

Avaliação do efeito modulador do óleo de alho (*Allium Sativum* L.) sobre a carcinogenicidade da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Evaluation of the modulating effect of garlic oil (Allium sativum L.) on the carcinogenicity of doxorubicin in somatic cells of Drosophila melanogaster

Ana Caroline Mendonça Cardoso
Graduanda do curso de Medicina (UNIPAM).
E-mail: carol_mg02@hotmail.com

Júlio César Nepomuceno
Professor orientador (UNIPAM).
E-mails: nepomuceno@ufu.com.br; jcnepomuceno@unipam.com.br

Resumo: O alho (*Allium sativum* L.), desde a Antiguidade, era utilizado como condimento e também como planta medicinal, devido a sua capacidade de reduzir o colesterol e a pressão arterial, de possuir atividade antiviral, antifúngica e antibactericida, de contribuir com a glicemia sanguínea e de fortalecer o sistema imunológico. O teste para detecção de clones de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster* foi utilizado com o propósito de se conhecer o efeito modulador do óleo de alho sobre a carcinogenicidade da doxorubicina. Para tanto, larvas *wts+/*mwh** foram tratadas com o quimioterápico doxorubicina (0,4 mM), conhecidamente indutor de tumor, e, posteriormente, com óleo de alho (0,5%; 1% e 5%). O óleo de alho não induziu aumento nas frequências de tumores. Além disso, na associação com a doxorubicina, foram verificadas reduções, estatisticamente significativas, nos tumores induzidos por esse quimioterápico. Portanto, nas condições experimentais propostas neste estudo, o óleo de alho foi capaz de reduzir tumor.

Palavras-chave: Óleo de alho. *Drosophila melanogaster*. Warts. Efeito modulador.

Abstract: Garlic (*Allium sativum* L.) since ancient times was used as a condiment and as a medicinal plant, due to its ability to lower cholesterol and blood pressure, to have antiviral activity, antifungal and antibacterial, contribute to blood glucose and strengthen immune system. The test for the detection of epithelial tumor clones in *Drosophila melanogaster*, was used for the purpose of understanding the modulating effect of garlic oil on the carcinogenicity of doxorubicin. For this purpose, larvae *wts+/*mwh**, were treated with the chemotherapeutic doxorubicin (0.4 mM), known to be tumor-inducing and subsequently with garlic oil (0.5%, 1% and 5%). The garlic oil did not induce tumors frequency increase. Moreover, in combination with doxorubicin were verified statistically significant reductions in this chemotherapy-induced tumors. Therefore, in the experimental conditions in this study, garlic oil was capable of reducing tumor.

Keywords: Garlic oil. *Drosophila melanogaster*. Warts. Modulating effect.

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas na prevenção e/ou cura de doenças é um hábito bastante antigo. Partes da planta, a exemplo da raiz, do caule e das folhas, fornecem substâncias ativas que podem ser empregadas na obtenção de medicamentos (ROSA; BARCELOS; BAMPI, 2012). Para tanto, são necessários estudos que comprovem a eficácia desses medicamentos sem que os mesmos causem danos à saúde do paciente, podendo, assim, utilizá-los com segurança (REZENDE; COCO, 2002).

Esses medicamentos são conhecidos como fitoterápicos e o princípio ativo exclusivamente utilizado é a planta (ANVISA, 2004). Atualmente, essa prática vem aumentando devido ao grande interesse da população por terapias menos agressivas. Outros motivos podem ser o seu baixo custo e o fácil acesso (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

Além disso, devido ao aumento da incidência do câncer, diversos estudos científicos estão sendo realizados com plantas medicinais para tentar desenvolver novas drogas e/ou estratégias para combater a ação dessa doença (SANTOS; LANA; SILVA, 2002). Dentre essas plantas medicinais atualmente testadas com o propósito de regredir ou impedir a progressão do câncer está o alho.

O alho (*Allium Sativum* L.), da família *Liliaceae*, é uma hortaliça bastante consumida mundialmente. É uma planta assexuada que se propaga através do plantio dos bulbilhos ou dentes e pode atingir até 60 centímetros de altura. O bulbo possui forma arredondada, composta por seis a quinze dentes e é a parte utilizada, já que é onde se encontra a maior concentração de fitoquímicos terapêuticos (SIMÕES *et al.*, 2001).

Investigações farmacológicas realizadas *in vitro* e *in vivo* indicaram para o alho atividades antibacteriana, antimicótica, antiviral, antiparasitária, antitumoral, antiflogística, imunomoduladora, antioxidante e fibrinolítica, além de inibição da agregação plaquetária e diminuição das taxas de triglicerídeos e colesterol (SIMÕES *et al.*, 2001).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que populações com hábito de consumo de grandes quantidades de alho apresentam baixa incidência de câncer, principalmente da região gástrica (MAGALHÃES, 2007). Isso ocorre devido à ação antioxidante dessa hortaliça, combatendo os radicais livres, e à ação inibidora da mutagênese (BUTT *et al.*, 2009).

