
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Marcos Correa Dias

“Influências da *Ginkgo biloba* sobre o desenvolvimento e o crescimento de neoplasias de mama em fêmeas Sprague-Dawley.”

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Patologia para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan

BOTUCATU-SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Dias, Marcos Correa.

Influências da Ginkgo biloba sobre o desenvolvimento e o crescimento de neoplasias de mama em fêmeas Sprague-Dawley / Marcos Correa Dias. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Luis Fernando Barbisan

Capes: 20300000

1. Carcinogênese. 2. Mamas - Câncer - Quimioterapia - Estudos experimentais.
3. Matéria médica vegetal - Uso terapêutico. 4. Ginkgoácea. 5. Rato.

Palavras-chave: Carcinogênese química; *Ginkgo biloba*; Quimioprevenção; Rato; Tamoxifeno.

"O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário." (Albert Einstein)

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: o saber e o crer que se sabe. A ciência consiste no saber, em crer que se sabe está a ignorância.” (Hipócrates)

Dedico com muita honra essa tese de doutorado...

“...para os meus queridos pais **Geraldo Vitor de Carvalho Dias** e **Maria das Dores Correa Dias** cujos ensinamentos são os alicerces que utilizo para superar os desafios e obstáculos da vida. Devo tudo a eles pois me deram a **VIDA** e o amor que construiu meu único bem precioso e eterno: a minha **FAMÍLIA**.”

“...para minhas lindas irmãs biólogas **Paula Correa Dias** e **Angélica Correa Dias** cujo apoio e companheirismo em todas as ocasiões sempre foram muito importantes para a minha existência.”

“...para meu grande amigo e orientador Prof. **Dr. Luís Fernando Barbisan** por seus valiosos ensinamentos científicos durante toda a minha trajetória acadêmica e sensacional exemplo de vida a ser seguido.”

“...para todos os animais de laboratório que participaram desse trabalho e de outros trabalhos científicos proporcionando o aprimoramento dos conhecimentos científicos médicos e crescimento moral da sociedade humana.”

O autor honradamente agradece as seguintes pessoas e instituições que tornaram possível a realização desse trabalho:

Os ilustres membros da banca de qualificação Prof. **Dr. Robson Francisco de Carvalho** (Departamento de Morfologia - Histologia/UNESP) e Prof. **Dr. Thomas Prattes Ong** (Departamento de Ciências Farmacêuticas/USP).

Os ilustres membros suplentes da banca de qualificação Prof.^a **Dra. Flávia Karina Delella** (Departamento de Morfologia - Biologia Celular/UNESP) e Prof. **Dr. Luis Antonio Justulin Jr.** (Departamento de Ciências Biológicas - Histologia/UFMT).

Os ilustres membros da banca de defesa Prof. **Dr. José Maurício Sforcin** (Departamento de Microbiologia e Imunologia/UNESP), Prof.^a **Dra. Luciana Azevedo** (Faculdade de Nutrição/UNIFAL), Prof. **Dr. Luis Antonio Justulin Jr.** (Departamento de Ciências Biológicas - Histologia/UFTM) e Prof.^a **Dra. Maria Aparecida Marchesan Rodrigues** (Departamento de Patologia/UNESP).

Os ilustres membros suplentes da banca de defesa Prof.^a **Dra. Maria Lúcia Dagli Zaidan** (Departamento de Patologia - VPT/USP), Prof. **Dr. Thomas Prattes Ong** (Departamento de Ciências Farmacêuticas/USP) e Prof. **Dr. Robson Francisco de Carvalho** (Departamento de Morfologia - Histologia/UNESP).

O Programa de Pós-graduação em Patologia pela Faculdade de Medicina de Botucatu e todos os seus funcionários, em especial **Natanael e Regina**.

Os funcionários e corpo docente do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP.

Os funcionários e corpo docente do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, em especial **Dra. Kunie** e **Dra. Tuca**.

Os funcionários do TOXICAM do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, em especial **Paulão**.

Os funcionários do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, em especial **PC “Lambari”**.

Todos os meus grandes amigos graduandos e pós-graduandos do Departamento de Morfologia/UNESP, em especial **Kelly, Tio Ale, Gazetão, Tia Flá, Jacu, Bobs, Nelci, Gibinha, Sponja, Carolzinha, Eva, Toni, Marcão, Lucas, Relaxo, Andrei, Larissa, Pei-dei, Andreo, Ivan e Moçoila**.

Os meus grandes amigos e companheiros de Botucatu-SP e Andradina-SP, em especial **Magrela fidida, Julie, Rafael “Shrek”, Marcelzin, Aleção e família Sartoreli**.

