Fonte: Disponível em: <www.s bq.com.br>.

As antraciclinas podem intercalar-se no DNA, afetando muitas de suas funções, incluindo a síntese de DNA e RNA. Ocorrem quebras unifilamentares ou bifilamentares, bem como trocas entre cromátides irmãs. O mecanismo de ação antitumoral da doxorubicina envolve, ainda, a inibição da enzima topoisomerase II (SIMEONI, 2006). Por conseguinte, as antraciclinas são mutagênicas e carcinogênicas (CALABRESI; CHABNER, 1996).

O anel da antraciclina é lipolítico, mas a extremidade saturada do sistema de anéis contém grande quantidade de grupos hidroxilas, juntamente com aminoácidos associados a carboidratos, formando um centro hidrofílico. Devido a essa propriedade, a molécula é anfótera. Com isso, sua passagem na membrana plasmática é facilitada e sua permanência no corpo é relativamente longa (SINGAL *et al.*, 2000). Além disso, apresenta um anel de quinona e de hidroquinona, que lhe permitem funcionar como acceptor e doador de elétrons. A importância principal é dada ao anel de quinona, porque é um potente gerador de radicais livres (MYERS, 1998). E essa capacidade de gerar uma variedade de espécies radicais livres nos sistemas subcelulares tem sido considerada essencial para a sua ação antitumoral (KEIZER *et al.*, 1990).

A DXR possui um amplo espectro de atividade clínica contra neoplasias malignas hematológicas, bem como uma ampla variedade de tumores sólidos, como carcinomas de mama, endométrio, ovário, testículo, tireoide, estômago, fígado e pulmão. Entretanto, sua aplicação é limitada em função de sua cardiotoxicidade (CHU; SARTORELLI, 2006).

2.5. *Drosophila melanogaster*

A espécie *Drosophila melanogaster* (Figura 4), conhecida popularmente como mosca da fruta, é utilizada em pesquisas genéticas desde 1909, depois das bactérias e fungos. Atualmente, seu uso é recorrente em estudos genéticos porque é fácil mantê-la em laboratório. Ela tem um ciclo de vida relativamente curto, cerca de 10 dias a 25°C, e possui grande progênie. Na forma adulta, possui cerca de 2 mm de comprimento, três pares de pernas e apenas um par de asas, porque o segundo par foi modificado e está dentro de pequenos apêndices chamados halteres, que ajudam na aerodinâmica para o voo (SNUSTAD; SIMMONS, 2006).

A *D. melanogaster* é um organismo eucarionte e, a partir de suas características peculiares (seu pequeno tamanho, facilidade de manutenção em laboratório, o fato de possuir grande progênie, curto tempo de geração, baixo número de cromossomos e apresentar reações metabólicas semelhantes às dos mamíferos), mostra-se ideal para os testes de detecção de agentes genotóxicos ou antígenotóxicos e carcinogênicos ou anticarcinogênicos (GRAF, 2006).

A conservação evolutiva de genes supressores tumorais entre *Drosophila* e mamíferos tem levado a estudos na indução e no desenvolvimento de tumores nessas moscas. Diversos proto-oncogenes e supressores tumorais de mamíferos se apresentam também nessa espécie (EEKEN *et al.*, 2002). Nesse contexto, Nishiyama *et al.* (1999) descreveram homologias entre o gene supressor de tumor warts (*wts*) em *Drosophila* com o LATS1 em humanos.

Figura 4. Casal de *Drosophila melanogaster*: o macho (esquerda) é menor e possui pente sexual e a fêmea (direita) é maior e não apresenta pente sexual



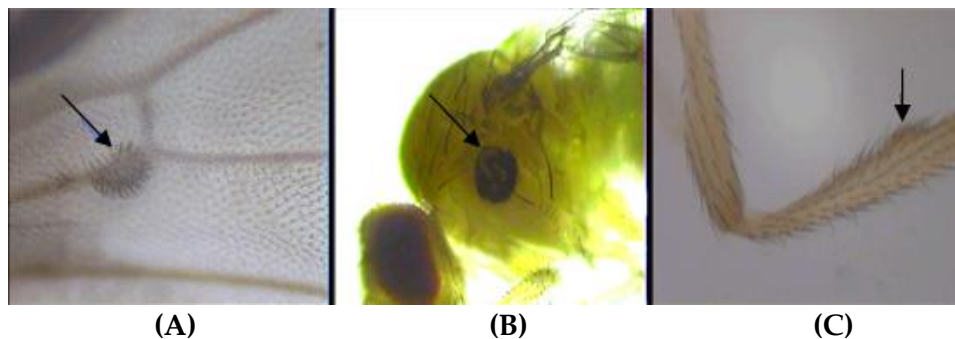
Fonte: Disponível em: <<http://essenciadavida-julianacorreia.blogspot.com.br/2009/11>>.

