

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*

Nayane Moreira Machado

Aluna do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do
Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM.

Júlio César Nepomuceno

Professor orientador. Centro Universitário de Patos de Minas.

Resumo: A vitamina K atua como coenzima durante a síntese de várias proteínas envolvidas na coagulação sanguínea e no metabolismo ósseo. É uma vitamina lipossolúvel produzida no intestino, e os seus excessos são estocados no fígado. É encontrada em vegetais verdes, óleos vegetais, principalmente de soja e canola, em carnes, queijos, frutas, raízes, e produtos de origem animal. Já foi demonstrada que a vitamina K no câncer é capaz de induzir a apoptose e inibir a proliferação celular maligna, apresentando potencial de redução dos cânceres de mama, próstata, gliomas, tumores de cabeça e pescoço. Sabendo-se disso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial anticarcinogênico da vitamina K, por meio do teste para detecção de tumor epitelial (*warts*) em *Drosophila melanogaster*. Para tanto, foram realizados tratamentos, com larvas de 72h resultantes do cruzamento entre fêmeas *wts/TM3, Sb* e machos *mwh/mwh*, com diferentes concentrações de vitamina K (0,25; 0,50 e 1,0mg/mL) isoladamente e associadas com um agente carcinogênico (Doxorrubicina [DXR] 0,125mg/ml). Os resultados obtidos na avaliação dos possíveis efeitos carcinogênicos da vitamina K (0,25; 0,50 e 1,0mg/mL) demonstraram que não houve aumento, estatisticamente significativo, de tumores quando comparados com o controle negativo (água). Na avaliação do efeito anticarcinogênico da vitamina K associada, simultaneamente, com a DXR, houve uma redução, estatisticamente significativa, nas frequências de tumores em todas as concentrações testadas, quando comparadas ao controle positivo (DXR). Tais resultados permitem concluir que a vitamina K, nas condições experimentais, não induziu à ocorrência de tumores e diminuiu as frequências destes, quando induzidos pela DXR, em *D. melanogaster*.

Palavras-chave: Vitamina K. *Drosophila melanogaster*. Anticarcinogênico. Tumor.

Abstract: Vitamin K acts as a coenzyme during the synthesis of many proteins involved in the blood coagulation and osseous metabolism. It is a fat soluble vitamin produced in the intestine, and its excesses are supplied in the liver. It is found in green vegetables, vegetable oils, especially soybean and canola, in meats, cheeses, fruits, roots, and products of animal origin. It has been demonstrated that vitamin K in cancer is able to induce the apoptosis and inhibit malignant cellular proliferation, presenting reduction potential in the breast cancer, prostate cancer, in gliomas, and in head and neck tumors. With this information, the present work aimed at evaluating the anticarcinogenic potential of vitamin K, through the test for detection of epithelial tumor (*warts*) in *Drosophila melanogaster*. This way, we fulfilled treatments with 72-hour larvae resulting from crosses among *wts/TM3, Sb* females, and *mwh/mwh* males, with different concentrations of vitamin K, (0,25; 0,50 e 1,0mg/mL), isolated and associated with a carcinogenic agent (Doxorubicin [DXR] - 0,125mg/ml). The results obtained in the evaluation of the possible carcinogenic effects of the vitamin K (0,25; 0,50 e 1,0mg/mL)

demonstrated that there was no statistically significant increase of tumors when compared with negative control (water). In the evaluation of the anticarcinogenic effect of vitamin K simultaneously associated with DXR, there was a statistically significant decrease in the frequencies of tumors in all tested concentrations, when compared to positive control (DXR). Such results may permit us to conclude that vitamin K, in experimental conditions, did not induce the occurrence of tumors and reduced their frequencies, when induced by DXR, in *Drosophila melanogaster*.

Keywords: Vitamin K. *Drosophila melanogaster*. Anticarcinogenic. Tumor.

1. Introdução

O gene, a unidade funcional básica da hereditariedade, é o ponto focal da disciplina genética moderna. Em todas as linhas de pesquisa genética, o gene é o ponto central de uma grande diversidade de experimentos (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

O conceito de hereditariedade foi apresentado pela primeira vez em 1865 por Gregor Mendel. Até então, pouco progresso tinha sido feito na compreensão dos mecanismos de hereditariedade. O trabalho de Mendel constituiu o protótipo da análise genética. Ele fundamentou um enfoque lógico e experimental para a hereditariedade que ainda é usado hoje (GRIFFITHS *et al.*, 2002). Wilhelm Johannsen, botânico geneticista, em 1909 introduz o termo gene para explicar a expressão de um dado fenótipo (palavra também criada por ele) (THYSSE, 2009).

Nas últimas décadas, milhares de genes foram mapeados em localizações específicas nos cromossomos. Além do mapeamento de genes, os geneticistas moleculares apontaram com precisão os defeitos moleculares subjacentes a algumas importantes doenças genéticas. Essas pesquisas contribuíram, significativamente, para o nosso entendimento dos modos pelos quais defeitos gênicos podem causar doenças, abrindo caminho pra tratamentos mais efetivos e curas potenciais (BAMSHAD *et al.*, 2004).

Atualmente o estudo da genética tornou-se essencial para compreendermos a fisiopatogenia das doenças, visto que a genética fornece base para a compreensão da constituição e função biológica do organismo, contribuindo para um melhor conhecimento dos processos patogênicos (LOURO *et al.*, 2002).