O DNA de um organismo, por não ser uma molécula estática, frequentemente apresenta suas bases expostas a agentes artificiais e naturais, que causam modificações em sua estrutura ou composição química. Essas lesões podem ser induzidas por agentes biológicos, químicos ou físicos que são prejudiciais às células, pois afetam processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica. Além disso, as alterações podem também causar mutações e aberrações cromossômicas, fenômenos esses que podem levar a processos cancerosos e morte celular (COSTA; MENK, 2000).

O câncer é caracterizado por uma proliferação celular descontrolada, que leva a uma massa ou tumor (neoplasma). Os tumores que não invadem ou não entram em metástase não são cancerosos, mas são denominados como tumores benignos. Entretanto, quando o crescimento de um neoplasma não é mais controlado e se torna capaz de progredir, invadindo tecidos vizinhos ou espalhando-se, ele passa a ser denominado como câncer (MIRUNALINI; DHAMODHARAN; KARTHISHWARAN, 2010).

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito modulador do óleo de alho (*Allium Sativum L.*) sobre a carcinogenicidade da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Pretendeu-se, ainda, analisar se haveria redução da frequência de tumores, induzidos pela doxorubicina, na presença do óleo de alho, e verificar se haveria relação dose dependente entre a presença de tumores epiteliais e as concentrações do óleo de alho utilizadas no experimento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Alho (*Allium Sativum L.*)

O alho surgiu nas regiões da Ásia Central, e desde a antiguidade ele é utilizado como medicamento (ANGELIS, 2001). Entretanto, atualmente, está havendo um maior interesse em pesquisar e comprovar cientificamente seus efeitos benéficos, já que ele é um tempero de fácil acesso, amplamente cultivado e mundialmente consumido (ANTUNES; SILVA; CRUZ, 2010). Pode, assim, ajudar uma maior quantidade de pessoas por ter preços acessíveis.

Há indícios de seu uso há mais de 5 mil anos no Antigo Egito, na Grécia e na Babilônia. O primeiro a descrever o uso terapêutico do alho com detalhes, como diurético e laxante, foi Hipócrates. Os médicos romanos também utilizavam o alho para o tratamento de infecções intestinais, senilidade e pressão alta (ALMEIDA *et al.*, 2010).

Em 1858, o microbiologista francês Louis Pasteur descobriu as propriedades antissépticas do alho, o que motivou seu uso durante a Primeira Guerra Mundial. Dentre as suas principais funções estão a capacidade de baixar o colesterol, reduzir a pressão arterial, atividade antiviral e antibactericida, contribuir com a glicemia sanguínea e fortalecer nosso sistema imunológico (ALMEIDA *et al.*, 2013).

A análise dessa raiz demonstrou que ela é rica em proteínas, ácidos graxos, carboidratos, flavonoides, vitaminas A, B1, B2, C, adenosina, saponinas esteroidais e aliina (REUTER, 1990). De acordo com Magalhães (2007), os compostos fitoquímicos do alho podem prevenir o aparecimento ou crescimento de certos cânceres, como os de esôfago, estômago, pulmão, mama e cólon.

Segundo Garcia-Gómez & Sanches-Muniz (2000), o alho é o alimento que contém maior quantidade de compostos organosulfurados e cada tipo apresenta um possível efeito biológico. O quadro 1 apresenta os compostos sulfurados já identificados no alho, bem como a respectiva atividade biológica de cada um deles.

Quadro 1 - Componentes organosulfurados presentes no alho e suas possíveis atividades biológicas

Tipos de Componentes no alho	Possíveis atividades biológicas
Aliina	Hipotensora, hipoglicemiante.
Ajoeno	Previne a formação de coágulos.
Alicina e Tiosulfato	Antibiótica, antifúngica e antiviral.
Alil-mercaptnao	Hipocolesterolêmica, antidiabética e hipotensora.
Dialil-dissulfido	Hipocolesterolêmica e anticancerígena.
S-acil-cisteína	Hipocolesterolêmica, anticancerígena e ação antioxidante.
Compostos gama-glutâmicos	Hipocolesterolêmica, anticancerígena e ação antioxidante.

Fonte: Garcia-Gómez L. & Sanches-Muniz F. *Arch. Lat. Am. Nutr.*, 50(3): 219-27, 2000.

No Brasil, a única preparação comercialmente encontrada é a cápsula de óleo de alho. Ela possui rica composição de vitaminas A1, B2, B6, C, aminoácidos, adenosina, enzimas e sais minerais como ferro, selênio, silício e iodo, além de alicina, ajoeno e outros compostos antioxidantes (SIMÕES *et al.*, 2001).

Estudos epidemiológicos e experimentais sugerem que o óleo de alho tem efeito anticarcinogênico e outras propriedades farmacológicas, por meio de uma série de mecanismos, tais como eliminação de radicais livres, aumento dos níveis de glutathione, incubação do citocromo P4502E1 e, ainda, mecanismos de reparo do DNA e prevenção de danos cromossômicos (MIRUNALINI; DHAMODHARAN; KARTHISHWARAN, 2010).

Os efeitos indesejados mais frequentes ocasionados pela utilização de produtos farmacêuticos a base de alho e também sua utilização como alimento são as erupções a partir da ingestão ou contato com o alho em pessoas alérgicas (SIMÕES *et al.*, 2001).