2.6 TESTE PARA DETECÇÃO DE CLONES DE TUMORESEPITELIAIS (WARTS) EM *Drosophila melanogaster*

Segundo Fonseca e Pereira (2004), muitos testes estão à disposição dos pesquisadores para avaliação dos efeitos antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos de diferentes substâncias, utilizando diferentes organismos, como microrganismos, plantas, roedores e, até mesmo, insetos. Entre esses testes, pode-se destacar o teste para detecção de tumores epiteliais em *D. melanogaster* (*warts*), que é utilizado para avaliar o efeito carcinogênico ou anticarcinogênico de diversos compostos como produtos naturais, medicamentos, partículas aéreas, entre outros (ORSOLIN, 2011).

O gene *warts* (*wts*) foi identificado por Nishiyama *et al.* (1999) com atividade supressora de tumor em *Drosophila*. A deleção desse gene acarreta na formação de clones de células que são consideravelmente invasivas, ou seja, que têm a capacidade de se desenvolver por todo corpo da mosca (Figura 5). Além disso, o gene *warts* é considerado muito importante no controle da morfogênese e da proliferação celular (NISHIYAMA *et al.*, 1999).

Figura 5. Expressão de tumor em diferentes segmentos da *Drosophila melanogaster* (representado pelas setas). A. Tumor na asa. B. Tumor no tórax. C. Tumor na perna.



Fonte: ORSOLIN (2011).

O marcador *wts* é uma mutação recessiva 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 homozigotos. Os clones são viáveis em conjuntos de células isoladas da larva, porém se manifestam como tumores nas moscas adultas (SIDOROV *et al.*, 2001).

3 METODOLOGIA

3.1 AGENTES QUÍMICOS

3.1.1 Coleta da matéria prima e preparação do extrato das folhas de *Mangifera indica* L.

Foram coletadas folhas de *Mangifera indica* L. na área urbana de Patos de Minas durante o mês de julho de 2015. Folhas com aspecto saudável foram submetidas à secagem em sala ventilada em temperatura ambiente, por, aproximadamente, 48 horas e, depois, foram trituradas.

A preparação do extrato aquoso das folhas de *M. indica* L. seguiu protocolo descrito por Silva *et al.* (2011). Feita a trituração em liquidificador, 100g do triturado foram dissolvidas em 1L de água osmose reversa. Essa solução foi filtrada e o volume foi completado para 1L. A partir dessa solução, foram efetuadas diluições para as seguintes concentrações: 75g/L, 50g/L e 25g/L, que, juntamente com a solução mãe, 100g/L, foram utilizadas no ensaio biológico, totalizando quatro tratamentos. A água osmose reversa foi utilizada, também, como controle negativo.

3.1.2 Doxorrubicina

O cloridrato de doxorrubicina (DXR), comercializado como Adriblastina®, foi o composto utilizado como controle positivo na presente pesquisa, uma vez que possui efeito genotóxico e carcinogênico comprovado. O mesmo foi utilizado na concentração de 0,4 mM, preparado a partir da adição de 0,03538g de Adriblastina em 25 mL de água osmose reversa.

Esse medicamento é produzido pelo laboratório Pfizer e é vendido na forma de ampola, contendo 50mg. O medicamento é 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 e cruzamentos

Para a realização do teste *wts*, foram utilizadas duas linhagens mutantes de *D. melanogaster* (*wts* e *mwh*). Os estoques dessas linhagens são mantidos no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas, acondicionadas

em frascos contendo meio de cultura próprio para *D. melanogaster*, conservadas dentro de uma incubadora, à temperatura de 25°C e 60% de umidade.

Machos e fêmeas foram colocados juntos (para acasalamento) em frascos contendo meio de cultura próprio para postura, no qual as fêmeas depositaram seus ovos. Para a obtenção de larvas heterozigotas (horas *wts* +/+ *mwh*) de 72h, foi realizado o cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3,Sb¹* com machos *mwh/mwh*. As larvas descendentes desse cruzamento foram tratadas com extrato da folha de manga (em diferentes concentrações) e os respectivos controles (positivo e negativo).