1.1. Genética e câncer

No decorrer da vida, o DNA sofre alterações denominadas de mutações, que podem ser causadas por erros durante a duplicação do DNA, na divisão celular. O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies. Muitas das mutações não implicam mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo e, portanto, passam despercebidas. Outras mutações podem determinar a morte celular e, por consequência, não são, também, detectáveis. Assim, apenas um pequeno número de mutações que ocorrem em genes específicos pode determinar vantagens e um crescimento desordenado de células (RIBEIRO *et al.*, 2003).

As células em crescimento de clones neoplásicos acumulam uma série de mudanças genéticas e epigenéticas que ocasiona mudança na atividade gênica, e então altera o fenótipo. O câncer começa, então, em uma célula ou em uma população de célula que despreza o controle normal de proliferação (PONDER, 2001).

As causas são uma mistura de combinações de componentes do meio ambiente e de alterações genéticas que ocorrem nos tecidos. As alterações genéticas podem ocorrer em qualquer célula, em qualquer estágio do ciclo celular, resultantes de mutações gênicas, aberrações cromossômicas, recombinações e elementos genéticos de transposição (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

Os agentes mutagênicos podem acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias (RIBEIRO *et al.*, 2003). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (2008), o câncer ou neoplasia é o nome dado a um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa, simplesmente, uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida.

As células neoplásicas estão desacopladas dos mecanismos regulatórios que controlam a proliferação celular devido ao acúmulo de mutações nas células que suprimem o controle do ciclo celular. As neoplasias derivam de uma única célula fundadora que sofreu mutação somática; entretanto, as células mutantes descendentes sofrem mutações adicionais, formando um setor mutante (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

Existem mais de 100 genes, dentre os envolvidos no controle de divisão celular, e, portanto, envolvidos com o câncer (JORDE *et al.*, 2004). Esses genes são divididos em três principais categorias: os supressores de tumores são genes que inibem a proliferação celular; os proto-oncogenes são genes envolvidos basicamente no crescimento celular, e quando mutados são chamados de oncogenes; e, por último, os que participam do reparo do DNA, que são os genes de reparo (LOURO *et al.*, 2002).

As etapas do desenvolvimento de uma neoplasia são: iniciação, promoção e proliferação (WEINBERG, 1996). A iniciação envolve a transformação da célula produzida pela interação das substâncias químicas, radiação ou vírus com DNA celular. A transformação ocorre rapidamente, mas a célula resultante permanece dormente por um período variável até que seja ativada por um agente promotor. Durante a promoção, as células iniciadas se multiplicam para formar um tumor discreto. A partir daí, a proliferação procede, levando eventualmente a uma neoplasia completamente maligna com a capacidade de invasão tecidual e metástase (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2005).

As células neoplásicas se diferem das normais por várias mudanças fenotípicas específicas, como a rápida taxa de multiplicação, invasão de novos territórios celulares, alta taxa metabólica e formas alteradas no tamanho, no núcleo, no número e estrutura de seus cromossomos (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Por exemplo, existem diversos tipos de câncer de pele porque a pele é formada por mais de um tipo de célula. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas ele é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma (INCA, 2008).

A grande parte das neoplasias resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais, sendo a contribuição exclusivamente genética responsável por apenas 5% de todos os tumores. A fração restante pode ser atribuída a fatores ambientais “externos” que atuam em conjunto com a suscetibilidade genética (LOURO *et al.*, 2002).

Acredita-se que a dieta é um dos fatores externos mais notáveis, sendo que cerca de 35% dos diversos tipos de câncer ocorrem em razão de dietas inadequadas. É possível identificar, por meio de estudos epidemiológicos, associações relevantes entre

alguns padrões alimentares observados em diferentes regiões do globo e a prevalência de câncer (AVESANI *et al.*, 2004).

A complexidade absoluta da dieta apresenta um desafio difícil quando se contempla um estudo da sua relação com o câncer. Há literalmente milhares de substâncias químicas na dieta, algumas bem conhecidas, outras são de pouco conhecimento e não medidas. As dietas contêm inibidores e intensificadores da carcinogênese. Além disso, quando um componente principal da dieta é alterado, outras alterações ocorrem simultaneamente. Isto dificulta a interpretação dos achados da pesquisa porque os efeitos não podem ser claramente associados a um único fator (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2005).

Os estudos feitos com animais de laboratório são usados para testar o efeito do alimento e da nutrição sobre o câncer. Desde o início deste século, os cientistas têm mostrado que varias manipulações nutricionais influenciam a ocorrência de tumores em animais. De comum acordo com o trabalho epidemiológico, os estudos em animais podem ser usados para fornecer hipóteses para guiar a pesquisa epidemiológica e revelar caminhos modificáveis para o câncer em seres humanos (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2005).

Alguns dados experimentais mostram uma ligação entre alguns cânceres e a quantidade de gordura na dieta. Uma dieta rica em calorias, gordura saturada e proteína animal, e pobre em fibras vegetais, está relacionada ao surgimento de tumores de mama, endométrio, próstata, intestino grosso e vesícula biliar. Carnes artificialmente conservadas, especialmente as salgadas e defumadas, como a carne de sol e o bacon que causam câncer de estômago e esôfago. Em animais, os alimentos conservados com nitritos e nitratos também são carcinogênicos (MURAD, 2008).