2.2 Câncer

Um importante problema de saúde pública em países em desenvolvimento e desenvolvidos é o câncer, uma enfermidade multicausal crônica. Ele tem sido responsável por milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo (GUERRA *et al.*, 2005).

Algumas doenças registradas pelos médicos do Egito antigo (3000 a.C.) provavelmente podiam ser classificadas como câncer devido as suas características. Enfermidades que se assemelhavam aos cânceres de estômago, reto, mama, útero, pele e outros órgãos também foram descritas por Hipócrates (377 a.C.). No entanto, apenas no século XVIII que passaram a existir na Europa registros que designam a causa das mortes como câncer (BARROS *et al.*, 2004).

As células normais de todo organismo vivo coexistem em perfeita harmonia funcional, citológica e histológica no sentido de manutenção da vida. Elas se reconhecem por processos de superfícies, os quais ditam quais células devem

permanecer juntas e quais células devem interagir para executar determinada função orgânica (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2002).

O ciclo celular é integrado pelo aumento da massa celular, duplicação do ácido desoxirribonucléico, divisão física da célula em duas células filhas idênticas e repouso. Tais processos são conhecidos como G1, S, G2, M, G0 (GRIFFITHS, 2006).

O organismo humano encontra-se exposto a múltiplos fatores carcinogênicos, com efeitos aditivos ou multiplicativos. Entretanto, a carcinogênese também pode iniciar-se de forma espontânea, em que, independente da exposição a carcinógenos, as células sofrem processos de mutação, como danos oxidativos, erros de ação das polimerases e das recombinases e redução e reordenamento cromossômico (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Os cientistas descobriram que existem genes que estimulam o crescimento de células e outros que o detêm. Os proto-oncogenes são genes de crescimento que, caso sofram mutação, irão se tornar oncogenes (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Os oncogenes ativados irão codificar proteínas que agem em muitas etapas na via que controla o crescimento celular, incluindo os fatores de crescimento que estimulam a divisão celular, os receptores e as proteínas citoplasmáticas que traduzem esses sinais, os fatores de transição que respondem aos sinais traduzidos e as proteínas que impedem a morte celular programada (MIRUNALINI; DHAMODHARAN; KARTHISHWARAN, 2010).

Entretanto, enquanto as proteínas codificadas pelos proto-oncogenes induzem a divisão celular, existem genes que atuam interrompendo a divisão da célula, sendo denominados de supressores de tumores. Por esse motivo, eles devem também estar danificados (por mutações) para que uma célula possa crescer indevidamente (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Existem, também, os genes de reparo que são responsáveis pelo reparo do DNA alterado. As mutações nos genes de reparo contribuem para a malignidade através da perda de ambos os alelos de genes que estão envolvidos no reparo de danos de DNA. Sendo assim, quebras cromossômicas e mutações secundárias adicionais acumulam em um proto-oncogenes ou em outros genes supressores de tumor, induzindo a formação de células tumorais (MIRUNALINI; DHAMODHARAN; KARTHISHWARAN, 2010).

Sua prevenção tem tomado uma dimensão importante no campo da ciência, uma vez que, recentemente, foi apontada como a primeira causa de mortalidade no mundo. Atualmente, os principais tratamentos do câncer têm sido a excisão cirúrgica, a radioterapia e a quimioterapia (RANG *et al.*, 2007).

2.3 Doxorubicina

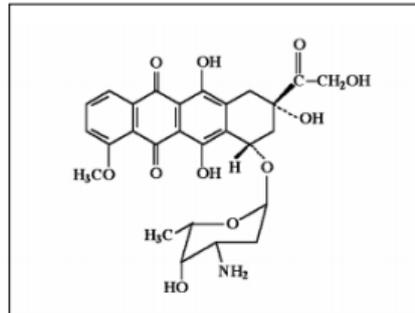
O cloridrato de Doxorubicina (DXR) é um medicamento comercialmente conhecido como Adriblastina RD[®] que possui propriedades antineoplásicas. Ele atua inibindo a síntese proteica e bloqueando a replicação de DNA e RNA, sem ciclo celular específico. Dessa forma, ele altera o DNA das células cancerígenas e impede que a doença se espalhe para outros órgãos (GILMAN; LIMBIRD; HARDMAN, 1996).

É um medicamento de uso injetável indicado para o tratamento quimioterápico de pacientes com câncer, como exemplo, de pulmão, mama, bexiga, entre outros. A

doxorubicina é um antibiótico antraciclínico citotóxico e genotóxico obtido de culturas de *Streptomyces peucetius* *var. Caesi* (GILMAN; LIMBIRD; HARDMAN, 1996).

A doxorubicina é uma molécula anfifílica que tem um núcleo naftacenediona fluorescente no C7, ligado a uma cadeia lateral aminoglicosídica hidrofílica (Figura 1). Sua fórmula química é $C_{27}H_{29}NO_{11}$, com peso molar de 543.46 g/mol (TREVISAN; POPPI, 2003).

