

Avaliação do efeito anticarcinogênico do morango (*Fragaria x ananassa*) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Evaluation of the anticarcinogenic effect of strawberry (*Fragaria x ananassa*) on somatic cells of *Drosophila melanogaster*

Evaluación del efecto anticarcinogénico de la fresa (*Fragaria x ananassa*) en las células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Recebido: 16/09/2023 | Revisado: 02/10/2023 | Aceitado: 03/10/2023 | Publicado: 06/10/2023

Ana Luísa Moreira Reis

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-9896-3587>
Centro Universitário de Patos de Minas, Brasil
E-mail: moreirareis03@yahoo.com

Ana Luísa Braga Campos

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-4615-8449>
Centro Universitário de Patos de Minas, Brasil
E-mail: anabraga1@unipam.edu.br

Rosiane Gomes Silva Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8268-3615>
Centro Universitário de Patos de Minas, Brasil
E-mail: rosianegso@unipam.edu.br

Resumo

Carcinogênese é o processo que leva à formação do câncer, que pode ocorrer de forma espontânea ou provocada pelas ações dos agentes cancerígenos. A quimioprevenção combinada, baseada na dieta, é promissora, pois além de mais acessível à população, tem menor custo e atua reduzindo o risco de câncer. Neste contexto destaca-se o morango (*Fragaria x ananassa*), com alto teor de compostos fotoquímicos, com resalto para os compostos fenólicos e suas ações protetoras. Neste contexto, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar o efeito anticarcinogênico do morango contra os danos induzidos pela doxorubicina, por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais, em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Duas linhagens de *D. melanogaster* foram utilizadas para realizar o ETT: *warts* e *multiple wing hairs*. As larvas obtidas foram submetidas à avaliação carcinogênica, pré-tratamento com morango e pós-tratamento com morango, além de controle negativo usando água de osmose reversa e controle positivo doxorubicina 0,4mM. Os resultados dos indivíduos tratados com morango de 25%, 50% e 100% apresentaram frequências tumorais de 0,1, 0,15 e 0,21, respectivamente, enquanto no pré-tratamento com morango 50% e 100% e expostas DXR 0,4mM apresentaram frequência de tumores por mosca de 0,25 e 0,13 respectivamente e no pós-tratamento houve redução na frequência de tumores, uma vez que quanto maior a concentração, menor a frequência tumoral. Conclui-se que o morango nas presentes condições experimentais apresentou efeito anticarcinogênico, efeito este, que sofreu variação da concentração testada.

Palavras-chave: Efeito anticarcinogênico; Teste de tumores epiteliais; Morango; Quimioprevenção.

Abstract

Carcinogenesis is the process that leads to the formation of cancer, which can occur spontaneously or provoked by the actions of carcinogens. Combined chemoprevention, based on diet, is promising, as well as being more accessible to the population, has lower cost and acts to reduce the risk of cancer. In this context stands out the strawberry (*Fragaria x ananassa*), with high content of photochemical compounds, with rebound for phenolic compounds and their protective actions. In this context, the present research aimed to evaluate the anticarcinogenic effect of strawberry against damage induced by doxorubicin, through the test for detection of clones of epithelial tumors in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Two strains of *D. melanogaster* were used to perform the ETT: *Warts* and *Multiple Wing hairs*. The larvae obtained were submitted to carcinogenic evaluation, pre-treatment with strawberry and post-treatment with strawberry, in addition to negative control using reverse osmosis water and positive control of 0.4mm doxorubicin. The results of individuals treated with strawberry of 25%, 50% and 100% presented tumor frequencies of 0.1, 0.15 and 0.21, respectively, while in the pre-treatment with strawberry 50% and 100% and exposed DXR 0.4mm showed frequency of tumors per fly of 0,25 and 0.13 respectively and in the post-treatment there was a reduction in the frequency of tumors, since the higher the concentration, the lower the tumor frequency. It is concluded that the strawberry in the present experimental conditions presented anticarcinogenic effect, which suffered variation of the concentration tested.

Keywords: Anticarcinogenic effect; Epithelial tumor testing; Strawberry; Chemoprevention.

Resumen

Carcinogénesis es el proceso que conduce a la formación del cáncer, que puede ocurrir de forma espontánea o provocada por las acciones de los agentes cancerígenos. La quimioprevención combinada, basada en la dieta, es prometedora, pues además de más accesible a la población, tiene menor costo y actúa reduciendo el riesgo de cáncer. En este contexto se destaca la fresa (*Fragaria x ananassa*), con alto contenido de compuestos fotoquímicos, con resalto para los compuestos fenólicos y sus acciones protectoras. En este contexto, la presente investigación tuvo por objetivo evaluar el efecto anticarcinogénico de la fresa contra los daños inducidos por la doxorubicina, por medio de la prueba para la detección de clones de tumores epiteliales, en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Dos linajes de *D. melanogaster* fueron utilizados para realizar el ETT: *Warts* y *Multiple Wing hairs*. Las larvas obtenidas fueron sometidas a evaluación carcinogénica, pretratamiento con fresa y post-tratamiento con fresa, además de control negativo usando agua de ósmosis inversa y control positivo doxorubicina 0,4mm. Los resultados de los individuos tratados con fresa de 25%, 50% y 100% presentaron frecuencias tumorales de 0,1, 0,15 y 0,21, respectivamente, mientras que en el pretratamiento con fresa 50% y 100% y expuestas DXR 0,4mm presentaron frecuencia de tumores por mosca de 0,25 y 0,13 respectivamente y en el post-tratamiento hubo reducción en la frecuencia de tumores, una vez que mayor la concentración, menor la frecuencia tumoral. Se concluye que la fresa en las presentes condiciones experimentales presentó efecto anticarcinogénico, efecto este, que sufrió variación de la concentración testada.