3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 Tratamento e análise das moscas

Larvas de 72 horas resultantes do cruzamento descrito foram transferidas para frascos contendo 1,5 g de purê e 5 mL de extrato aquoso de folhas de manga em quatro diferentes concentrações (25, 50, 75 e 100 g/L). Para o controle positivo, foi utilizada a doxorrubicina (0,4 mM) e, para o controle negativo, água osmose reversa.

Após o tratamento, as moscas foram coletadas e armazenadas em frascos contendo etanol 70%. Feito isso, elas foram separadas quanto ao fenótipo (apenas moscas portadoras de pelos finos e longos contêm o gene *wts*, por isso, moscas com fenótipo de pelo curto e grosso são descartadas). Para a análise das moscas, foram utilizadas lupas estereoscópicas e pinças entomológicas.

3.4 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 $\alpha = 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Tabela 1, é possível verificar a frequência de tumores nos diferentes segmentos do corpo da *Drosophila melanogaster* quando tratadas com os controles (positivo e negativo) e as diferentes concentrações testadas de extrato de folhas de manga. Como pode ser observado, as concentrações isoladas do extrato de manga apresentaram frequências de tumores que não diferiram significativamente do controle negativo ou que foram ainda menores que a frequência obtida no referido controle, o que revela ausência de efeito carcinogênico do extrato nas quatro concentrações testadas (25, 50, 75 e 100 g/L). Nessas concentrações, as frequências totais de tumores foram, respectivamente, de 0,17; 0,20; 0,09 e 0,04 tumores por mosca.

Além disso, pode-se observar, a partir da Tabela 1, que, nas quatro concentrações testadas de extrato aquoso de folhas de manga, foi constatado efeito anticarcinogênico, uma vez que, ao analisar as concentrações associadas (em sistema de co-tratamento com a DXR), observa-se redução significativa de tumores quando comparado ao controle positivo isolado, cuja frequência de tumores foi de 4,03.

Houve, portanto, uma redução na frequência de tumores quando as moscas foram submetidas ao co-tratamento de DXR com o extrato de folhas de manga. É importante enfatizar que a frequência de tumores diminuiu discretamente com o aumento da dose utilizada, indicando que a resposta de inibição é dose dependente.

Tabela 1. Frequência de clones de tumores observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, tratada com doxorubicina e diferentes concentrações do extrato das folhas de manga.

Tratamentos		Número de tumores analisados								Frequência (Nº de tumores/mosca)
Ex. folha de manga (g/L)	DXR (mM)	N. de moscas	Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter	Total	
0	0	200	2	19	2	11	10	1	45	0,23
25	0	200	6	7	2	10	7	4	33	0,17 ^{ns*}
50	0	200	7	4	5	20	2	4	40	0,20 ^{ns*}
75	0	200	5	2	0	10	0	1	18	0,09*
100	0	200	1	1	0	2	0	4	8	0,04*
0	0,4	200	132	122	57	360	49	86	806	4,03*
25	0,4	200	12	7	11	32	2	3	65	0,33**
50	0,4	200	0	4	3	22	2	2	33	0,17**
75	0,4	200	1	1	1	7	0	1	11	0,06**
100	0,4	200	1	1	0	3	4	0	9	0,05**

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

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

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

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

DXR, doxorubicina.

O controle positivo utilizado, a doxorubicina, induziu uma frequência de 4,03 tumores por mosca (frequência significativamente superior à obtida no controle negativo), o que significa que a linhagem responde à indução tumoral. A quimioterapia antineoplásica tem como finalidade modificar o DNA da célula tumoral de forma a interromper seu crescimento. Entretanto, como a substância age sistemicamente, as células saudáveis também podem sofrer tais alterações, ocorrendo efeito pró-tumoral (ALVES; NEPOMUCENO, 2012).

Os resultados obtidos na presente pesquisa sobre o potencial anticarcinogênico das folhas de manga corroboram com dados da literatura. De acordo com Yoshimi *et al.* (2001), atividades citotóxicas significativas têm sido demonstradas pelo extrato de manga contra o câncer do cólon, de mama e de rim. Ele também inibe a proliferação de células leucêmicas, induz apoptose em células nocivas, provavelmente através da regulação da expressão do gene Bcl (que codifica uma proteína envolvida no processo de controle da apoptose). Esses resultados sugerem que a mangiferina tem um potencial quimiopreventivo de ocorrência natural.