Os meus numerosos tios, primos e avós de Itajubá-MG, São José do Alegre-MG, São José dos Campos-SP e Guarulhos-SP.

O apoio financeiro do “**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**” (processo nº47452/2008-0) pela bolsa de doutorado e “**Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**” (**processo nº**) pelo auxílio pesquisa.

ÍNDICE GERAL

1. RESUMO.....	01
2. ABSTRACT.....	03
3. INTRODUÇÃO.....	05
3.1. Câncer de mama.....	05
3.2. Fatores de risco para a carcinogênese mamária, receptores de estrógenos e tamoxifeno.....	07
3.3. Efeitos biológicos da Ginkgo biloba.....	16
3.3.1. Aspectos gerais e potencial quimiopreventivo.....	16
3.3.2. Interação da Ginkgo biloba com tamoxifeno.....	20
3.4. Modelo experimental de carcinogênese mamária.....	21
3.5. Considerações finais.....	24
3.6. Referências.....	24
4. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	34
5. OBJETIVOS GERAIS.....	34
6. ARTIGO 1: “Efeitos da Ginkgo biloba sobre a carcinogênese mamária induzida pela DMBA em ratas Sprague-Dawley”	35
Resumo.....	36
Introdução.....	37
Material e Métodos.....	40
Animais e ambiente de experimentação.....	40
Preparo da ração adicionada com Ginkgo biloba.....	40
Delineamento Experimental e Processamento de Amostras Tumorais.....	41
Western Blot.....	42
Análise Estatística.....	43
Resultados.....	44
Achados gerais.....	44

<i>Desenvolvimento de Tumores Mamários e Análise Histopatológica.....</i>	<i>45</i>
<i>Análise de expressão das proteínas bax, bcl-2 e RE-α.....</i>	<i>49</i>
Discussão.....	53
Agradecimentos.....	57
Referências.....	57
 6. ARTIGO 2: “Efeitos da Ginkgo biloba sobre as propriedades antitumorais do Tamoxifeno na carcinogênese mamária induzida quimicamente em ratas Sprague Dawley”.....	 64
Resumo.....	65
Introdução.....	66
Material e Métodos.....	68
<i>Animais e ambiente de experimentação.....</i>	<i>68</i>
<i>Tratamentos experimentais com DMBA, extrato de Ginkgo biloba e Tamoxifeno.....</i>	<i>69</i>
<i>Delineamento Experimental e Processamento de Amostras Tumorais.....</i>	<i>69</i>
<i>Imunoistoquímica dos tumores mamários.....</i>	<i>70</i>
<i>Medidas de volume e área dos tumores mamários.....</i>	<i>71</i>
<i>Índices de proliferação celular e apoptose e análises de ER-α, P63 e β-catenina.....</i>	<i>72</i>
<i>Análise Estatística.....</i>	<i>72</i>
Resultados.....	72
<i>Achados gerais.....</i>	<i>72</i>
<i>Dosagens bioquímicas de ALT e estradiol.....</i>	<i>73</i>
<i>Medidas de volume e área dos tumores mamários.....</i>	<i>74</i>
<i>Índices de proliferação celular e apoptose e análises de RE-α, p63 e β-catenina.....</i>	<i>78</i>
Discussão.....	83
Agradecimentos.....	88
Referências.....	88

7. CONCLUSÕES.....	94
8. ANEXOS.....	95
ANEXO 1: Gráfico da evolução do peso corpóreo médio (Artigo 1).....	95
ANEXO 2: Tabela de consumo de ração e água, peso corpóreo, pesos relativos dos ovários e úteros (Artigo 1).....	96
ANEXO 3: Gráfico de evolução do peso corpóreo médio (Artigo 2).....	97
ANEXO 4: Tabela de peso corpóreo inicial, peso corpóreo final e ganho de peso corpóreo (Artigo 2).....	98
ANEXO 5: Tabela de pesos hepáticos final e relativo, pesos ovarianos esquerdo e direito (Artigo 2).....	99
ANEXO 6: Figura de cortes histológicos corados em HE de um tumor mamário antes e após o tratamento experimental com EGb (Artigo 2).....	100
ANEXO 7: Figura de cortes histológicos corados em HE de um tumor mamário antes e após o tratamento experimental com tamoxifeno (Artigo 2)...	101
ANEXO 8: Figura de corte histológico de um tumor mamário corado pela técnica de imunoistoquímica para PCNA (Artigo 2).....	102
ANEXO 9: Certificado de aprovação do estudo pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa) do IBB- UNESP.....	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Tipos de câncer com maior incidência na população brasileira feminina e masculina para o ano de 2008.....	5
Figura 2 - Estimativas de número de casos novos por câncer para o ano de 2008/2009, em homens e mulheres, segundo localização primária da neoplasia.....	6
Figura 3 - Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna de mama por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2008 segundo a Unidade da Federação.....	6
Figura 4 - Mecanismo geral de ativação dos receptores de estrógeno.....	9
Figura 5 - Ilustração esquemática dos mecanismos de sinalização dos receptores de estrógeno (ERs).....	11
Figura 6 - Mecanismos de ação do estradiol (E2) e dos SERMs tamoxifeno (TAM) ou 4-hidroxitamoxifeno (OHT).....	14
Figura 7 - Vias celulares para a biotransformação do tamoxifeno dependente das enzimas do complexo citocromo oxidase (CYPs).....	15
Figura 8 - Representação da estrutura química do hidrocarboneto policíclico aromático 7,12-dimetilbenz(o)antraceno (DMBA).....	18