Palabras clave: Efecto anticarcinogénico; Prueba de tumores epiteliales; Fresa; Quimioprevención.

1. Introdução

A carcinogênese é o processo que leva à formação do câncer. Ela pode ser espontânea ou provocada pelas ações dos agentes cancerígenos, os quais são capazes de alterar a genética do indivíduo através da replicação incorreta do DNA e, dessa maneira, iniciar uma neoplasia. Além disso, há alterações celulares, como o dano oxidativo, alterações enzimáticas e reordenamento cromossômico, que são suficientes para causar uma instabilidade genômica. Essa precursora de uma mutação também promove o processo neoplásico (Inca, 2002). De acordo com Brasil (2019), sabe-se que esses mesmos mecanismos que levam à proliferação celular irrestrita e progressão tumoral podem atuar também em benefício do organismo, por meio de mecanismo protetores.

Através do perfil epigenético, os agentes quimiopreventivos podem atuar nos processos de iniciação e promoção da carcinogênese. Sabe-se, que esses agentes podem reduzir e atrasar a capacidade das células cancerígenas de desenvolver propriedades metastáticas, promovendo a apoptose e inibindo a angiogênese, mecanismos de invasão e disseminação do câncer (Landis-Piwowar & Iyer, 2014).

A quimioprevenção combinada, baseada na dieta, é promissora, pois além de mais acessível à população, tem menor custo e atua reduzindo o risco de câncer. Portanto, o consumo habitual de compostos alimentares ricos em antioxidantes, incluindo a ingestão de agentes quimiopreventivos presentes em frutas e vegetais, com destaque para os fitoquímicos, estão atraindo um interesse considerável (George et al., 2017).

Neste contexto destaca-se o morango (*Fragaria x ananassa*), pseudofruto referenciado pelo seu alto teor de compostos fotoquímicos, com resalto para os compostos fenólicos e suas ações protetoras. Entre elas a anticarcinogênica e anti-inflamatórias são as principais, decorrem de ações anti-hipertensivas, antimicrobiana, assim como a inibição enzimática, prevenindo patologias relacionadas ao estresse oxidativo, como o câncer (Camargo, 2019).

Portanto, nesse estudo teve por objetivo avaliar o efeito anticarcinogênico do morango (*Fragassa x ananassa*) contra os danos induzidos pela doxorubicina, por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*Epthelial Tumor Test - ETT*), em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

1.1 Quimioprevenção

A Quimioprevenção é definida como o uso sistêmico de agentes químicos naturais ou sintéticos para reverter ou suprimir mecanismos relacionados a carcinogênese (Oliveira et al, 2020). Segundo Liu (2013), o mecanismo mais conhecido é pautado na ação antioxidante, uma vez que os danos oxidativos são componentes fundamentais nesse processo. As espécies reativas de

oxigênio (EROs), são influenciadas por diversos mecanismos fisiológicos ou até mesmo por estímulos ambientais; ocasionando alterações genéticas favoráveis à carcinogênese.

Dessa forma, a ação fitoquímica é eficiente por reduzir o potencial oxidativo no organismo, diretamente ou indiretamente através de enzimas, que sequestram radicais livres. A capacidade dos fitoquímicos de eliminar os radicais livres é ligada à atividade principal, que visa o bloqueio no processo de conversão de fatores pré e pró carcinogênicos, de maneira que impedem a união dos carcinógenos ao DNA, RNA e proteínas funcionais relacionadas, impedindo assim irregularidades no ciclo celular (Pan & Ho, 2008, George et al., 2017).

Outro mecanismo dos fitoquímicos é a ação anti-inflamatória. Eles são capazes de inibir o fator nuclear κ B (NF- κ B), elemento fundamental no processo de transcrição de expressão das citocinas pró inflamatórias, que geram alterações celulares diversas no organismo, propiciando a ocorrência de mutações genéticas, que induzem a proliferação celular, angiogênese, bem como outros eventos. Sendo assim, a ação fitoquímica é baseada no controle celular e um dos principais mecanismos, outro meio de atuação, é pela regulação de genes anti-apoptóticos e controle da expressão de proteínas mitogênicas (Pan & Ho, 2008, Liu, 2013, Gupta et al., 2010).

1.2 Morango

O morango (*Fragaria x ananassa*) apresenta inúmeros benefícios para o organismo humano. É considerado um alimento funcional. Compostos como flavonoides, ácidos fenólicos e vitamina C obtêm atividade anti-inflamatória e anticarcinogênica por meio da remoção de radicais livres. Esses radicais atacam moléculas importantes como enzimas e DNA, sua diminuição acaba reduzindo o estresse oxidativo, o qual pode gerar lesões celulares preditoras de malignidade (Forbes-Hernandez et al., 2015 apud Nunes & Novello, 2020). Além disso, é altamente absorvido ao longo do trato gastrointestinal, o que contribui com o aumento da sua utilização pelo organismo.