Jagetia e Baliga (2005) também verificaram que, em linfócitos humanos expostos à radiação gama, a mangiferina reduziu danos ao DNA e reforçou o seu poder de reparo, prevenindo a ocorrência de possíveis rearranjos cromossômicos, de mutações e o desenvolvimento de câncer.

Após várias análises do extrato das folhas de manga, Meyers *et al.* (2013) concluíram que o mesmo possui atividade antioxidante muito significativa, com alta

citotoxicidade sobre linhas de células de adenocarcinoma, não trazendo gravidade para o seu DNA.

Outros pesquisadores também encontraram resultados semelhantes. Martinez *et al.* (2010) estudaram a atividade antioxidante do extrato aquoso da *Mangifera indica* e relataram o efeito inibidor desse extrato sobre danos ao DNA. Delgado *et al.* (2005) explicaram esses resultados considerando que espécies reativas de oxigênio catalisadas por radicais livres induzem danos às moléculas biológicas, incluindo proteínas, lipídios e o código genético, provocando alterações em sua função e estrutura. Antioxidantes como o extrato das folhas da manga podem ser benéficos para prevenir e tratar várias doenças, inclusive o câncer, uma vez que possuem considerável atividade sequestradora de radicais hidroxila, além de agirem como um quelante de ferro, evitando os possíveis distúrbios provocados por estes. O principal componente dos extratos obtidos de partes da mangueira é a mangiferina, uma xantona glicosilada, com efeito antioxidante reconhecido (GARRIDO *et al.*, 2004).

O uso de extratos contendo mangiferina é bastante difundido em vários lugares, e a mangiferina isolada mostrou ter as mesmas propriedades dos extratos, devido à sua habilidade em capturar radicais livres envolvidos na iniciação da peroxidação lipídica, uma atividade evidenciada por propriedades redox (PAULETTI *et al.*, 2003). Por meio de sua ação removedora de radicais livres, a mangiferina manifesta propriedades farmacológicas em diferentes órgãos e tecidos, exercendo efeito preventivo e terapêutico contra uma expressiva quantidade de doenças (CANUTO, 2009). Sua estrutura xantonóide, com ligação C- glicosil e componentes hidroxila, relaciona-se com essa capacidade, levando a um potente efeito antioxidante (VYAS *et al.*, 2012).

Os mecanismos moleculares pelos quais a mangiferina regula o sistema antioxidante endógeno em diferentes condições experimentais ainda não são totalmente elucidados. Um dos mecanismos já demonstrados *in vivo* para a regulação do sistema de defesa antioxidante por alguns compostos fenólicos como ácido gálico, ácido p-cumárico e ácido ferúlico parece envolver a ativação do fator relacionado à eritroide-2 (Nrf2), uma proteína chave na regulação da via de sinalização que ativa a defesa primária do corpo contra o estresse oxidativo, ligando-se aos elementos de resposta antioxidante situados na região promotora de genes codificantes de enzimas antioxidantes (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

Sendo assim, o potencial anticarcinogênico verificado no extrato aquoso de folhas de manga pode ser justificado em decorrência do conteúdo fenólico e de flavonoides dessas folhas, que exibem atividade antioxidante, podendo reduzir o dano oxidativo induzido pela doxorubicina, culminando em redução da frequência de tumores.

5 CONCLUSÃO

O potencial anticarcinogênico do extrato aquoso das folhas de manga (*Mangifera indica* L.) foi justificado, uma vez que, nas presentes condições experimentais, ele reduziu a frequência de células tumorais em *Drosophila melanogaster*. Acredita-se que tal efeito possa estar associado à abundância de compostos fenólicos

presentes nas folhas de manga, os quais estão entre as substâncias fitoquímicas mais antioxidantes. Evidenciou-se, ainda, que os resultados são dose dependentes. O potencial carcinogênico do extrato aquoso das folhas de manga não foi comprovado nas doses testadas.

Este estudo oferece oportunidades para que demais pesquisas sejam desenvolvidas (envolvendo outras metodologias e outros organismos testes), pois se acredita que a exploração das propriedades biológicas de mangiferina possa contribuir positivamente para uma maior qualidade de vida e promover avanços benéficos na saúde de pacientes oncológicos.