Na dieta, podem ser incluídos compostos que impedem ou inibem a ocorrência da carcinogênese, dentre os quais podemos destacar os antioxidantes (HANDELMAN, 2001).

Os antioxidantes são responsáveis pela remoção de espécies derivadas do oxigênio, e são definidos como quaisquer substâncias que, em concentrações relativamente baixas, comparadas aos substratos oxidáveis, retardam, significativamente, ou inibem a oxidação destes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999 *apud* DIAS; NEPOMUCENO, 2008).

O sistema de defesa antioxidante é formado por compostos enzimáticos, que são produzidos no organismo, e não enzimáticos que estão presentes nos alimentos ingeridos (COSTA; NEPOMUCENO, 2006).

A terapia nutricional com antioxidantes, concomitante à administração de drogas antineoplásicas, apresentam vários benefícios ao tratamento de pacientes oncológicos. A oferta de vitaminas antioxidantes associadas às drogas antineoplásicas, resulta em menores efeitos colaterais e permitem que a continuidade do tratamento empregado não seja prejudicada, pois a toxicidade causada pelas drogas antineoplásicas é fator limitante desta terapia. Desta forma, a terapêutica nutricional, baseada na utilização de antioxidantes, pode ampliar os conceitos da terapia oncológica atual e permitir melhores resultados quanto ao controle do câncer (COSTA; NEPOMUCENO, 2006).

1.2. Vitamina K

Vitaminas são substâncias que formam um grupo de quatorze compostos orgânicos essenciais ao ser humano, as quais, introduzidas no organismo, em pequenas quantidades, participam da regulação do metabolismo e facilitam o processo de transferência energética e a síntese dos tecidos orgânicos, ou seja, as vitaminas desempenham importante papel na manutenção da saúde, no crescimento, na defesa contra as infecções, na nutrição, favorecendo a assimilação dos alimentos. A falta delas na ali-

mentação do homem determina estados mórbidos definidos: xerofthalmia, beribéri, anemia, escorbuto, raquitismo (SILVA, 2009).

Podem ser classificadas em hidrossolúveis e lipossolúveis, segundo as características físico-químicas e propriedades fisiológicas. Dentre as vitaminas lipossolúveis encontra-se a vitamina K, que foi descoberta em 1929, casualmente, devido à ocorrência de hemorragias e lenta coagulação sanguínea em pintinhos. O símbolo K deriva da palavra "Koagulation", graças à sua ação hemorrágica. Além dessa função biológica a vitamina K atua como uma coenzima durante a síntese de várias proteínas, envolvidas na coagulação sanguínea e no metabolismo ósseo (PENTEADO, 2003).

A vitamina K é caracterizada por um grupo de vitaminas, filoquinona (K1), menaquinona (K2) e menadiona (K3). O mais conhecido membro da família da vitamina K é a filoquinona, assim chamada por causa de sua relação íntima com a fotossíntese na plantas. A menaquinona (K2), não é produzida pelas plantas, em vez disso, ela é produzida por uma grande variedade de bactérias. A menadiona (K3) é um composto sintético que é duas vezes mais potente, biologicamente, do que as formas naturais de vitaminas K1 e K2 (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2005).

A vitamina K é amplamente distribuída em alimentos de origem animal e vegetal. Uma fonte importante de filoquinona (K1) é representada pelos vegetais verdes, como brócolis, couve, espinafre e os óleos vegetais, principalmente de soja e canola (Figura 1). Os altos valores encontrados nesses vegetais confirmam a conhecida associação da filoquinona com tecidos capazes de realizar fotossíntese. Pode ser encontrada, também, em baixas concentrações, em frutas, raízes, tubérculos, ovos e produtos de origem animal (PENTEADO, 2003).

A distribuição de filoquinona nas plantas não é uniforme, maiores concentrações da vitamina são encontradas nas folhas externas quando comparadas às folhas mais internas. A casca das frutas e dos vegetais parece ter maiores concentrações da vitamina do que a polpa. Fatores como a estação do ano, o clima, local geográfico e a fertilização do solo afetam as concentrações de vitamina K1 nos alimentos (DÔRES *et al.*, 2001).

Embora haja um conhecimento crescente com relação ao teor de filoquinona nos alimentos, existe pouca informação sobre os alimentos fontes de menaquinonas. Sabe-se de longa data que fígados de diversas espécies animais são boas fontes de ampla variedade de menaquinonas (DUELLO; MATSCHINER, 1970 *apud* DÔRES *et al.*, 2001). Por outro lado, em função de o fígado ser um alimento de consumo esporádico pela maioria da população, o impacto dessas concentrações na nutrição humana parece ser pequeno (SHEARER *et al.*, 1996 *apud* DÔRES *et al.*, 2001).

Quantidades limitadas de menaquinonas (K2) também são encontradas em produtos animais, como gema de ovo e manteiga. Produtos fermentados, à base de soja, contêm quantidades substanciais de menaquinonas e podem ser de importância nutricional para as populações consumidoras dessa classe de alimentos (SAKANO *et al.*, 1988 *apud* DÔRES *et al.*, 2001).