Os polifenóis estão presentes em altas quantidades nessa fruta, sendo as antocianinas, os fenóis mais prevalentes. Além de ser responsável pela cor avermelhada do morango, as antocianinas reduzem os níveis sanguíneos de colesterol total, lipoproteínas de baixa densidade (LDL), contribuindo para a redução do risco cardiovascular e melhorando o perfil lipídico (Alvarez-Suarez et al., 2014). Essa substância é usufruída em processos antibacterianos, anti-inflamatórios e anticarcinogênicos, nesse último processo, contribuem significativamente com efeitos apoptóticos em células cancerígenas (López et al., 2017).

Vários estudos epidemiológicos associam a menor incidência de doenças crônicas não-transmissíveis ao maior consumo de frutas na dieta com ações antioxidantes, como o morango (Figura 1). É importante também destacar a presença de ácido elágico nesse fruto, composto com alto potencial biológico, entretanto, com baixa distribuição em outros alimentos, o que o torna responsável pela fonte dessa substância na dieta brasileira (Pinto, 2008).

Figura 1- Morango (*Fragaria x ananassa*).



Fonte: <https://www.britannica.com/plant/Fragaria-ananassa> (Acesso em: 29 de setembro de 2021).

Os flavonoides, grupo de compostos que incluem as antocianinas, foram destacados em estudos *in vitro* como indutores de uma grande variedade de enzimas envolvidas em processos reguladores de divisão celular, agregação plaquetária, atuação na resposta inflamatória e imune. Além disso, sua propriedade antioxidante com ação inibitória mostrou-se eficaz em vários estágios do processo tumoral em estudos experimentais com animais (Hollman & Katan, 1999).

2. Metodologia

Refere-se a um estudo de caráter experimental o qual foi realizado no Laboratório de Citogenética e Mutagênese (LABCIM) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). A evidência do método experimental é pautada no controle de circunstâncias e variáveis que tenham potencial de interferir na relação de causa e consequência, bem como relaciona a busca pela descoberta de relações e proporções entre as hipóteses (Estrela, 2018).

2.1 Preparação do extrato de morango

Os morangos utilizados nesse estudo foram adquiridos no comércio local em Patos de Minas, Minas Gerais, com recursos próprios do pesquisador. No LABCIM os frutos selecionados foram lavados e submetidos a remoção das sépalas e pedicelos, posteriormente os receptáculos (parte comestível) dos frutos foram macerados para obtenção do extrato total (solução mãe). Posteriormente, foi realizada a diluição seriada utilizando água de osmose reversa, assim foram empregados nesse estudo as concentrações de morango 25, 50 e 100%.

2.2 Epithelial Tumor Test (ETT)

Duas linhagens de *Drosophila melanogaster* foram empregadas na condução do teste de tumores epiteliais (*Epithelial Tumor Test* - ETT). Ambas as linhagens possuem marcadores genéticos específicos: uma portadora do gene warts (*wts*, 3-100) e outra com o gene *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-03). Estas linhagens encontram-se disponíveis no laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM. Elas são mantidas em frascos de 250 mL contendo meio de cultura composto por banana, ágar e nipagin, sendo conservadas em uma incubadora com temperatura de 25°C, umidade de 60%, e um ciclo de fotoperíodo de 12 horas.

Para a condução do teste, foi necessário realizar cruzamentos entre fêmeas virgens portadoras do gene *wts/TM3, Sb^l* e machos com a característica *mwh/mwh*. Os ovos resultantes desse cruzamento foram coletados em frascos específicos contendo um meio de cultura adequado para a postura dos ovos, composto por ágar, fermento biológico e açúcar, durante um período de 8 horas.

Após a eclosão dos ovos, as larvas no terceiro estágio de desenvolvimento foram obtidas por meio de uma lavagem dos frascos com água de osmose reversa, passando por uma peneira de malha fina. Estas larvas, coletadas em grupos contendo aproximadamente 200 exemplares cada, foram submetidas a três diferentes esquemas de tratamento: uma avaliação carcinogênica, pré-tratamento com morango e pós-tratamento com morango.

Na avaliação carcinogênica as larvas de terceiro estágio +/-72h foram tratadas com as concentrações isolodadas de morango (25, 50 e 100%), por período de aproximadamente, 48h. No pré-tratamento com morango as larvas foram transferidas para frascos devidamente identificados contendo papel filtro umedecido com as concentrações isoladas de morango (25, 50 e 100%), a exposição ocorreu por um período de 6h. Posteriormente, as larvas foram lavadas e transferidas para frascos devidamente identificados, contendo 1,5g de purê de batata Yoki, meio alternativo para *Drosophila* (Spanó et al., 2001), umedecidos com doxorrubicina 0,4 mM. Também foram incluídos frascos com controle negativo (água de osmose reversa) e com controle positivo (DXR 0,4 mM). No pós tratamento as larvas foram transferidas para frascos contendo papel filtro umedecido com DXR a 0,4 mM. A exposição ocorreu por um período de 6h, em seguida as larvas foram lavadas e transferidas

para frascos contendo as diferentes concentrações de morango (25, 50 e 100%). Também foram incluídos frascos com controle negativo (água de osmose reversa) e com controle positivo (DXR 0,4 mM).