REFERÊNCIAS

- ACHKAR, M. *Manga e seus benefícios*. Disponível em: <<http://vidaestilo.terra.com.br/interna/0OI5399380-EI12822,00.html>>. Acesso em: 05 fev. 2015.
- ALVES, E. M.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação do efeito anticarcinogênico do látex do avelós (*Euphorbia tirucalli*), por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. *Perquirere*, Patos de Minas, v. 9, n. 2, p.125-140, dez. 2012.
- AMENDOLA, L. C. B; VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Rio de Janeiro, v. 51, n. 4, p.325-330, 2005.
- ANTUNES, L. M. G; ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. *Revista de Nutrição*, Campinas, v.13, n.2, p.81-88, 2000.
- BARRETO, J. C. *et al.* Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 56, p. 5599-5610, 2008.
- BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, v. 219, n. 6, p.561-571, 2004.
- BELIZÁRIO, J. E. O próximo desafio: reverter o câncer. *Ciência Hoje*, v. 31, n. 184, p.50-57, 2002.
- BRAGA, B. P.; TEIXEIRA, V. R.; CHAMMAS, R. Aspectos moleculares da transformação celular: conceitos e implicações. In: WAITZBERG, D. N. *Dieta, nutrição e câncer*. São Paulo: Atheneu, 2006, cap. 6, p. 79-87.
- BRANCO, I. M. B. H. P. Prevenção do câncer e educação em saúde: opiniões e perspectivas de enfermagem. *Texto Contexto Enfermagem*, Florianópolis, v. 14, n. 2, p.

246-249, abr./jun. 2005. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/tce/v14n2/a12v14n2.pdf>>. Acesso em: 18 fev. 2015.

CALABRESI, P.; CHABNER, B. A. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. *Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1996, cap. 10, p.903-49.

CANUTO, K. M. Propriedades químicas e farmacológicas de Mangiferina (*Mangifera indica*): um composto bioativo de manga. *Embrapa*, Junho, 2009. Disponível: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPATSA-2009-09/40766/1/SDC218.pdf>>. Acesso em: 18 fev. 2014.

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 JUNIOR, A. L.; COUTINHO, S. M. G. *O câncer: algumas informações, crenças e atitudes*. Disponível em: <http://www.sbpq.org.br/_img/trabalhos/11/1.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2015.

CROZIER, A.; JAGANATH, I.B.; CLIFFORD, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural product Reports*, v.26, n.8, p.1001- 1043, 2009.

DELGADO, R. *et al.* *Mangifera Indica* L. extract (Vimang) inhibits Fe²⁺ citrate-induced lipoperoxidation in isolated rat liver mitochondria. *Pharmacol. Res.*, v. 51, p. 427-435, 2005.

EEKEN, 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.

FONSECA, C. A; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. *Infarma*, Brasília, v. 16, n. 7-8, p.51-54, 2004.

GARRIDO, G. *et al.* *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activities of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG). *Pharmacol Res*, v.50, p.143-149, 2004.

GLANZ, K. Behavioral research contribution sand needs in câncer prevention and control: Dietary change. *Prev. Med.*, v.26, p.43-55, 1997.

GRAF, U. The Actual Situation of SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) in *D. melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, v 6, n.2, 2006.

JAGETIA, G. C.; BALIGA, M. S. Radio protection by mangiferin in DBAxC57L mice: a preliminary study. *Phytomedicine*, Jena, v. 12, p. 209-15, 2005.

JORDE, L. B; CAREY, J. C; BAMSHAD, M. J. *Genética Médica*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KEIZER, H. G. *et al.* Doxorubicin (adriamycin): A critical review of free radical-dependet mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacology Therapy*, v. 47, n.2, p. 219-231, 1990.

MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 78, p. 133.137, 2001.

MARTINEZ, G. *et al.* Evaluation of the *in-vitro* antioxidant activity of *Mangifera indica* L: Extract (Vimang). *Phytother Res*, v. 14, p.424-427, 2010.

MEYERS K. J. *et al.* Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *J Agric Food Chem*, v. 51, p.6887-6892, 2013.

MYERS, C. The role of iron in doxorubicin- induced cardiomyopathy. *Semin. Oncology*, v.25, n.4, p. 10-14, 1998.

MULLER, F. L. *et al.* Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biol. Med.*, v.43, p.477-503, 2007.

NEDEL, D. R. *Antioxidantes x radicais livres: a influência das vitaminas antioxidantes no retardo do envelhecimento cutâneo*. 2005. 78f. Monografia. Curso de Graduação em Farmácia, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2005.