Figura 1: Fórmula estrutural da doxorubicina



Fonte: TREVISAN; POPPI, 2003.

Os efeitos colaterais, assim como todas as drogas neoplásicas, podem ser febre, náusea, diarreia, falta de apetite, inflamação na boca, diminuição das plaquetas no sangue, diminuição dos leucócitos e perda de cabelo. A droga em questão é teratogênica, sendo assim, ela é contraindicada em mulheres grávidas ou em fase de lactação (ADRIBLASTINA® RD.: pó liofilizado, 2014).

Em *Drosophila melanogaster*, a doxorubicina é empregada como controle positivo no teste para detecção de tumores epiteliais (*warts*), induzindo significativamente a formação de tumores epiteliais por vários segmentos do corpo da mosca (COSTA; OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2011).

2.4 Warts (wts) - teste para detecção de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila* é um organismo eucarionte que se enquadra na família *Drosophilidae*, ordem *Diptera*, classe *Insecta*. A *Drosophila melanogaster*, conhecida como mosca da fruta, tem sido utilizada em pesquisas genéticas desde 1909. Ela tem se mostrado ideal para os testes de detecção de agentes genotóxicos e antígenotóxicos por possuir grande progênie, curto tempo de gestação, baixo número de cromossomos, facilidade de manutenção em laboratório e reações metabólicas semelhantes às dos mamíferos (GRAF *et al.*, 1996).

O macho se difere da fêmea em relação à presença do pente sexual e ao menor tamanho (Figura 2). Essa mosca possui uma homologia genética com o organismo humano de 80% e, de acordo com Griffiths (2006), a importância dessa mosca, como organismo modelo para a genética humana, é demonstrada pela descoberta de que 60% dos genes causadores de doenças em humanos, bem como 70% dos genes de câncer, têm contrapartes na *Drosophila*.

Figura 2: Casal de *Drosophila melanogaster*: o macho (direita) é menor e possui pente sexual indicado pela seta. Já a fêmea (esquerda) é maior e não apresenta pente sexual.



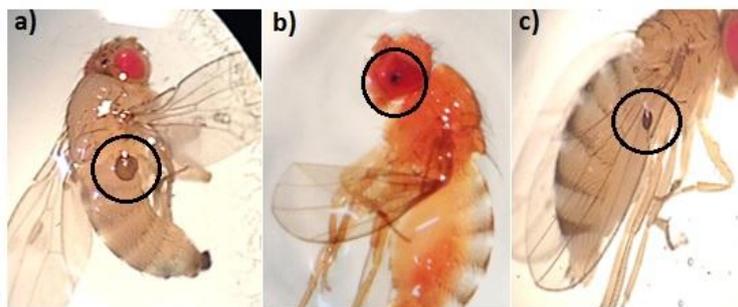
Fonte: Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – MG.

O teste para detecção de tumores epiteliais em *D. melanogaster* (*warts*) é utilizado para avaliar o efeito carcinogênico ou anticarcinogênico de diversos compostos como medicamentos, produtos naturais, entre outros. Isso é devido ao fato do controle do ciclo celular ser feito de forma semelhante ao das células somáticas em mamíferos (COSTA; OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2011).

Os discos imaginais das larvas de *Drosophila* possuem apenas uma camada celular. Durante o processo de metamorfose, essa camada única de célula desenvolve-se nas estruturas epidérmicas das moscas adultas. Um dos genes envolvidos no ciclo celular é o *wts* (COSTA; OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2011), que atua como supressor de tumor.

Dessa forma, a deleção desse gene acarreta na formação de clones de células que são consideravelmente invasivas, tendo capacidade de se desenvolver na forma de “verrugas” (*warts* em inglês) por todo o corpo da mosca (Figura 3).

Figura 3: (a) Tumor no corpo. (b) Tumor no olho. (c) Tumor na asa.



Fonte: Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – MG.

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção do óleo de alho

O óleo de alho é um medicamento fitoterápico de uso oral vendido na forma de cápsula mole de gelatina, possui forma oval de coloração natural. A cápsula contém

250 mg de óleo de alho, que possui coloração amarelo claro, odor característico e livre de material estranho. Deve ser armazenado em temperatura entre 15 a 30°C e máximo de 50% de umidade relativa. Esse medicamento, que foi utilizado no experimento do presente trabalho, é fabricado pela Colbras Indústria e Comércio Ltda (Softcaps) e distribuído sob MS – 5.0835.0030.001-1 Farmacêutica responsável: Dra. Kely Cristina de Lima Oliveira – CRF-SP nº 52.472. O laboratório encontra-se na Estr. Dos Estudantes - 349-Granja Viana II – 06707-050 - Cotia, SP, CNPJ 00.413.925/0001-64 - Indústria Brasileira. A venda é feita sem prescrição médica.

3.2 Agente químico

Como agente indutor de tumor utilizou-se a doxorrubicina (CAS 23214-92-8). Cada frasco-ampola contém 5 mg de pó liofilizado para solução injetável. Deve-se ter cuidado com esse medicamento por que se trata de um agente citotóxico. Seu uso é restrito a hospitais e a venda só é feita sob prescrição médica. Além disso, deve-se armazenar o produto em temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C), protegido da luz, evitando o calor excessivo (acima de 40°C).