ARTIGO 1

Figura 1 - Gráfico de sobrevivência dos animais nos diferentes grupos experimentais ao longo das 18 semanas do estudo.....	44
Figura 2 - Gráfico que representa o número cumulativo e a semana de detecção de tumores mamários palpáveis nos diferentes grupos experimentais ao longo das 18 semanas do estudo.....	45
Figura 3 - Gráfico que representa o volume médio dos tumores mamários nos diferentes grupos experimentais ao final da 18ª semana do estudo.....	47
Figura 4 - Padrão histológico dos tumores mamários induzidos pela DMBA.....	49
Figura 4 - Variação na expressão protéica de Bax, bcl-2 e receptor de estrógeno (ER).52	

ARTIGO 2

Figura 1 – Gráfico que representa o volume em cm ³ dos tumores mamários no início e final dos 28 dias de tratamento.....	75
---	----

Figura 2 - Análise morfométrica que representa a porcentagem média de área viva, área em regressão e área em necrose nos tumores mamários distribuídos pelos grupos experimentais ao final dos 28 dias de tratamento.....	76
Figura 3 - Cortes histológicos de tumores mamários corados pela técnica de HE.....	77
Figura 4 - Gráfico que representa a porcentagem de células em proliferação (PCNA ⁺) e em apoptose (caspase-3-clivada ⁺) na área viva dos tumores mamários antes (biópsia) e após (tumores) os tratamentos experimentais.....	80
Figura 5 - Exemplos da marcação imunoistoquímica dos biomarcadores utilizados nesse trabalho nas áreas vivas dos tumores mamários induzidos pela DMBA em fêmeas SD.....	81

ÍNDICE DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Dados de incidência, latência, multiplicidade e tipos histológicos das neoplasias mamárias induzidas pela DMBA nos diferentes grupos experimentais.....	46
Tabela 2 - Análise dos parâmetros histológicos (dos tumores mamários induzidos pela DMBA nos diferentes grupos experimentais.....	50

ARTIGO 2

Tabela 1 – Dosagens bioquímicas de alanina-aminotransferase (ALT) e estradiol nos diferentes grupos experimentais.....	74
Tabela 2 – Porcentagem de redução no volume (R) e análise morfométrica dos tumores mamários distribuídos pelos grupos experimentais ao longo de 28 dias de tratamento.....	78
Tabela 3 - Porcentagem de células marcadas na área viva dos tumores mamários nos diferentes grupos experimentais ao final dos 28 dias de tratamento experimental.....	79

1.RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar as propriedades quimioprotetoras e terapêuticas do extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) sobre o desenvolvimento de lesões mamárias neoplásicas induzidas pela dimetil(a)benzoantraceno (DMBA) em ratas da linhagem Sprague-Dawley. No **artigo 1** (Quimioprevenção), os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, sendo dois grupos controles (Positivo e Negativo) e dois grupos teste. Aos 51 dias de idade, as fêmeas receberam por gavagem (i..g) dose única de 60mg/kg de DMBA ou de óleo de Canola (veículo da DMBA) e receberam ou não a substância teste (EGb) misturada à ração basal nas concentrações de 0,1 e 0,2%. Ao final da 18ª semana, todos os animais foram eutanasiados na câmara de CO₂ e foram coletados ovários, úteros e tumores mamários, fixados em formalina tamponada 10% e processados histologicamente para as análises histopatológicas. Também foram coletadas e congeladas (nitrogênio líquido) amostras dos tumores mamários para a análise dos níveis protéicos de bax, bcl-2 e do receptor de estrógeno-alfa (RE- α). O tratamento com EGb nas duas concentrações não modificou a latência, incidência, multiplicidade e tipos histológicos das neoplasias mamárias e não foi capaz de impedir o crescimento e malignidade dessas neoplasias. Além disso, o EGb não alterou os níveis das proteínas apoptóticas bax, bcl-2 e do RE- α nas neoplasias mamárias induzidas pela DMBA.