Para conduzir o teste de toxicidade, uma série de frascos foi designada com a sigla "TX," que incluía o nome da concentração e o esquema de tratamento correspondentes. Cada um desses frascos foi utilizado para acomodar e contar 50 larvas selecionadas para o teste. Após o período de metamorfose, as moscas resultantes foram coletadas e preservadas em frascos contendo álcool a 70%. A etapa inicial da análise envolveu a contagem das moscas que eclodiram dos frascos "TX" a fim de determinar a taxa de sobrevivência e, conseqüentemente, a viabilidade de cada concentração testada.

Em seguida, foi iniciada a fase de análise detalhada sob uma lupa estereoscópica. Nessa etapa, procedeu-se à contagem de tumores de acordo com os critérios estabelecidos por Justice (1995). Os resultados obtidos foram registrados em uma planilha padronizada, na qual foi documentada a quantidade de tumores observados em diferentes áreas do corpo das moscas, abrangendo olhos, cabeça, corpo, asas, pernas e halteres.

Para determinar a frequência de tumores por mosca, calculou-se a proporção, dividindo o número total de tumores pelo número de indivíduos analisados em cada concentração. As eventuais diferenças estatísticas entre a frequência de tumores nas concentrações testadas e nos grupos de controle (positivo e negativo) serão avaliadas utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney, com um nível de significância estabelecido em $p < 0,05$.

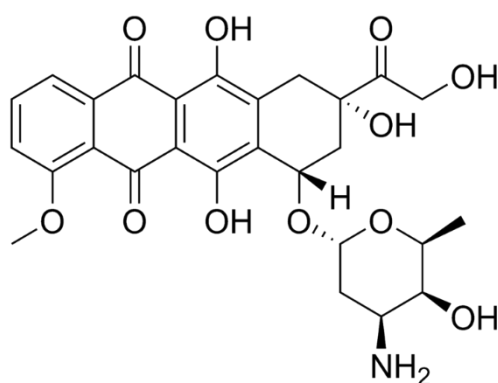
3. Resultados e Discussão

A doxorubicina (DXR) é um antibiótico utilizado em tratamento oncológico em animais e seres humanos devido ao seu efeito genotóxico e carcinogênico. Esse fármaco pertence à classe das antraciclinas, isolado a partir da cultura do fungo *Streptomyces peucetius* var *caesius* (Oliveira, 2018).

A DXR pode reagir com macromoléculas teciduais normais e malignas. Ela é capaz de se unir ao DNA das células e impedir a síntese de DNA e de RNA, estabilizando a célula e suspendendo seu metabolismo e replicação, causando efeitos antiproliferativos em tecidos tumorais ou em tecidos dentro da normalidade (Santos; Oliveira, 2018).

Os mecanismos de ação dessa substância incluem além da interação com o DNA, a inibição da síntese de proteínas e das enzimas topoisomerase e o desenvolvimento de radicais livres (Candido, 2013 apud Silva et al., 2018). Este último mecanismo é possível graças a estrutura desse fármaco (Figura 2), o anel tetracíclico ligado a daunosamina combinado com compostos citotóxicos que possuem constituintes quinona e hidroquinona. Essas características permitem a doação e aceção de elétrons, e nessa transferência, produz-se os radicais livres de oxigênio (Craig; Stitzel, 2014).

Figura 2 - Estrutura química da Doxorubicina.



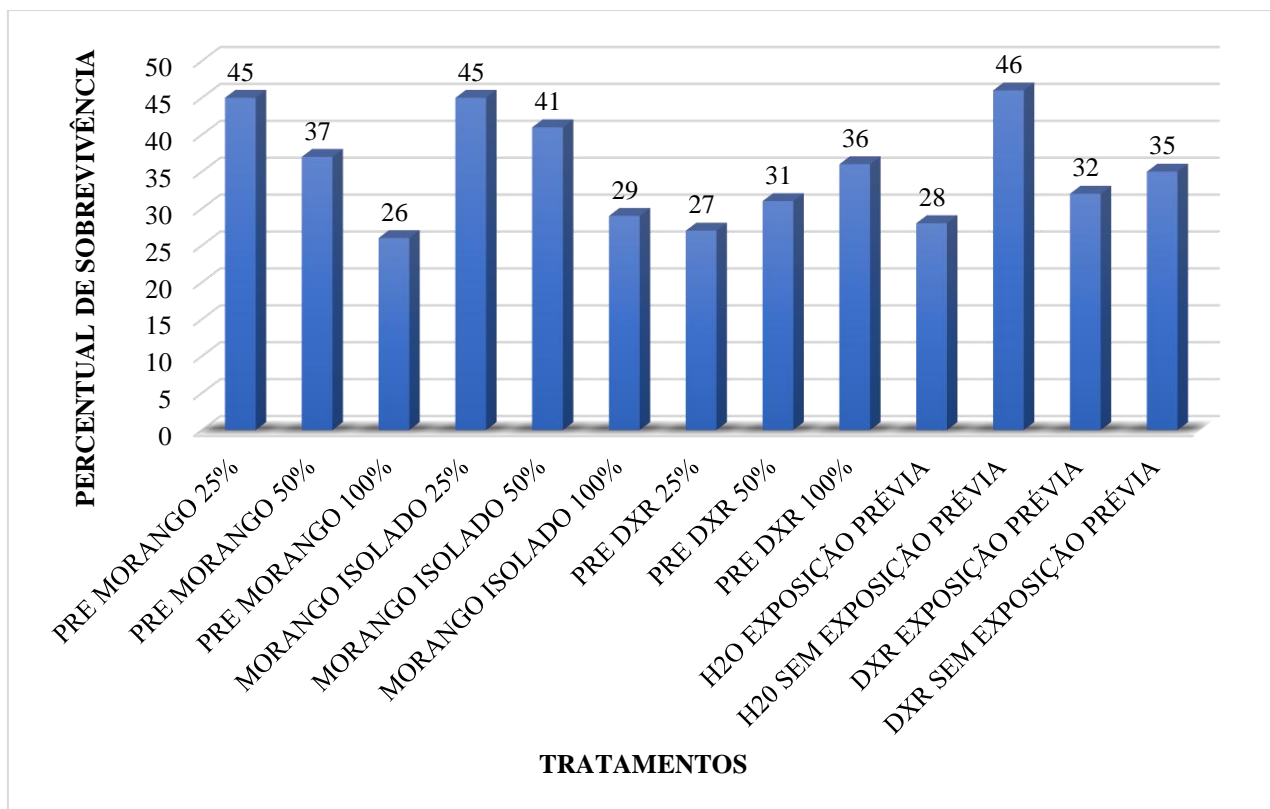
Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Doxorubicin_chemical_structure.png. (Acesso em: 29 de setembro de 2021).