3.3 Teste para detecção de tumores epiteliais em *D. melanogaster*

As seguintes linhagens de *Drosophila melanogaster* foram utilizadas: 1) *wts/TM3, Sb1*, linhagem que apresenta um alelo letal *warts (wts)* no cromossomo 3, balanceado por um cromossomo TM3, caracterizado por múltiplas inversões e marcado por uma mutação dominante *stubble (Sb)*, que é caracterizada, fenotipicamente, pela presença, em todo corpo da mosca, de pelos curtos e mais grossos. Essa linhagem foi gentilmente cedida pelo Bloomington Drosophila Stock Center, da Universidade de Indiana, USA, com o número de registro: Bloomington/7052; 2) *multiple wing hairs (mwh/mwh)*. As moscas da linhagem *mwh* possuem o gene marcador no cromossomo 3 (3-0,3) numa posição distal, caracterizado por expressar três ou mais pelos em cada célula. A linhagem é mantida em homozigose por ser esta uma mutação viável. Essa linhagem foi gentilmente cedida pelo Dr. Ulrich Graf (Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Science, ETH Zurich, Schwerzenbach, Switzerland).

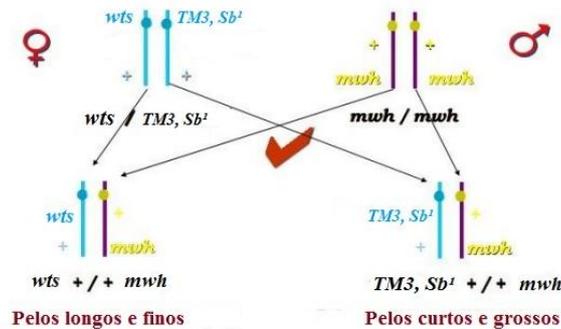
Os estoques são cultivados no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM, mantidas em frascos de ¼ de litro, contendo meio de cultura de *D. melanogaster*. Esse meio é composto por 820 mL de água, 25g de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*), 11 g de agar, 156 g de banana e 1g de nipagin. As linhagens são conservadas dentro de uma incubadora B.O.D. 411 D, a uma temperatura em torno de 25° C e 60% de umidade.

3.3.1 Cruzamento

Para a realização dos cruzamentos (Figura 4), os machos *mwh/mwh* e as fêmeas virgens *wts/TM3, Sb¹* foram colocados em um mesmo frasco. Todas as larvas descendentes desse cruzamento foram tratadas com óleo de alho. No entanto, somente as moscas adultas de pelos longos e finos foram analisadas, ou seja, somente as moscas

que não eram portadoras do balaceador cromossômico (*TM3, Sb¹*), já que ele impede a expressão de tumores.

Figura 4: Esquema representativo dos cruzamentos no teste warts (*wts*). Fêmeas virgens *wts/TM3, Sb¹*, cruzadas com machos *mwh/mwh*.



Fonte: Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – MG.

3.4 Procedimento experimental

A coleta dos ovos descendentes dos cruzamentos entre fêmeas virgens *wts/TM3, Sb¹*, com machos *mwh/mwh*, ocorreu durante um período de 8 horas, em 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.

Para o tratamento, foram utilizadas as larvas de 72 horas do primeiro cruzamento. Elas foram divididas em oito tubos de 25 ml, contendo 1,5 g de purê de batata (meio alternativo para a *Drosophila*). Os tubos ficaram da seguinte forma:

1. Purê de batata (1,5 g) + Tween 80 a 1% + larvas - controle negativo
2. Purê de batata (1,5 g) + DXR 0,4 mM + larvas - controle positivo
3. Purê de batata (1,5 g) + óleo de alho 0,5% + larvas
4. Purê de batata (1,5 g) + óleo de alho 1% + larvas
5. Purê de batata (1,5 g) + óleo de alho 5% + larvas
6. Purê de batata (1,5 g) + DXR 0,4 mM + óleo de alho 0,5% + larvas
7. Purê de batata (1,5 g) + DXR 0,4 mM + óleo de alho 1% + larvas
8. Purê de batata (1,5 g) + DXR 0,4 mM + óleo de alho 5% + larvas

Como controle positivo, utilizou-se a doxorrubicina 0,4 mM e como controle negativo, Tween 80 a 1%. Nessa etapa do tratamento, as larvas ficaram expostas aos agentes químicos testados por um período de sete dias. Após se alimentarem dos meios e finalizarem a metamorfose, os adultos foram coletados e armazenados em frascos devidamente identificados e preservados em etanol 70%.

3.5 Análise das moscas

Para a análise das moscas que possuíam fenótipos pelos longos e finos, foram utilizadas lupas estereoscópicas e pinças entomológicas. Além disso, para registrar a frequência de tumores, utilizou-se uma planilha padrão, que separou quantitativamente a incidência de tumores nas regiões do olho, cabeça, asa, corpo, perna, halteres e o total por mosca em cada concentração testada.