No **artigo 2** (Terapêutica), todos os animais foram iniciados pela DMBA (80mg/kg; i.g.). A partir do momento que apresentaram tumores mamários palpáveis, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais recebendo ou não o tratamento com Tamoxifeno (TAM) (10mg/kg; i.g.) e/ou EGb (50-100mg/kg; i.p.) durante 28 dias consecutivos. No início do tratamento os animais foram anestesiados com Pentobarbital sódico (30mg/kg, i.p.) para a realização de uma biópsia tumoral (positividade de RE e índice de proliferação celular). A eficácia terapêutica dos diferentes tratamentos foi avaliada pelas análises de redução no volume tumoral (cm³), análise morfométrica de áreas viva/degenerativa/necrótica (μ m²) e análise imunoistoquímica de proliferação celular (PCNA), apoptose (caspase-3 clivada), receptor de estrógeno-alfa (RE), p63 e β -catenina. O tratamento com TAM significativamente reduziu o volume (77,9%) e induziu a regressão histológica dos tumores mamários. Por outro lado, nos animais tratados apenas com EGb o volume do tumor mamário aumentou durante o período experimental (178.7%) e o índice de

proliferação celular na área viva dos tumores foi maior quando comparado aos grupos tratados com TAM ($G4 > G1 = G2 = G3$, $p < 0,001$). A expressão imunoistoquímica de caspase-3 clivada, RE, p63 e β -catenina em áreas vivas tumorais não diferiram entre os tratamentos experimentais ($G1 = G2 = G3 = G4$, $p > 0,05$).

Os resultados de ambos os artigos sugerem que o EGb não apresenta efeitos quimioprotetores, terapêuticos *per si* e/ou não altera os efeitos terapêuticos do TAM sobre a carcinogênese mamária induzida pela DMBA em ratas Sprague-Dawley. Outros trabalhos devem ser realizados para comprovar a segurança da utilização concomitante de EGb por pacientes em tratamento com TAM.

Palavras-chave: carcinogênese química, planta medicinal, dimetil(a)benzantraceno, roedor, quimioterapia, ginkgo.

2. ABSTRACT

The present study was designed to investigate the chemopreventive and therapeutic properties of *Ginkgo biloba* extract (EGb) on 7,12-dimethylbenz(o)anthracene (DMBA)-induced mammary tumors in female Sprague-Dawley rats (SD). In the manuscript 1 (Chemoprevention), the experimental design comprised of four experimental groups, including two control groups (positive e negative) and two test-groups. The 51 days-old female SD rats received a single dose of DMBA (60 mg/kg, i.g.) or a single administration of Canola oil (DMBA vehicle) and were fed with basal diet or EGb supplemented diet at 0,1 or 0,2 %. At 18th week, all animals were euthanized in CO₂ atmosphere, the ovaries, uterus and mammary tumors were fixed in 10% phosphate-buffered formalin and processed in order to provide 5-μm thick paraffin sections for histological analysis. Also, tumor samples were frozen in liquid nitrogen for the analysis of bax, bcl-2 and estrogen receptor alpha (ER-α) protein expression by Western blot. The EGb intake did not alter the latency, incidence, multiplicity and histological pattern, neither the growth and malignancy of the mammary tumors. Besides, the treatment with EGb did not modify the bax, bcl-2 and estrogen receptor alpha (ER-α) expression in the mammary neoplasm induced by DMBA.

In the manuscript 2 (Therapy), the experimental design comprised of four experimental groups. Female SD rats bearing palpable mammary neoplasms induced by DMBA (80 mg/kg b.wt., i.g.) received (G1) TAM (10 mg/kg b.wt., i.g.); (G2 and G3) TAM + EGb (50 or 100 mg/Kg b.wt., i.p.) or (G4) EGb (100 mg/kg b.wt., i.p.) during 28 days. The therapeutic effectiveness of different treatments were evaluated by measuring tumor volume regression (cm³), live/degenerative/necrotic area analysis (μm²) in tumor sections stained by HE and immunohistochemical analysis of cell proliferation (PCNA), apoptosis (caspase-3), estrogen receptor (ER), p63 and beta-

catenin. The treatment with TAM (G1) significantly reduced the breast tumor volume (77.9% ratio) and induced markedly tumor regression (degenerative areas). In contrast, in the EGb-treated animals (G4) the mammary tumor volume increased during the experimental period (178.7% ratio). Cell proliferation index in tumor live area was higher in this latter group when compared to TAM-treated groups ($G4 > G1 = G2 = G3$, $p < 0.001$). Caspase-3, ER, p63 and beta-catenin immunohistochemical scores in tumor live area were not different among treatments ($G1 = G2 = G3 = G4$, $p > 0.05$). The present findings suggest that concomitant EGb treatment did not alter the therapeutic effects of TAM in female rat mammary tumors. In addition, EGb treatment alone was unable to block the mammary tumor growth and malignancy parameters.