O teste para detecção de clones de tumores epiteliais (ETT) em *Drosophila melanogaster* é uma forma fácil, rápida e sensível de avaliação da atividade carcinogênica de compostos ou misturas mais complexas. A *Drosophila* possui um gene supressor de tumor chamado *warts* (*wts*), que codifica uma quinase semelhante à humana; cuja função é o controle do tamanho e da proliferação das células. Já foi observado que a inativação de ambos os alelos desse gene resulta na morte embrionária, entretanto, nos heterozigotos que sofrem recombinação mitótica, conduzem um supercrescimento no epitélio das cutículas humanas. Isso sugere, que a proteína *wts* pode ser um regulador negativo no controle do ciclo celular (Justice et al., 1995; Eeken et al., 2002). A perda da heterozigose no gene *wts* de *Drosophila*, causada por recombinação mitótica em células somáticas, leva à formação de clones celulares fragmentados, arredondados e muito superlotados em relação às células normais (Justice et al., 1995). As variações encontradas no gene *wts* nos discos imaginais correspondem aos tumores.

Visando avaliar a viabilidade dos extratos utilizados no experimento, bem como selecionar as concentrações disponíveis e sua aplicabilidade, foi realizado o cálculo da taxa de sobrevivência relacionando o número de larvas sobreviventes, que eclodiram durante o processo, e o número de larvas colocadas em cada frasco com o tratamento, inicialmente.

Conforme demonstrado no Gráfico 1, na avaliação carcinogênica a sobrevivência foi de 45%, 41% e 29% nas concentrações de 25, 50 e 100%, respectivamente, de morango isolado. Ao avaliar a sobrevivência do pré-tratamento com morango, a sobrevivência, nas concentrações de 25, 50 e 100% foi de, respectivamente, 45%, 37% e 26%. Com relação a sobrevivência do pós-tratamento é possível notar o valor de 27%, 31% e 26%, nas mesmas concentrações de 25, 50 e 100%. Por meio dos dados adquiridos no experimento inicial de controle, a viabilidade das concentrações utilizadas foi descrita, bem como a toxicidade dos tratamentos estabelecida.

Gráfico 1 - Porcentagem de sobrevivência dos controles.



Fonte: Autores (2023).

Por meio da análise individual das moscas de pelo longo de cada concentração, foi possível verificar as frequências de tumores observadas nos diferentes segmentos da *Drosophila melanogaster* tratadas com extrato de *Fragassa x ananassa*, além do controle positivo e negativo (Tabela 1). A análise de tumores observada nos indivíduos tratados no controle negativo mostra uma frequência de 0,19 tumor/mosca, fato que pode ocorrer devido à predisposição genética intrínseca à *Drosophila melanogaster*, em ocorrência aleatória (Alves & Nepomuceno, 2012).

Tabela 1 - Frequência de clones de tumor observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, tratada com diferentes **concentrações isoladas** de morango (*Fragaria x ananassa*).

Tratamentos		Número de moscas analisadas	Número de tumores analisados							Total	Frequência (Nº de tumores/mosca)
Morango (%)	DXR (mM)		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter			
0,0	0,0	100	0	0	0	19	0	0	19	0,19	
0,0	0,4	100	0	0	1	27	0	0	28	0,28 *	
25	0,0	100	0	0	0	9	1	0	10	0,1*	
50	0,0	100	0	1	0	11	3	0	15	0,15*	
100	0,0	100	0	0	2	19	0	0	21	0,21*	

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância $p \leq 0,05$. * Valor considerado diferente do controle negativo ($p < 0,05$). ** Valor considerado diferente do controle positivo (DXR 0,4 mM) ($p < 0,05$). DXR, doxorubicina. Fonte: Autores (2023).