NISHIYAMA, Y. *et al.* A human homolog of *Drosophila* warts supressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. *Febs Letters*, v. 459, p. 159-165, 1999.

OJEWOLE, J. A. O. Antiinflammatory, analgesic and hypoglycemic effects of *Mangifera indica* Linn. (Anacardiaceae) stem-bark aqueous extract. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, Barcelona, v. 27, p. 547-554, 2005.

ORSOLIN, P. C. *Avaliação do potencial mutagênico, recombinogênico e carcinogênico do Orlistat em células somáticas de Drosophila melanogaster*. 75 p. 2011. Dissertação (Mestrado em Genética), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

PARDO-ANDREU, G. L. *et al.* Protective effects of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), and its major component mangiferin, on iron induced oxidative damage to rat serum and liver. *Pharmacological Research*, London, v. 57, p. 79.86, 2008.

PAULETTI, P. M. *et al.* New Antioxidant C Glucosylxanthenes from the Stems of *Arrabidaea samydoides*. *J. Nat. Prod.*, v. 66, p. 1384-1387, 2003.

PETRIN, N. *Chá das folhas da manga: benefícios e propriedades*, 2012. Disponível em: <<http://chabeneficios.com.br/cha-das-folhas-de-manga-beneficios-e-propriedades>>. Acesso em: 22 fev. 2015.

PIETTA, P. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.*, v. 63, p. 1035, 2000.

PINTO, A. C. Q. *Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008, p. 402.

PIO-CORRÊA, M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1974.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, Bern, v.67, n.5, p.289-297, 1997.

POULSEN, H.E.; PRIEME, H.; LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *European Journal of Cancer Prevention*, Oxford, v.7, n.1, p.9-16, 1998.

RANG, H. P. *et al.* *Farmacologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 829 p.

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.

SAIRAM, K. *et al.* Evaluation of anti-diarrhoeal activity in seed extracts of *Mangifera indica*. *Journal of Ethnopharmacology*, Amsterdam, v. 84, p.11-15, 2003.

SANTOS, F. L.; LANA, R. P.; SILVA, M. T. C. Ácido linoleico conjugado: estratégia para a elevação do ácido linoleico conjugado em leite de vacas. *Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento*, [S.l], n. 24, p.42-45, 2002.

SIDOROV, R. A. *et al.* Induction of tumor clones in *Drosophila melanogaster wts/+* heterozygotes with chemical carcinogenes. *Mutation Research*, v. 498, p. 181-191, 2001.

SILVA, F. G. *et al.* Potencial alelopático do extrato aquoso foliar de *Mangifera indica* L. (*Anacardiaceae*) sobre a germinação de *Raphanus sativus* L. (*Brassicaceae*). In: ____ X Congresso de Ecologia do Brasil, 16 a 22 de Setembro de 2011, São Lourenço, Minas

Gerais, 2011. Disponível em: <<http://www.seb-ecologia.org.br/xceb/resumos/1261.pdf>>. Acesso em 15 fev. 2015.

SIMEONI, R. B. *Efeitos do transplante autólogo de células-tronco mononucleares da medula óssea na miocardiopatia induzida pela doxorrubicina em ratos Wistar*. 2006. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Paraná, 2006.

SINGAL, P. K. *et al.* Adriamycin- induced heart failure: mechanism and modulation. *Molecular Cell Biochemistry*, v. 207, n.2, p. 77-86, 2000.

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

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant defence: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes*, New York, v. 46, p.14-18, 1997.

SHILS, M. E. *et al.* *Nutrição moderna na saúde e na doença*. 10. ed. São Paulo: Manole, 2009.

VASCONCELOS, T. B. *et al.* Radicais livres e antioxidantes: proteção ou perigo? *Cient. Ciênc. Biol. Saúde*, v.16, n.3, p. 213-219, 2014.

VYAS, A. *et al.* Perspectives on Medicinal properties of Mangiferin. *Mini Rev. Med. Chem.*, fev. 2012.

WEI, P. *et al.* New potential inhibitors of DNA topoisomerases. Part II: design and synthesis of α -lapachona derivatives under microwave irradiation. *Biorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 19, p. 828-830, 2009.

YOSHIMI, N. *et al.* The inhibitory effects of mangiferin: A naturally occurring glucosylxanthone, in bowel carcinogenesis of male F344 rats. *Cancer Lett*, v.163, p.163-70, 2001.