Quanto às menaquinonas, sintetizada pelas bactérias, sabe-se que o intestino humano contém grandes quantidades de bactérias produtoras de menaquinonas; contudo, sua importância nutricional não é clara. A extensão e o mecanismo de absorção dessas menaquinonas, no intestino grosso, aparentemente é limitada, embora seja conhecido que o fígado humano apresente quantidades significativas dessa forma da vitamina (SUTTIE, 1995 *apud* DÔRES *et al.*, 2001).

A Menadiona (K3) é um composto sintético a ser convertido em K2 no intestino. As vitaminas K1 e K2 não são tóxicas, mesmo em altas doses. Já a vitamina K3 pode ser tóxica; doses excessivas podem provocar anemia hemolítica e icterícia grave em lactantes (DÔRES *et al.*, 2001).

De acordo com estudos do *The Journal of the American Medical Association* (2008), a recomendação de utilização terapêutica da vitamina K, nos Estados Unidos, é de 75-120 microgramas. Mas muitas pessoas idosas, talvez até 50% têm ingestão inadequada de vitamina K, principalmente porque seu consumo de vegetais folhosos verde-escuro é muito baixo. Além do seu papel na modificação de osteocalcina e outras proteínas da matriz, a vitamina K pode ter outras funções que se relacionam a regulação de cálcio, especialmente reduzindo a excreção urinária de cálcio e melhorando sua absorção intestinal, funções que são bem estabelecidas para vitamina D, mas não para a vitamina K. Portanto uma ingestão ótima desta vitamina lipossolúvel, em especial no fim da vida, pode ser importante para a homeostase do cálcio, saúde óssea e redução de fraturas (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2005).

De acordo com Felipe Júnior (2008), os efeitos da vitamina K no câncer induzem a apoptose e inibem a proliferação celular maligna. A vitamina K3 é a que tem maior atividade antitumoral mostrando inibição de 50% na formação de colônias em 86% dos tumores humanos testados a 1 micrograma/mL. Estes tumores incluem o câncer de mama, de próstata, gliomas, tumores de cabeça, pescoço. *In vivo*, a atividade antitumoral necessita de doses relativamente altas.

Portanto, os estudos sobre os micronutrientes alimentares, tanto em animais quanto em humanos, apontam que a farmacologia e a nutrição juntamente estão convergindo para a produção de um novo campo em que as vitaminas serão usadas para ajudar a prevenir doenças, melhorando a saúde e o bem estar (BORGES, 2003).



Figura 1 - Alimentos que representam algumas das principais fontes de vitamina K: óleos vegetais (à esquerda) e brócolis (à direita).

1.3. Teste para detecção de clones tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila melanogaster* (Figura 2), popularmente conhecida como mosca da fruta, foi um dos primeiros animais a ser intensivamente estudado geneticamente. No laboratório do Dr. T.H. Morgan (USA), logo após a redescoberta dos trabalhos de Mendel, a *Drosophila melanogaster* foi reconhecida como um animal experimental para estudos genéticos. Devido ao seu pequeno tamanho, de fácil manutenção em laboratório, pequeno tempo de geração, grande progênie, baixo número de cromossomos e por possuir cromossomos salivares gigantes, Morgan utilizou a *Drosophila melanogaster* para elucidar os mecanismos da herança Mendeliana e para construir os primeiros mapas de ligação gênica (GRAF; SINGER, 1992).

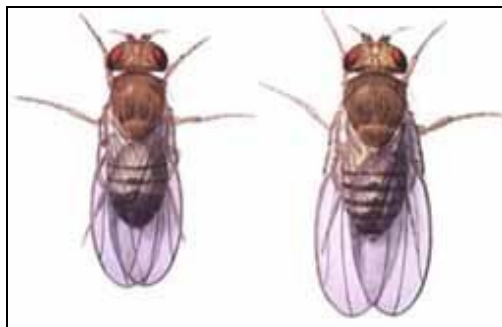


Figura 2 - Casal de *Drosophila melanogaster*: o macho (esquerda) é menor e tem pente sexual e a fêmea (direita) é maior e não apresenta pente sexual.

Testes bem definidos para verificação da mutagenicidade de agentes físicos e químicos foram desenvolvidos em *Drosophila melanogaster*, os quais são capazes de medir um amplo espectro de danos genéticos induzidos em células germinativas, assim como em células somáticas (GRAF; WURGLER, 1984), dentre estes testes o SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*), um importante teste em *Drosophila* para identificar e caracterizar o potencial mutagênico e genotóxico de compostos (EEKEN *et al.*, 2002).

A conservação evolutiva de genes supressores de tumor entre *Drosophila* e mamíferos tem estimulado estudos na indução e no desenvolvimento de tumores em *Drosophila*, estudos estes que podem contribuir diretamente para o entendimento de cânceres em seres humanos. Em adição, numerosos proto-oncogenes e supressores de tumores de mamíferos são conhecidos em *Drosophila* (EEKEN *et al.*, 2002).

A conservação evolutiva de genes supressores de tumor entre *Drosophila* e mamíferos sugere uma importante ferramenta na indução e desenvolvimento de tumores no disco imaginal das células da mosca, bem como entender o desenvolvimento de cânceres em humanos (EEKEN *et al.*, 2002).