Em indivíduos tratados com o controle positivo, é possível notar uma frequência de 0,28 tumores por mosca. O uso de DXR como controle positivo é feito pela sua interação à molécula de DNA, que age interferindo no ciclo celular e na produção de radicais tóxicos e, provavelmente, esses mesmos mecanismos estão relacionados com a transformação de uma célula normal para uma célula maligna (Alves; Nepomuceno, 2012). Estatisticamente, foi estabelecida pelo Teste de Mann-Whitney significativa diferença entre as frequências de tumores em moscas tratadas com o controle positivo e controle negativo, conforme demonstra a Tabela 1.

A Tabela 1 também apresenta os resultados dos indivíduos tratados com morango de 25%, 50% e 100%, cujas frequências tumorais foi de 0,1, 0,15 e 0,21, respectivamente. Alguns autores colocam que compostos fitoquímicos, presentes no morango, desempenham um papel na inibição do ciclo celular implicado no avanço do câncer, regulam o processo tumorigênico, prevenindo a metástase e promovendo a inibição da morte celular (Islam et al., 2017). No presente estudo, ao comparar a frequência tumores do morango com o controle negativo, é possível notar que apenas a maior concentração (morango 100%) apresentou aumento na frequência de tumores de forma significativa, as demais concentrações os resultados foram inferiores ao controle negativo. Assim, esses resultados podem sugerir efeito carcinogênico de *Fragaria x ananassa* em *Drosophila melanogaster* na maior concentração.

Apesar do efeito antioxidante do morango ser o principal ponto destacado na literatura, é evidenciado que o ácido ascórbico, um dos principais componentes antioxidantes presente no morango, atua na fase aquosa como excelente redutor de radicais livres, mas não é capaz de agir sozinho nos compartimentos lipofílicos para inibir a peroxidação dos lipídeos. Já na presença de metais de transição, pode atuar como uma molécula pró-oxidante e gerar os radicais H_2O_2 e OH^\cdot (Dauchet et al., 2006). Em adição, estudos *in vitro* realizado por Moreira e Mancini-Filho (2004) também evidenciaram que estes compostos fenólicos podem também promover reação oxidativa, agindo como pró-oxidantes, ao atuarem sobre metais, reduzindo-os e aumentando a formação de radicais livres e peróxidos.

Tabela 2 - Frequência de clones de tumor observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, expostas previamente a diferentes concentrações isoladas de morango (*Fragaria x ananassa*) e, posteriormente, expostas a doxorubicina.

Tratamentos		Número de moscas analisadas	Número de tumores analisados							Total	Frequência (Nº de tumores/mosca)
Morango (%)	DXR (mM)		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter			
0	0	67	0	0	0	5	0	0	5	0,07	
0	0,4	52	1	4	0	37	0	0	42	0,81*	
25	0,4	100	2	4	0	48	2	3	59	0,59	
50	0,4	100	1	1	1	20	0	2	25	0,25**	
100	0,4	100	0	0	1	12	0	0	13	0,13**	

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância $p \leq 0,05$. * Valor considerado diferente do controle negativo ($p < 0,05$). ** Valor considerado diferente do controle positivo (DXR 0,4 mM) ($p < 0,05$). DXR, doxorubicina. Fonte: Autores (2023).

A Tabela 2 mostra a diferença na frequência de tumores de indivíduos que foram previamente expostas ao morango e posteriormente com a DXR. Os resultados indicam que o morango possui potencial protetor, visto que a redução na frequência de tumores foi significativa nas concentrações de morango 50% e morango 100%, apresentando uma frequência de 0,25 e 0,13 respectivamente. Esses resultados confirmam a característica anticancerígena do morango, considerado capaz de proteger o material genético e reduzir a ação carcinogênica da DXR (Souza et al, 2014).

Tabela 3 - Frequência de clones de tumor observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, tratada previamente com doxorubicina e, posteriormente, expostas à diferentes concentrações isoladas de morango (*Fragaria x ananassa*).

Tratamentos		Número de moscas analisadas	Número de tumores analisados							Total	Frequência (Nº de tumores/mosca)
DXR (mM)	Morango (%)		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter			
0	0	67	0	0	0	5	0	0	5	0,07	
0,4	0	52	1	4	0	37	0	0	42	0,81*	
0,4	25	58	0	1	0	21	1	1	24	0,41	
0,4	50	41	1	1	0	12	0	1	15	0,37	
0,4	100	64	0	0	0	16	0	0	16	0,25**	

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância $p \leq 0,05$. * Valor considerado diferente do controle negativo ($p < 0,05$). ** Valor considerado diferente do controle positivo (DXR 0,4 mM) ($p < 0,05$). DXR, doxorubicina. Fonte: Autores (2023).

A Tabela 3 apresenta os resultados da análise da frequência de tumores em moscas previamente tratadas com a substância cancerígena, DXR, e posteriormente, com o extrato de morango, afim de avaliar as características terapêuticas anticarcinogênicas dessa fruta. É possível observar que houve redução na frequência de tumores de forma dependente da concentração, uma vez que quanto maior a concentração, menor a frequência de tumor, indicando que possivelmente as propriedades do morango são capazes de reverter os danos induzidos previamente pela DXR. Entretanto, o resultado foi significativo apenas na concentração morango 100% (Gasparrini et al., 2017).