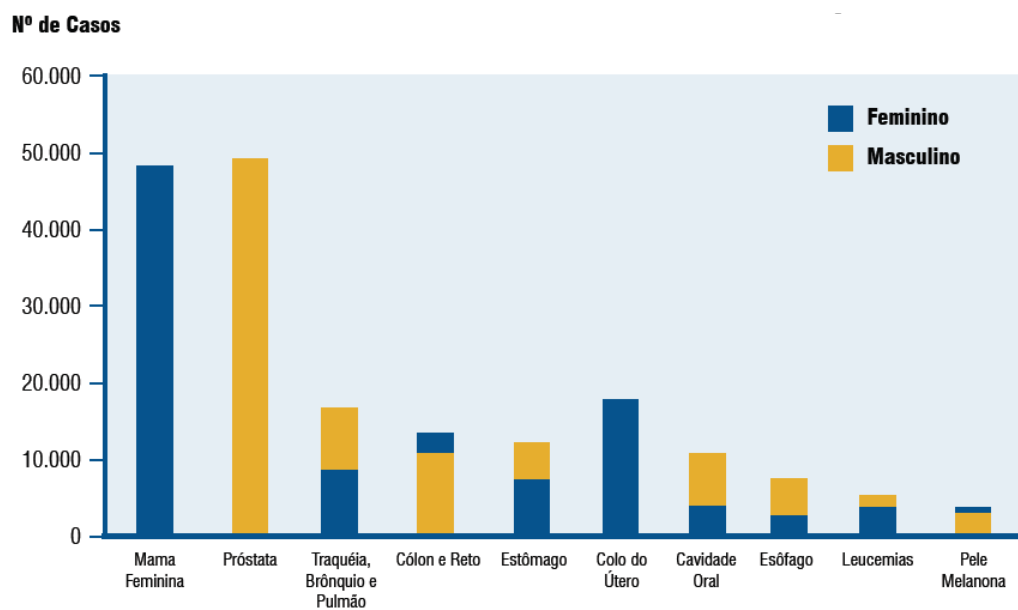
Key words: chemical carcinogenesis, herbal drug, dimethyl benz(a)anthracene, chemotherapy, rodent, ginkgo.

3. INTRODUÇÃO

3.1. Câncer de mama

Pesquisas recentes indicam crescimento nas taxas de morbidade e mortalidade relacionadas às neoplasias em nível mundial (Cuzik, 2010; Parkin et al., 2005). No Brasil, as estimativas de incidência de câncer para 2008 e 2009 são de 466.730 novos casos. Os tipos de câncer mais prevalentes no sexo masculino são os de próstata e pulmão. No sexo feminino, o câncer de mama e de colo do útero são os tipos mais prevalentes (Figura 1). O perfil de morbidade do câncer nos gêneros masculino e feminino na população brasileira é semelhante ao observado na população mundial (www.inca.gov.br). O número de novos casos de câncer de mama femininos esperados para o Brasil em 2008/2009 é de 49.400 (Figura 2), ou seja, um risco estimado de 51 novos casos/100 mil mulheres. A estimativa é ainda pior para a região Sudeste, na qual o risco estimado é de 68 novos casos/100 mil mulheres (Figura 3).

Figura 1 – Tipos de câncer com maior incidência na população brasileira feminina e masculina para o ano de 2008.