Segundo Nishiyama *et al.* (1999), o gene warts (*wts*) foi identificado com base na sua habilidade para ação como um supressor de tumor em *Drosophila*. A deleção desse gene leva à formação de clones de células que são circulares e consideravelmente invasivas, chamadas, literalmente, de verrugas, que desenvolvem por todo o corpo da mosca (Figuras 3 e 4).

O disco imaginal da *Drosophila*, de acordo com Eeken *et al.* (2002), corresponde a um grupo de células na larva que durante a metamorfose desenvolvem nas estruturas da epiderme da mosca adulta. O ciclo de regulação celular do disco imaginal é muito similar às células somáticas de mamíferos.

O controle da regulação do ciclo celular na *Drosophila* é devido a um complexo grupo de proteínas quinase e CDK que são controlados por numerosos genes oncogenes e supressores de tumores. Um dos genes envolvidos no controle da regulação do ciclo celular em *Drosophila* é o gene *wts* (*warts*) que tem homologia a um supressor de tumor LATS1 em mamíferos (EEKEN *et al.*, 2002).

O gene *warts* codifica uma proteína denominada serina/treonina quinase importante na progressão do ciclo celular, especialmente na mitose (NISHIYAMA *et al.*, 1999). O marcador *wts* é uma mutação recessiva letal em homozigose nos zigotos. Devido à letalidade o alelo *wts* é mantido na linhagem estoque com a presença de um balaceador cromossômico (*TM3*) por meio do cruzamento entre linhagens *wts/TM3* e do tipo *multiple wing hairs* (*mwh/mwh*) em que serão obtidas larvas heterozigotas (*wts/+*).

Contudo, o gene *Warts* é considerado importante no controle da morfologia e proliferação celular. A perda da heterozigose nas células do disco imaginal ocasiona a

formação de clones homocigotos (que é viável em conjuntos de células isoladas) da larva, que manifesta como tumores na mosca adulta (SIDOROV *et al.*, 2001).

Há homologia entre os genes que controlam o ciclo da divisão celular em *Drosophila melanogaster* e humanos; por isso, mantê-la em laboratório, por causa do seu rápido ciclo de vida, tem mostrado que esta mosca é um excelente organismo teste para a avaliação do potencial carcinogênico de diversas substâncias.



Figura 3 - Tumor na cabeça

Figura 4 - Tumor na asa

(Fotos: Laboratório de Citogenética e Mutagenese, UNIPAM, Patos de Minas, MG)

O organismo humano está sujeito ao estresse oxidativo causado por radicais livres, provenientes do meio ambiente ou gerados pelo próprio organismo. Atualmente, as vitaminas são as substâncias mais estudadas como agentes antioxidantes, auxiliaadoras na prevenção do câncer. Neste contexto o estudo torna-se relevante à medida que propicia um maior conhecimento sobre a vitamina K e os seus efeitos anticarcinogênicos, visando a uma melhor saúde dos indivíduos. Constitui-se, portanto, de interesse para nossa pesquisa a verificação do potencial anticarcinogênico da vitamina K, contra a ação carcinogênica, induzida pela doxorubicina.

2. Material e métodos

2.1. Agentes químicos

Doxorrubicina (DXR) cloridrato de (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6,-trifeoxi-alfa-1 lixohexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-etóxi-5,12 naftacenediona (CAS 23214-92-8), Eurofarma Laboratório Ltda., São Paulo, SP, Brasil, foi utilizada como agente indutor de tumor. Cada frasco contém 10mg de liofilizado. Tem peso molecular 580,0 e fórmula molecular (Figura 5).

A vitamina K1 (Figura 6), fabricada por F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basileia, Suíça por Cenexi, Fontenay, França Importado e distribuído por Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Para o tratamento foram utilizadas três diferentes concentrações de vitamina K1: 0,25 mg/mL, 0,50 mg/ mL e 1,0 mg/mL.

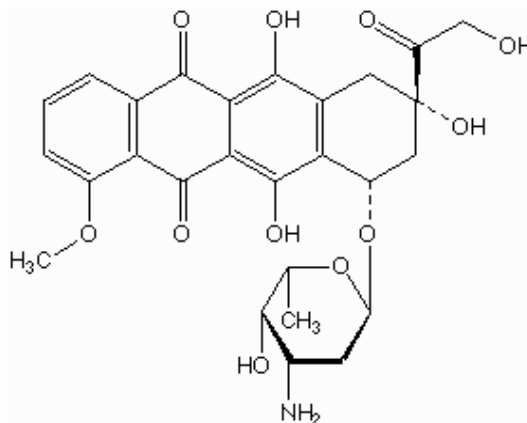


Figura 5 - Fórmula estrutural da doxorubicina

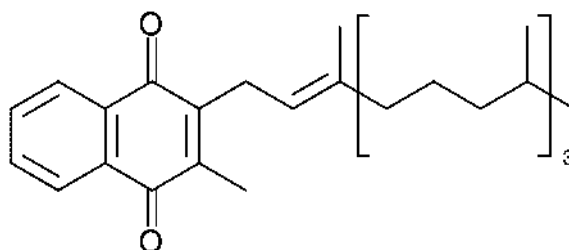


Figura 6 - Fórmula da vitamina K

2.2. Teste para detecção de clones tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*

Para a realização do teste foram utilizadas duas linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster* (*wts* e *mwh*) portadores dos marcadores genéticos *warts* (*wts*, 3-100) *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3).