3.6 Análise estatística

As diferenças estatísticas entre a frequência de tumor das concentrações testadas e dos controles (positivo e negativo) foram calculadas utilizando o teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney, empregando o nível de significância $< 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A doxorubicina 0,4 mM foi utilizada para o controle positivo, e observou-se uma frequência de 2,03 tumores por mosca, mostrando que a linhagem responde à indução tumoral.

A doxorubicina destaca-se pelo seu amplo espectro antitumoral em seres humanos. Ela induz a apoptose em células tumorais por meio do bloqueio do ciclo celular. Entretanto, nas *Drosophila melanogaster*, a doxorubicina é empregada induzindo significativamente a formação de tumores epiteliais por vários segmentos do corpo da mosca (COSTA; OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2011). Isso ocorre devido ao fato dessa substância ter ação sistêmica, podendo também causar alterações em células saudáveis. Dessa forma, a mutação e recombinação mitótica nos indivíduos heterozigotos podem levar a clones mutantes que induzem a formação dos tumores.

Para o controle negativo, foi utilizado o Tween 80 a 1%, tendo uma frequência de 0,24 tumores por mosca. Essa discreta indução de tumores ocorre devido à predisposição genética do organismo teste. A frequência de clones de tumor por segmento do corpo da *Drosophila melanogaster*, obtida neste trabalho, pode ser observada na Tabela 1.

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

Tratamento			Frequência de tumores analisados (total de tumores)						
Óleo de alho (concentração) %	DXR (mM)	Número de moscas	Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter	Total
0	0	200	0.01 (02)	0.04 (08)	0.02 (04)	0.14 (28)	0.03 (07)	0.00 (00)	0.24 (49)
0	0.4	200	0.09 (19) +	0.13 (27) +	1.09 (219) +	0.44 (88) +	0.22 (45) +	0.04 (08) +	2,03 (406) +
0,5	0	200	0.01 (03) -	0.01 (03) -	0.05 (10) -	0.02 (04) -	0.00 (00) -	0.00 (01) -	0.10 (21) -
1,0	0	200	0.00 (01) -	0.04 (09) -	0.02 (04) -	0.01 (03) -	0.01 (03) -	0.00 (00) -	0.10 (20) -
5,0	0	79	0.00 (00) -	0.01 (01) -	0.02 (02) -	0.15 (12) -	0.00 (00) -	0.00 (00) -	0.18 (15) -
0,5	0.4	200	0.08 (16) -	0.08 (17) -	0.84 (169) -	0.13 (26) *	0.19 (38) -	0.03 (07) -	1,36 (273) *
1,0	0.4	200	0.00 (01) *	0.04 (08) *	0.10 (20) *	0.04 (09) *	0.02 (04) *	0.01 (02) -	0,22 (44) *
5,0	0.4	200	0.00 (00) *	0.05 (10) *	0.10 (21) *	0.06 (13) *	0.04 (09) *	0.01 (02) -	0,27 (55) *

Diagnóstico estatístico de acordo com o Teste *U* 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) ($P < 0,05$).

DXR, Doxorubicina.

As larvas expostas apenas ao óleo de alho nas concentrações de 0,5%, 1% e 5% apresentaram uma frequência de 0,10; 0,10 e 0,18 tumores por moscas, respectivamente. Esses valores demonstraram que o óleo de alho, quando comparado ao controle negativo, não induziu uma quantidade de tumores, estatisticamente significativo, para ser considerado carcinogênico. Entretanto, o mesmo deve ser usado com cautela, já que seu consumo em quantidades excessivas pode causar alguns efeitos colaterais, como irritações gástricas (MIRUNALINI; DHAMODHARAN; KARTHISHWARAN, 2010).

Nos tratamentos em que foram associados a doxorubicina 0,4 mM com o óleo de alho em diferentes concentrações (0,5%, 1% e 5%) foram verificadas as frequências de 1,36; 0,22 e 0,27 tumores por mosca, respectivamente. Sendo assim, foi possível observar que esses três valores foram significativamente menores, em comparação com o controle positivo (DXR). Diante disso, evidencia-se que o óleo de alho é capaz de reduzir tumores. Entretanto, ele não mostrou indicações de dose resposta na associação com a doxorubicina, já que a redução de tumor foi maior na concentração de 1% em relação à de 5%.

O alho possui substâncias bioativas, chamadas de fitoquímicos. Essas substâncias são compostos sulfúricos e não sulfúricos, os quais, a grande maioria, atuam como antioxidantes, protegendo as células e órgãos da ação destrutiva dos radicais livres, prevenindo o aparecimento ou a progressão de certos tipos de câncer (ANJO, 2004; FRANCO, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2006).

Acredita-se que os efeitos protetores do alho ocorrem por três caminhos: inibição do metabolismo de células tumorais, inibição da iniciação e/ou promoção da carcinogênese e modulação da resposta imunológica (QUINTAES, 2001).

Quando um dente de alho é amassado, algumas células que formam o bulbo são quebradas, liberando uma enzima chamada de aliína que, em contato com outra enzima chamada de aliinase, forma a alicina. Em seguida, a alicina se transforma em

outros compostos como o ajoeno, o dialil sulfido (DAS), o dialil dissulfido (DADS) e várias outras moléculas (MAGALHÃES, 2007).