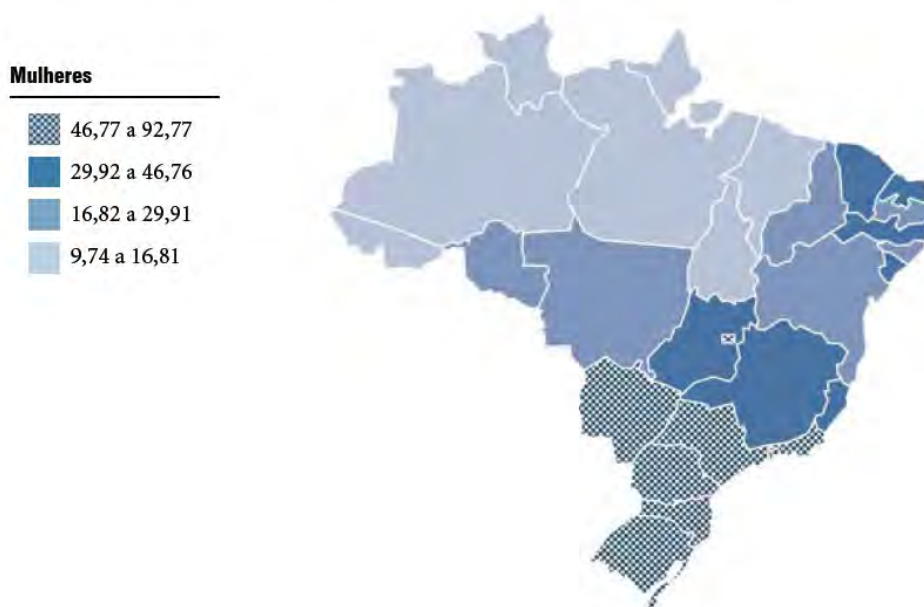
Fonte: MS/Instituto Nacional de Câncer - INCA

Figura 2 – Estimativas de número de casos novos por câncer para o ano de 2008/2009, em homens e mulheres, segundo localização primária da neoplasia.*

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa de casos novos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	49.530	-	49.530
Mama Feminina	-	49.400	49.400
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.810	9.460	27.270
Cólon e Reto	12.490	14.500	26.990
Estômago	14.080	7.720	21.800
Colo do Útero	-	18.680	18.680
Cavidade Oral	10.380	3.780	14.160
Esôfago	7.900	2.650	10.550
Leucemias	5.220	4.320	9.540
Pele Melanoma	2.950	2.970	5.920
Outras Localizações	55.610	62.270	117.880
Subtotal	175.970	175.750	351.720
Pele não Melanoma	55.890	59.120	115.010
Todas as Neoplasias	231.860	234.870	466.730

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Figura 3 – Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna de mama por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2008 segundo a Unidade da Federação.



Fonte: MS/Instituto Nacional de Câncer - INCA

Mundialmente, as taxas elevadas de morte relacionadas ao câncer podem ser atribuídas ao diagnóstico tardio e dificuldades no tratamento dessa doença genética crônico-degenerativa (Parkin et al., 2005). Em geral, a manifestação dos sintomas é observada apenas na fase terminal da doença, o que implica no diagnóstico tardio. Nesse estágio do desenvolvimento tumoral, as células transformadas possuem uma série de alterações gênicas que as tornam altamente invasivas e resistentes a medicamentos antitumorais. Essas características combinadas com outros mecanismos intrínsecos das células neoplásicas como o escape da vigilância imunológica (perda da expressão de moléculas de MHC, baixa expressão de antígenos tumorais, produção de citocinas inibitórias, etc) dificultam o sucesso dos tratamentos convencionais (Dierssen et al., 2006; Parkin et al., 2005). Além disso, a radioterapia, quimioterapia/braquiterapia e remoção ou ressecção cirúrgica são procedimentos de tratamento do câncer extremamente invasivos que resultam em efeitos colaterais amplamente adversos a qualidade de vida do paciente sem, no entanto, serem eficazes em 100% dos casos (Dierssen et al., 2006; Parkin et al., 2005). Todos esses fatores ressaltam a importância da prevenção do câncer, justificando os financiamentos de estudos nessa área.

3.2. Fatores de risco para a carcinogênese mamária, receptores de estrógenos e tamoxifeno.

As neoplasias mamárias apresentam história natural diversa, histopatologia complexa e resposta variada às terapias anti-neoplásicas convencionais como quimioterapia, braquiterapia e radioterapia (Parkin et al., 2005). Atualmente, a frequência de novos casos de câncer de mama tem aumentado exponencialmente nas mulheres em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Jemal et al., 2002). Esse fato pode estar relacionado ao aumento da exposição contínua das mulheres a múltiplos fatores de risco como idade, estilo de vida (tabagismo), hábitos alimentares, história familiar e reprodutiva (menarca precoce, nuliparidade, anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal), e exposição accidental ou ocupacional a contaminantes ambientais como cancerígenos químicos, corantes, conservantes, poluentes, praguicidas, drogas, radiação ultravioleta, radiações ionizantes (Snedeker, 2001; Wolf e Weston, 1997). A incidência de câncer de mama aumenta rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, aumenta de forma mais lenta. Essa mudança pode ser atribuída ao início da menopausa em média aos 50 anos de idade (Cuzak, 2010).