Os estoques são mantidos em frasco de ¼ de litro contendo meio de cultura de *Drosophila melanogaster* com 820 mL de água; 25g de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*); 11g de ágar; 156g de banana e 1g de nipagin. A temperatura de 25° C e 60% de umidade.

2.2.1. Cruzamento

Para obtenção de larvas heterozigotas *wts* +/+ *mwh* foi realizado o cruzamento entre fêmeas virgens *wts*/TM3, *Sb* com machos *mwh*/*mwh*. Desse cruzamento, todas as larvas foram tratadas com os agentes químicos testados. No entanto, foram analisadas, somente, as moscas que não tiveram o balanceador cromossômico (TM3, *Sb*).

2.3. Procedimento experimental

2.3.1. Tratamento

Após o cruzamento, as moscas foram transferidas para frascos de 25 mL contendo 1,5 g de meio alternativo (purê de batatas) e as diferentes concentrações de vitamina K (2, 5 e 10 mg/mL) associadas ou não com doxorubicina. Para controle positivo

foi utilizada a doxorrubicina (DXR) e para o controle negativo água osmose reversa. Pelo fato de a doxorrubicina ser um compostos fotossensíveis os frascos foram embalados com papel alumínio.

2.4. Análise das moscas

Após sofrer metamorfose, os indivíduos adultos foram transferidos para recipientes contendo etanol 70%, e, posteriormente, analisados machos e fêmeas com genótipo (*wts +/- mwh*) que têm pelos normais, quanto à presença do tumor. As moscas com pelos curtos e grossos (*Stubble*) não foram analisadas pelo fato de não terem o gene *wts*. Para a análise das moscas foram utilizadas lupas estereoscópicas e pincéis nº 1. A localização e o tamanho de cada tumor foram registrados em um diagrama padrão do corpo da mosca.

2.5. Análise estatística

As diferenças estatísticas, entre a frequência de tumor das concentrações testadas e os controles, foram calculadas usando o teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney.

3. Resultados e discussão

Ao avaliar a atividade carcinogênica da vitamina K nas concentrações 0,25 mg/mL, 0,50 mg/mL e 1,0 mg/mL, os resultados demonstram que não houve aumento, estatisticamente significativo, nas frequências de tumores, induzidos pela vitamina K, quando comparados com o controle negativo (Tabela 1).

A frequência é calculada dividindo o valor total de tumores encontrados pelo número de indivíduos analisados.

Tabela 1. Frequência de tumores observados nos descendentes heterozigotos de *Drosophila melanogaster*, tratados com diferentes concentrações de vitamina K.

Concentrações mg/mL	Indiví- duos (moscas)	Tumores encontrados						Total	Frequência
		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halteres		
Controle água	107	0	0	2	0	2	0	4	0,04
DXR (0,125mg/mL)	122	0	4	27	28	8	2	69	0,56 ⁺
Vit K 0,25mg/mL	97	0	0	3	5	1	0	9	0,09
Vit K 0,50mg/mL	89	0	0	2	1	0	0	3	0,03
Vit K 1,0mg/mL	92	0	1	5	2	0	0	8	0,09

⁺ Diagnóstico positivo de acordo com o teste de Mann-Whitney. Níveis de significância: $\alpha = 0,05$, quando comparado com o controle negativo (água).

Vit K, vitamina K; DXR, doxorrubicina.

A Tabela 2 mostra a frequência de tumores observados nos descendentes heterozigotos de *Drosophila melanogaster*, tratados com diferentes concentrações de vitamina K associada com doxorrubicina. Verifica-se, nesta tabela, uma redução, estatisticamente

significativa, nas frequências de tumores induzidos pela doxorrubicina (0,125 mg/mL), quando as diferentes concentrações de vitamina K (0,25, 0,50 e 1,0 mg/mL) foram associadas com este agente carcinogênico.

Tabela 2. Frequência de tumores observados nos descendentes heterozigotos de *Drosophila melanogaster*, tratados com diferentes concentrações de vitamina K associada com doxorrubicina.

Concentrações mg/mL	Indiví- duos (moscas)	Tumores encontrados						Total	Frequên- cia
		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halteres		
Controle água	107	0	0	2	0	2	0	4	0,04
DXR (0,125mg/mL)	122	0	4	27	28	8	2	69	0,56 ⁺
Vit K 0,25mg/mL + DXR	94	0	3	6	3	1	0	13	0,14 [*]
Vit K 0,50mg/mL + DXR	87	0	1	3	8	2	0	14	0,16 [*]
Vit K 1,0mg/mL + DXR	92	0	0	3	2	0	0	5	0,05 [*]

+ Diagnóstico positivo de acordo com o teste de Mann-Whitney. Níveis de significância: $\alpha = 0,05$, quando comparado com o controle negativo (água).

* Diferença estatisticamente significativa de acordo com o teste de Mann-Whitney. Níveis de significância: $\alpha = 0,05$, quando comparada com o controle DXR.

Vit K, vitamina K; DXR, doxorrubicina.

Embora a maioria das pesquisas anticarcinogênicas de vitamina K tenham se centrado em K3 (FELIPPE JÚNIOR, 2008), houve uma série de estudos que demonstraram que a vitamina K1 e K2 são igualmente eficazes contra o câncer. A filoquinona apresenta atividade anticâncer em um número de linhas celulares (fígado, cólon, pulmão, estômago, nasofaringe, seios carcinoma, mucosa oral, e leucemia) (LAMSON; PLAZA, 2003). Estudo realizado por Yoshida e seus colaboradores (2003), concluiu que pacientes com o tratamento do câncer de pulmão com vitamina K2, apresentaram um retardo no crescimento das células cancerosas.