No total, pelo menos 20 compostos derivados do alho foram estudados e mostraram atividades anticancerígena. Entretanto, o DAS e o DADS, ambas substâncias solúveis em óleo, são, geralmente, considerados como as principais moléculas do alho capazes de ter um papel na prevenção do câncer (CAMPOS, 2004).

O dialil sulfido e o dialil dissulfido inibem as enzimas responsáveis pela ativação dos carcinógenos, aumentando, ao mesmo tempo, aquelas que estão implicadas na eliminação desses compostos. Dessa forma, as células ficam menos expostas aos agentes cancerígenos e, conseqüentemente, menos suscetíveis de sofrer danos no nível do seu DNA, acarretando o desenvolvimento do câncer. Além disso, o dialil sulfido contribui na morte das células cancerosas, pois ele modifica a aptidão dessas células de exprimir certas proteínas que as conferem capacidade de resistir a alguns medicamentos da quimioterapia (CUPPARI, 2002).

Outros compostos também elevam a capacidade total antioxidante do organismo, sendo eles: os fenólicos, como os flavonoides, quercetina, apigenina e miricetina, e compostos organosulfurados, como a alicina e a S-alilcisteína. Esses compostos agem diretamente como varredores dos radicais livres. Isso quer dizer que os compostos sulfurados aliados aos fenólicos incrementam a ação medicamentosa do alho (MIEAN; MOHAMED, 2001; LANZOTTI, 2006).

Além disso, o alho possui propriedade de imunoestimulação. Esse fato está relacionado aos seus altos teores de zinco e selênio e, também, à presença de substâncias que promovem a proliferação de células T e de citocinas produzidas por macrófagos, estimulando, assim, a imunidade humoral e a celular (QUINTAES, 2001).

De acordo com Magalhães (2007), o alho pode prevenir o crescimento ou aparecimento de certos cânceres, como o de pulmão, o de cólon, o de estômago, o de esôfago e, ainda, o câncer de mama, combatendo a formação de nitrosaminas, que são carcinógenos que se ligam ao DNA formando o câncer. Em um estudo com ratos de laboratório, o DAS foi capaz de neutralizar o desenvolvimento do câncer de pulmão provocado pela NNK, uma nitrosamina extremamente tóxica, formada pela transformação da nicotina, quando da combustão do tabaco.

Em resumo, as propriedades anticancerígenas do alho parecem principalmente ligadas ao seu conteúdo em compostos sulfurados. Esses compostos previnem a ativação das substâncias cancerígenas, diminuindo a sua reatividade e acelerando a sua eliminação, contribuindo, assim, para reduzir os danos causados por essas substâncias ao DNA, principal alvo visado por esses cancerígenos. Por outro lado, essas moléculas também são capazes de reduzir a propagação dos tumores, interferindo com o processo de crescimento das células cancerosas, o que provoca a morte dessas células por apoptose.

5 CONCLUSÃO

As evidências comprovaram a eficácia terapêutica do óleo de alho na redução e proteção contra tumores, já que, neste trabalho, ele diminuiu a concentração de células tumorais na *Drosophila melanogaster*. Essa proteção parece ser resultado de vários

mecanismos, incluindo: bloqueio da formação de compostos nitrosaminas, hepatoproteção seletiva contra substâncias carcinogênicas, supressão da bioativação de vários carcinogênicos, aumento do reparo do DNA, redução da proliferação celular e/ou indução da apoptose.

Evidenciou-se, ainda, que os resultados não são dose-dependentes, já que houve uma maior redução na frequência de tumor na concentração de 1%. Entretanto, é necessário precaução ao administrar o óleo de alho, já que o consumo de composto em quantidades excessivas pode causar alguns efeitos colaterais, como irritações gástricas, náuseas, asma alérgica e interação com medicamentos, causando a inibição destes (MIRUNALINI; DHAMODHARAN; KARTHISHWARAN, 2010).

O potencial carcinogênico do óleo de alho não foi comprovado nas doses testadas. Assim, a sua utilização não comprometeria o quadro de pacientes oncológicos. Sendo assim, este estudo abre caminhos para demais pesquisas para determinar qual a melhor forma e dosagem necessária de alho para a obtenção desses efeitos anticarcinogênicos. Dessa forma, será possível promover uma terapia menos agressiva, de baixo custo e de fácil acesso, melhorando a saúde, a qualidade de vida e o prognóstico dos pacientes oncológicos.

REFERÊNCIAS

ADRIBLASTINA® RD.: pó liofilizado. José Cláudio Bumerad. Milão: Pfizer, 2014. *Bula de remédio*. Disponível

em: <http://www.pfizer.com.br/sites/g/files/g10024531/f/product_attachments/AdriblastinaRD.pdf>. Acesso em: 04 de abril de 2014.

ALMEIDA, M *et al.* Alho: Tecnologia em Gastronomia. *Noções de Nutrição*, 2013.