Existem dois tipos de neoplasias de mama: receptor de estrógeno (RE) positivo e negativo (Weigel e Dowsett, 2010; Matthews e Gustafsson, 2003). Pacientes com tumores mamários RE-positivos têm pior prognóstico e por isso o tratamento das neoplasias mamárias deve ser específico para cada paciente, levando em consideração as características individuais de cada tumor como independência ou não ao estímulo estrogênico. Com essas informações em mente, o médico deve optar ou não pela mastectomia radical ou parcial e prescrever o tratamento adjuvante com um medicamento da família dos bloqueadores seletivos de receptores de estrógenos (SERMs). Os SERMs como tamoxifeno e raloxifeno têm eficácia restrita aos tumores mamários RE-positivos (Silverman, 2010).

Os estrogênios e estrógenos endógenos como estrona (E_1), estradiol (E_2) e estriol (E_3) são hormônios esteróides sintetizados nos ovários que exercem efeitos pleiotrópicos sobre a fisiologia de vários tecidos e sistemas de todo o organismo. No aparelho reprodutivo, esses hormônios modulam o crescimento, diferenciação e funcionamento de diversos tecidos, tornando uma mulher capaz de se reproduzir. Os estrógenos ainda exercem importantes efeitos fisiológicos em tecidos não-reprodutivos como fígado, ossos, sistemas cardiovascular e nervoso, ou patológicos no desenvolvimento de osteoporose, neoplasias malignas de mama, endométrio e ovário (Segars et al., 1993). Em tecidos normais (não-neoplásicos) a resposta biológica aos estrógenos é finamente controlada por mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica intracelulares (Lo e Sukumar, 2008; Segars et al., 1993). Isso significa que as células não-neoplásicas não se dividem sempre que são expostas aos estrógenos. Por outro lado, até mesmo baixa exposição aos estrógenos estimula uma proliferação celular vigorosa e ilimitada nos tecidos tumorais (Morimoto et al., 2010).

Nos mamíferos, a maioria dos feitos biológicos dos estrógenos é mediada por sua interação com dois subtipos de receptores de estrógenos (RE- α e RE- β) e seus respectivos co-fatores (Lo e Sukumar, 2008; Björnström e Sjöberg, 2005). Ambos os subtipos de RE são encontrados no núcleo (maioria), citoplasma e membrana de células amplamente distribuídas por quase todos os tecidos do organismo (Matthews e Gustafsson, 2003). Enquanto o RE- α predomina no útero e glândula mamária, o RE- β é encontrado principalmente no sistema nervoso central, cardiovascular, imunológico, trato urogenital, ossos, rins e pulmão (Matthews e Gustafsson, 2003). Os REs orquestram a resposta intracelular transcricional e não-transcricional aos estrógenos (Björnström e Sjöberg, 2005). A interação entre 17 β -estradiol (E_2) e o receptor de

estrógeno (E_2 -RE) libera o complexo inibidor de RE, formado por HSPs (Heat Shock Proteins), e induz a modificações conformacionais que permitem a complexação do RE com os elementos promotores de transcrição gênica (Figura 4). A atividade transcricional induzida pelos REs é afetada por inúmeros co-fatores regulatórios que incluem complexos remodeladores de cromatina, co-ativadores e co-repressores de REs. Os co-ativadores geralmente não se ligam ao DNA, mas são recrutados pelos promotores durante a interação com E_2 -RE. Os co-ativadores, como os membros da família p160/SRC (*Steroid Receptor Coactivator*), SRC1/NcoA1 (*Nuclear Receptor Coactivator-1*) e NcoA2, participam da transcrição gênica induzida pelo E_2 -RE (Xu et al., 2009). Os co-repressores, como o NCoR (*Nuclear Receptor Co-Repressor*) e a proteína MTA1 (*Metastasis Associated-1*) participam do silenciamento gênico. O balanço entre receptores, co-ativadores e co-repressores é determinante para iniciar a resposta ao estrógeno.