Além disso, vários testes em seres humanos demonstraram os efeitos anticancerígenos da vitamina K1 (MERCOLA; DROEGE, 2009). Como o estudo realizado por Lamzon e Plaza (2003), que verificaram a estabilização do carcinoma hepatocelular em 6 pacientes, em um total de 30 pacientes avaliados, quando submetidos a tratamento oral com vitamina K1. Dos 30 pacientes avaliados, sete tiveram uma resposta parcial e outros sete haviam melhorado a função do fígado e em 15 pacientes a protrombina anormal foi normalizada.

Estudo bibliográfico realizado por Felipe Júnior (2008), com a vitamina K, mostrou que esta vitamina exerce efeito antitumoral inibindo a atividade da Cdk1. A ligação da vitamina K3 à fosfatase Cdc 25 provoca a formação de Cdk1 hiperfosforilada que é inativada, o que, subsequentemente, induz à parada do ciclo celular e a morte por apoptose. A vitamina K3 induz a parada do ciclo celular e a morte da célula por inibir a Cdc 25 fosfatase a qual promove o acúmulo da proteína retinoblastoma (Rb) inativa, hipofosforilada, e a Cdk1 inativa hiperfosforilada. Foi verificado ainda que a vitamina K3 também induz apoptose por fragmentar o DNA (WU; SUN, 1999 *apud* FELIPPE JÚNIOR, 2008).

Similarmente estudo testou a citotoxicidade das vitaminas K1, K2 e K3 em algumas linhagens de tumor humano. Observou-se que a vitamina K3 é a mais potente

como citotóxica na leucemia promielocítica HL-60, no carcinoma de células escamosas e no tumor de glândula salivar. Quanto à citotoxicidade, as vitaminas K1 e K2 são de uma a duas ordens de grandeza inferiores à vitamina K3. Entretanto, a vitamina K2 é capaz de induzir a apoptose em células do glioma humano, nas células da síndrome mielodisplásica e nas células da leucemia promielocítica aguda (OKAYASU, 2001 *apud* FELIPPE JÚNIOR, 2008).

Sun e Yoshij (1999) (*apud* Felipe Júnior, 2008) mostraram o efeito da vitamina K2 sobre três linhagens de gliomas: glioma C6 (rato) e gliomas RBR17T e T986 (humanos). A vitamina K2 inibiu o crescimento tumoral de uma forma dose dependente, por parada do ciclo celular e apoptose. O seu uso, combinado com a 1,25 dihidroxivitamina D3 ou fluoracil, aumentou significativamente o seu efeito inibitório. Um outro estudo demonstrou que a vitamina K2, juntamente com o ácido retinóico, induz completa remissão da leucemia promielocítica aguda (FUGITA *et al.*, 1998).

Atividade anticarcinogênica da vitamina K3 demonstrada em uma série de testes *in vitro* que mostraram um grande efeito quando a vitamina K3 é combinada com agentes quimioterápicos convencionais (LAMSON; PLAZA, 2003).

Estudo sobre câncer no pâncreas, realizado por Carr (2009), avaliou a vitamina K, em combinação com o quimioterápico sorafenib, em linhagens de células pancreáticas. A combinação inibiu o crescimento celular e a morte celular induzida; quando se associa a vitamina K e sorafenib, a dose necessária para a inibição da célula cancerosa diminuiu mais de 50 por cento, sendo necessárias assim doses menores e menos tóxicas.

Células expostas a quimioterápicos morrem quando os sistemas intracelulares de controle do ciclo celular reconhecem a alteração induzida pelo agente antineoplásico e induzem a apoptose da célula tumoral (LOURO *et al.*, 2002).

É importante salientar que a vitamina K não funciona em células estacionárias, isto é, nas células que não estão em regime de proliferação, fato importante por funcionar muito bem em linhagens de tumores resistentes a múltiplas drogas. É importante que a vitamina K, empregada nos estudos, seja hidrossolúvel, pois, a solubilidade em água é um dos fatores que determinam a sua citotoxicidade (FELIPPE JÚNIOR, 2008).

4. Conclusão

O teste para detecção de clones de tumor em *Drosophila melanogaster* permitiu concluir que a vitamina K1, nas condições experimentais, não induziu à ocorrência de tumores e diminuiu as frequências destes, quando induzidos pela DXR.

A vitamina K tem importante papel na prevenção do câncer. Sendo assim, estimular a alimentação saudável com incentivo ao consumo de vegetais verdes como brócolis, couve, espinafre e óleos vegetais deve ser considerada uma medida de prevenção e controle do câncer. Porém são necessários maiores estudos para propor recomendações nutricionais específicas para a prevenção desta patologia.

Referências

AVESANI, C.M.; BARROS, M.E.; CAMARGO, K.G.; GAROFOLO, A.; SIGULÉM, D.M.; SILVA, S.R.J.; TADDEI, J.A.A. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. *Revista de Nutrição*, Campinas, 17(4):491-505, out./dez., 2004.