Considerando que um dos mecanismos de ação da DXR é geração de radicais livres o que contribui para o estresse oxidativo e conseqüentemente provoca danos no material genético e a morte das células. Uma das propriedades do morango é seu efeito antioxidante que inibe tanto a angiogênese de células cancerígenas quanto o TNF-alfa. Essas células, quando em contato com os polifenóis presentes no morango, são mais sensíveis e susceptíveis a apoptose e processo de transcrição do DNA, controlando, assim, a progressão do câncer. Esse pode ter sido o meio pelo qual houve redução da frequência de tumores observada na Tabela 3 (Nunes; Novello, 2020).

Além disso, esses efeitos anticancerígenos dos morangos ligados às suas propriedades antioxidantes, auxiliam na remoção de espécies reativas de oxigênio e carcinógenos. A produção excessiva de espécies reativas no organismo está associada à progressão e complicações de vários tipos de câncer (Gasparrini et al., 2017). Em contraponto, embora existam amplas evidências que apoiem os efeitos benéficos do morango como antioxidante e possível genoprotetor, Nimpsch et al. (2016) não descobriram nenhuma associação significativa entre a ingestão de flavonoides e o risco de câncer de cólon, bem como em relação ao risco de câncer de ovário, ambos apresentando-se estatisticamente irrelevantes no estudo demonstrado ($p > 0,05$).

Nesse sentido, os estudos de Souza et al. (2014) conferiram resultados positivos com relação à atividade antioxidante do morango, quando comparada a outras pequenas frutas, como o mirtilo. Nesse caso descrito, foi relatada ação intermediária de tal atividade, compreendida entre 40% e 70%. Da mesma forma, Islam et al. (2017) colocam que compostos chamados fitoquímicos, presentes em frutas como morangos, desempenham um papel na inibição do ciclo celular implicado no avanço do câncer. Como resultado, regulam o processo tumorigênico, prevenindo a metástase e promovendo a inibição da morte celular. Nos estudos avaliados pelo presente trabalho, uma hipótese para os resultados obtidos é o efeito apoptótico da *Fragaria x ananassa* sobre as células, na maior concentração, embasada pela alta concentração de compostos fenólicos.

Ademais, em outro estudo conduzido por Giampieri et al. (2014), os efeitos antioxidantes e antienvhecimento de um extrato de morango rico em polifenóis foram avaliados usando fibroblastos dérmicos humanos submetidos ao estresse induzido por H₂O₂. O extrato de morango exibiu alta atividade antioxidante e continha concentrações significativas de vitaminas e compostos fenólicos. Fibroblastos tratados com extrato de morango e expostos ao estresse induzido por H₂O₂ demonstraram aumento da viabilidade celular, níveis reduzidos de espécies reativas de oxigênio intracelular e diminuição da peroxidação lipídica da membrana e danos ao DNA. Além disso, o extrato melhorou a funcionalidade mitocondrial ao aumentar a respiração basal e promover a regeneração celular após a exposição a estímulos pró-oxidantes.

Outra propriedade observada no morango foi a capacidade dos flavonoides de inibir a ação metastática dos tumores e induzir a apoptose em diferentes tipos de células cancerígenas. Essas substâncias impedem o ciclo celular reduzindo a produção de algumas proteínas e supressão de genes responsáveis pela expansão tumoral. Esse efeito foi comprovado em cânceres de colo de útero, próstata, bexiga e fibrosarcoma e, também, vai ao encontro dos resultados obtidos na Tabela 2 (Forbes-Hernandez et al, 2015).

Dentro dos flavonoides, o kaempferol, também presente no morango, foi associado a atividades antiproliferativas e apoptóticas no câncer de ovário e osteosarcoma. Os estudos de Luo et al, 2012, sugerem que esse flavonoide é responsável pela produção de substâncias intrínsecas capazes de regular proteínas e inibir angiogênese tumoral. Além disso, induz apoptose através da mitocôndria potencializando as expressões do citocromo C, proteína essencial para a atividade celular (Luo et al 2012 apud Forbes-Hernandez et al, 2015).

4. Conclusão

A doxorrubicina é conhecida por seu efeito genotóxico e carcinogênico. Já o morango é bastante estudado por seus benefícios, principalmente pelo efeito anti-inflamatório e anticarcinogênico. O presente estudo reforça essas propriedades

demonstrando em seus resultados possível ação antioxidante e apoptótica extrato dessa fruta, contribuindo para a pesquisa do efeito protetor relacionado ao morango.

Os resultados foram mais evidentes nas situações de pré exposição da *Drosophila melanogaster* ao morango, e, posteriormente, à DXR, agente cancerígeno. Os testes foram bastante favoráveis nas concentrações maiores do substrato de morango, 50% e 100%, sugerindo possível efeito anticarcinogênico dessa fruta.

Quanto a exposição prévia ao agente cancerígeno e posteriormente ao morango, os resultados foram significativos apenas para a concentração de 100% do extrato, sugerindo possível efeito anticarcinogênico devido a redução na frequência de tumores induzidos previamente pela DXR.

Portanto, é adequado que, em perspectivas futuras, sejam avaliados os possíveis efeitos carcinogênicos, anticarcinogênicos e apoptóticos do morango, a fim de evidenciar hipóteses embasadas pela literatura do presente trabalho.