Disponível em: <<http://200.156.25.3/gastronomiavancada/alho/seminariodealho.htm>>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2014.

ALMEIDA, V.L de *et al.* Câncer e agentes antineoplásticos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quím Nova*, vol. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ANGELIS, R.C de. *Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas*. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

ANJO, D.F.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *J Vasc Br*, Jaguará do Sul, v.3, n.2, p.146-152, 2004.

ANTUNES, D.C; SILVA, I.M.L; CRUZ, W.M.S. Quimioprevenção do câncer gástrico. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Rio de Janeiro, 367-374, 2010.

BARROS, M.E *et al.* Dieta e Câncer: um enfoque epidemiológico. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 17, n.º 4. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732004000400009>. Acesso em: 23 de fevereiro de 2014.

BUTT, M.S *et al.* *Garlic: nature's protection against physiological threats*. London: Taylor And Francis Group, 2009. p. 538-551.

CAMPOS, S de. *Alho, sempre um alimento polêmico*. 2004. Disponível em: <<http://www.drashirleydecampos.com.br/noticias/12167>>. Acesso em 10 de maio de 2014.

COSTA, R.M.A.; MENK, C.F.M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. *Biotecnologia: ciência e desenvolvimento*, v.3, n.12, 2000.

COSTA, W.F; OLIVEIRA, A.B; NEPOMUCENO, J.C. Lapachol as an epithelial tumor inhibitor in *Drosophila melanogaster* heterozygote for tumor suppressor gene *wts*. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, v. 10, n. 4, p.3236-3245, 2011.

CUPPARI, L. Guia de Medicina. Ambulatorial e Hospitalar. *Nutrição Clínica no Adulto*. Unifesp (Escola Paulista de Medicina). Manole: São Paulo, 2002.

DISTRITO FEDERAL. ANVISA (org.). *O que são fitoterápicos?* 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/poster_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2014.

FRANCO, R.C. *Análise comparativa de legislações referentes aos alimentos funcionais*. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana Aplicada) – Programa de Pós-graduação Interunidades em Nutrição Humana Aplicada, Universidade de São Paulo: São Paulo, 167f, 2006.

GARCIA-GÓMES, L; SANCHES-MUNIZ, F. Saúde à mesa: alho (*allium sativum*). *Revista Nutrição, saúde e performance*. jun./jul. 219-27, 2000.

GILMAN, A.G; LIMBIRD, L.E; HARDMAN, J.G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Graw Hill, 1996.

GRAF, U *et al.* The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *Afr Newslett on Occup Health and Safety*, 9-13, 1996.

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

GUERRA, M.R *et al.* Risco de Câncer no Brasil: Tendências e Estudos Epidemiológicos Mais Recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 227-234, 2005.

LANZOTTI, V. The analysis of onion and garlic. *J Chromat*, v. 11, p.3-22, 2006.

MAGALHAES, L. *Os alimentos contra o câncer*. Petrópolis: Vozes, 2007.

MIEAN, K.H; MOHAMED, S. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. *J Agric Food Chem*, v. 49, p.3106-12, 2001.

MIRUNALINI, S; DHAMODHARAN, G; KARTHISHWARAN, K. A. Natural Wonder Drug Helps to Prevent Cancer: Garlic Oil. *Not Sci Biol*. v.2, p. 14-19, 2010.

NUSSBAUM, R.L; McINNES, R.R; WILLARD, H.F. *Thompson & Thompson, Genética Médica*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

QUEIROZ, Y.S de *et al.* Influência dos aditivos alimentares na atividade antioxidante in vitro de produtos de alho. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara v.17, n.3, p.287-293, 2006.

QUINTAES, K.D. Alho, Nutrição e Saúde. *Revista Nutriweb*, v.3, 2001. Disponível em: <<http://www.epub.org.br/nutriweb/n0302/alho.htm>>. Acesso em: 20 de maio de 2014.

RANG, H.P *et al.* *Quimioterapia do câncer: farmacologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. cap. 51, p.718-736.

REUTER, H.D. Knoblauch: lassen sich die Risikofaktoren der Arteriosklerose beeinflussen? In: *PTA Heute: Deutsche Apotheker Zeitung*, v.4, n.9, p.416-424, 1990.

REZENDE, H.A; COCCO, M.I.M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. *Revista Escola Enfermagem - USP*, 282-8, 2002.

ROSA, R.L; BARCELOS, A.L.V; BAMPI, G. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D' Oeste - SC. *Rev. bras. plantas medicinais*, vol.14, n.2, pp. 306-310, 2012.

SANTOS, F.L; LANA, R.P; SILVA, M.T.C. Ácido Linoléico Conjugado. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 24, p.42-45, 2002.

SIMÕES, C.M.O *et al.* *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. Porto Alegre: Editora UFSC/ Editora UFRGS, 2001.

TREVISAN, M.G; POPPI, R.J. Determination of doxorubicin in human plasma by excitation-emission matrix fluorescence and multi-way analysis. *Analytica Chimica Acta*, 493, 69-81, 2003.

YUNES, R.A; PEDROSA, R.C; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Quím Nova*, vol.24, n.1, p. 147-152, 2001.