BAMSHAD, M.J.; CAREY, J.C; JORDE, L.B; WHITE, R.L. *Genética Médica*. 3 ed. São Paulo: Elsevier, 2004.

BORGES, O. O. Efeito dos micronutrientes sobre o metabolismo celular. Parte 1 - Estudos animais. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 84, n. 1, p. 21-23, 2003.

CARR, B. *Vitamin K may boost effects of cancer pill Nexavar*. Disponível em <<http://www.reuters.com/article/healthNews/idUSTRE53L5RR20090422>>. Acesso em: 01 out. 2009.

COSTA, W. F.; NEPOMUCENO, J. C. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and mineral on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 47, n. 1, p. 18-24, 2006.

DIAS, C. D.; NEPOMUCENO, J. C. *Efeito Protetor do Betacaroteno Contra a Ação Genotóxica da Doxorubicina, em Células Somáticas de Drosophila melanogaster*. 2008. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

DÔRES, S. M. C ; PAIVA, S. A. R ; CAMPANA, A. O. Vitamina k: metabolismo e nutrição. *Revista de Nutrição*, v. 14, n. 3, Set./Dez. 2001.

EEKEN, J.C.J.; KLINK, I.; VEEN, B.L.V; FERRO, W. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene wts. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2002; 40: 277-282.

FELIPPE JUNIOR, José de. *Efeitos da vitamina K no câncer: indução de apoptose e inibição da proliferação celular maligna*. Disponível em: <<http://www.nutricaovirtual.com.br/nutricao/principal/conteudo.asp?id=4451>>. Acesso em: 14 jun. 2008.

FUJITA, H.; TOMIYAMA, J.; TANAKA, T. Vitamin K2 combined with all-trans retinoic acid induced complete remission of relapsing acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol*, v. 103, n. 2, p. 584-585, 1998.

GRAF, U.; SINGER, D. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient*, v. 8, p. 15-27, 1992.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W.M.; *Introdução a Genética*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 794p.

GRAF, U.; WÜRGLER F.E. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen*, v. 6, p. 153-188, 1984.

HANDELMAN, G. J. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Nutrition*. v. 17, p. 818-22, 2001.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. *O que é o Câncer?*. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=322>. Acesso em: 14 jun. 2008.

JORDE, L. B.; CAREY, J.C.; WHITE, R.L. *Genética Média*. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 415p.

LANMSON, D. W.; PLAZA, S. M. The anticancer effects of vitamin K. *Alternative Medicine Review*, v. 8, n. 3, p. 303-18, Ago. 2003.

LOURO, I. D; LLERENA Jr., J.C.; MELO, M.S.V.; ASHTON-PROLLA, P.; CNFORTI, N.F. *Genética Molecular do Câncer*. 2 ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

MAHAN, L. Kathleen; ESCOTT-STUMP, Sylvia. *Krause alimentos, nutrição & dietoterapia*. 11 ed. São Paulo: Roca, 2005.

MERCOLA, Joseph; DROEGE, Rachael. Fight Cancer With Vitamin K. *Mercola com take control of your health*, 2009.

MURAD, André Márcio. *Educando para ter saúde*. Núcleo de Apoio ao paciente com câncer. Disponível em: <<http://www.napacan.org.br>>. Acesso em: 01 nov. 2008.

NISHIYAMA, Y.; HIROTA, T.; MORISAKI, T.; HARA, T.; MARUMOTO, T.; IADA, S.; MAKINO, K.; YAMAMOTO, H.; HIRAOKA, T.; KITAMURA, N.; SAYA, H. A human homolog of *Drosophila* warts supressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. *Febs Letters*, 1999; 459: 159-165.

PENTEADO, Marilene de Vuono Camargo. *Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*. Barueri, SP: Manole, 2003.

PONDER, Bruce A. J. Cancer genetics. *Nature*, v. 411, p. 336-341, 2001.

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

SILVA, Elen Roseli Taveira Martinski. *Nutrição vitaminas*. Disponível em: <<http://www.cdof.com.br/index.php>>. Acesso em: 01 out. 2009.

SIDOROV, R. A.; UGNIVENKO, E.G.; KHOVANOVA, E.M.; BELITSKY, G.A.; Induction of tumor clones in *D. Melanogaster wts/+* heterozygotes with chemical carcinogens. *Mutation Research*, v. 498, p. 181-191, 2001.

THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION. *Vitamin K cuts liver cancer risk*. Disponível em: <http://findarticles.com/p/articles/mi_m0FKA/is_10_66/ai_n6198002>. Acesso em: 14 jun. 2008.

THYSSE, ADRIAN. Wilhelm Ludvig Johannsen – Geneticist. *sl*. Disponível em: <http://evolvingwithdarwin.blogspot.com/2009/02/wilhelm-ludvig-johannsen-geneticist.html>. Acesso em: 27 out. 2009.

WEINBERG, R. *How Cancer arises*. *Sci Amer.*, 1996. p. 32-40.

YOSHIDA, T.; MIYAZAWA, K. ; KASUGA, I. ; YOKOYAMA, T. ; USTUMI, K.; AOSHIMA, M.; OHYASHIKI.; Apoptosis induction of vitamin K2 in lung carcinoma cell lines: the possibility of vitamin K2 therapy for lung cancer. *Int J Oncol*. v. 23, n. 3, p. 627-632, set. 2003.