Referências

- Alvarez-Suarez, J. M. et al. (2014). One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(3) 289–294.
- Alves E. M., & Nepomuceno J. C. (2012). 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*, 9(2) 125-140.
- Brasil (2019). Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer*. (5a ed.), Inca.
- Camargo, T. M. (2019). *Morango (Fragaria x ananassa), amora-preta (Rubus spp.) e mirtilo (Vaccinium ashei Reade): caracterização química, atividade antioxidante e ação sobre as enzimas digestivas alfa-glicosidase e alfa-amilase em dois ciclos produtivos das frutíferas*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Pelotas. 92.
- Craig, C. R., & Stitzel, R. E. (2014). *Farmacologia Moderna com Aplicações Clínicas*. (6a ed.), Guanabara Koogan.
- Dauchet, L. et al. (2006). Fruit and vegetable consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis of cohort studies. *J Nutr* 136(1) 2588-2593.
- Eeken, J. C. J et al. (2002). Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene wts. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 40(4): 277-282.
- Estrela, C. (2018). Metodologia Científica: Ciência, Ensino, Pesquisa. *Editora Artes Médicas*.
- Forbes-Hernandez, T. Y, et al. (2015). The Healthy Effects of Strawberry Polyphenols: Which Strategy behind Antioxidant Capacity? *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*. Texas A & M International University.
- Gasparrini, M. et al. (2017). Anti-inflammatory effect of strawberry extract against LPS-induced stress in RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 102(1) 1–10.
- George, V. C., Dellaire, G., & Rupasinghe, H. P. V. (2017). Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 45 1–14.
- Giampieri, F. et al. (2015). Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food & Function*, 6(5) 1386–1398.
- Gupta, S. C. et al. (2010). Inhibiting NF-κB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1799(10) 775–787.
- Hazas, M. C. L. L. et al. (2017). Exploring the Colonic Metabolism of Grape and Strawberry Anthocyanins and Their in Vitro Apoptotic Effects in HT-29 Colon Cancer Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(31) 6477–6487.
- Hollman, P. C. H., & Katan, M. B. (1999). Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.*, Oxford, 37(1) 937 – 942.
- Inca (2002). Fisiopatologia do câncer. *Ações de enfermagem no controle do câncer*. (2a ed.), INCA, 55-81.
- Inca (2019). Instituto Nacional Do Câncer. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. INCA, 2019. *Braz. J. Hea. Rev.*, 3(6) 15660-15676.
- Inca (2021). Exposição no trabalho e no ambiente. *Instituto Nacional de Câncer*. <https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente>
- Islam, M. S. et al. (2017). An anthocyanin rich strawberry extract induces apoptosis and ROS while decreases glycolysis and fibrosis in human uterine leiomyoma cells. *Oncotarget*, 8(14) 23575–23587.
- Justice, R. W. et al. (1995). The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog o-f human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes & Development*, 9(1) 534-546.
- Landis-Piwowar, K. R., & Iyer, N. R. (2014). Cancer Chemoprevention: Current State of the Art. *Cancer Growth and Metastasis*, 7(1) 19-25.
- Liu, R. H. (2013). Health Promoting Components of Fruits and Vegetables in the Diet. *Advances in Nutrition*, 4(3) 384S-392S.

- López, I., et al. (2017). p53-mediated suppression of BiP triggers BIK-induced apoptosis during prolonged endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 24 1717–1729.
- Nepomuceno, J. L. (2015). Using the *Drosophila melanogaster* to Assessment Carcinogenic Agents through the Test for Detection of Epithelial Tumor Clones (Warts). *Adv Tech Biol Med*, 3(3).
- Nimptsch, K. et al. (2016). Habitual intake of flavonoid subclasses and risk of colorectal cancer in 2 large prospective cohorts¹². *The American Journal of Clinical Nutrition*, 103(1) 184–191.
- Nunes, G, Novello, D. (2020). Ação antioxidante e propriedades funcionais do morango no organismo humano. *Revista Valore*, 5(1) 5004.
- Oliveira, R. da S. et al. (2020). Ação quimiopreventiva dos fitoquímicos por meio da regulação do fator de transcrição Nrf2: revisão integrativa da literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 66(1).
- Pan, M. H., Ho, C. T. (2008). Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. *Chemical Society Reviews*, 37(11) 2558–2574.
- Pinto, M. S. (2008). *Compostos bioativos de cultivares brasileiras de morango (Fragaria x ananassa Duch): caracterização e estudo da biodisponibilidade dos derivados de ácido elágico*. Tese para obtenção de doutorado. 116.
- Santos, M. G. S., & Oliveira, R. G. S. (2018). Efeito modulador do óleo de ricino, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (warts) em *Drosophila melanogaster*. *Revista Perquirere*, 15(1) 252-268.
- Silva, M. R. et al. (2018). Avaliação do efeito anticarcinogênico da própolis verde (Artepin C) por meio do teste warts em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. *Revista Perquirere*, 15(1) 285-296.
- Souza, V. R. et al. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156(1) 362-368.
- Spanó, M. A. et al. (2001). Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Molecular Mutagenesis*, 16(5) 385-394.
- Sung H. et al. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *A Cancer Journal for Clinicians*.