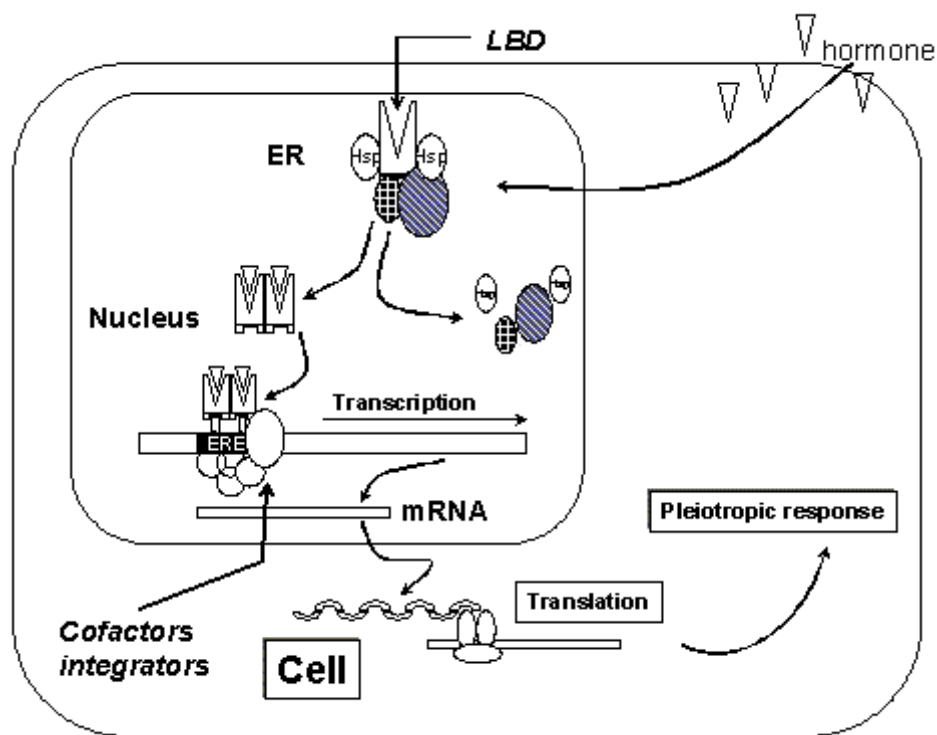


Figura 4 – Mecanismo geral de ativação dos receptores de estrógeno. A resposta pleiotrópica poderia ser a produção endógena de proteínas (hormônio luteinizante em células da hipófise; inibina B em células de Sertoli), proliferação celular, produção das enzimas semelhante a β -galactosidase ou luciferase. ER= Receptor de Estrógeno. HSP= Complexo de Proteínas Inibidoras. LBD= Domínio de Acoplamento do Ligante. ERE= Elemento Responsivo ao Estrógeno.

Fonte: <http://www.andrology.be/life98/technical.php>

Existem outras vias de resposta ao complexo estrógeno-receptor (E_2 -RE), além da via clássica de interação direta do E_2 -RE com o ERE (Dunn et al., 2010; Nilsson et al., 2001). Na Figura 5, foram descritos os quatro principais mecanismos de ação dos REs. Esses variam desde ativação ou repressão da transcrição gênica, integração de vias intracelulares de sinalização e controle da progressão do ciclo celular. Por depender apenas da interação do estrógeno com receptores de membrana celular e não depender dos mecanismos celulares de transcrição e tradução, a via não-genômica é a mais rápida das vias de resposta ao estrógeno (Gianciti et al., 2006). As cascatas de sinalização recrutam segundos mensageiros intracelulares, incluindo NO (óxido nítrico), proteínas quinases (PKA, PKC, PI3K), RTKs (receptores de tirosina quinases), GPCRs (Receptores acoplados à proteína-G), MAPK (Proteína quinase ativadora de mitose), serina-treonina quinase AKT (Simoncini et al., 2003).

Os receptores RE- α e RE- β são fatores de transcrição protéicos regulados pelo componente ligante (Nott et al, 2008; Nilsson et al., 2001). Ambos são produtos da expressão de genes diferentes, apresentam distribuição tecidual específica e funções biológicas diferentes, como pode ser comprovado pela expressão protéica específica induzida por esses genes e fenótipos completamente distintos em camundongos *knockouts* α ERKO and β ERKO (Hewitt et al., 2009). Em alguns tecidos, no entanto, ambos os receptores RE- α e RE- β são co-expressos e formam heterodímeros funcionais. Quando co-expressos, o RE- β exibe um efeito inibitório sobre a expressão gênica dependente de RE- α e, em muitas ocasiões, exerce ações antagônicas ao RE- α (Matthews e Gustafsson, 2003). Embora sejam duas moléculas protéicas diferentes, provenientes de genes diferentes e com funções biológicas diferentes, os receptores ER- α e ER- β apresentam alto grau de parentesco na sequência genética codificadora do sítio de ligação ao DNA (DBDs) e têm a mesma afinidade molecular pelos estrógenos endógenos como o 17β -estradiol (E_2) (Ikeda e Inoue, 2004). A descrição dos mecanismos moleculares de regulação da expressão dos receptores RE- α e RE- β e como ambos afetam direta ou indiretamente as funções um do outro, é essencial para a compreensão dos eventos biológicos celulares de regulação genética dependente dos estrógenos em tecidos normais e doentes (Matthews e Gustafsson, 2003; Nilsson et al., 2001).

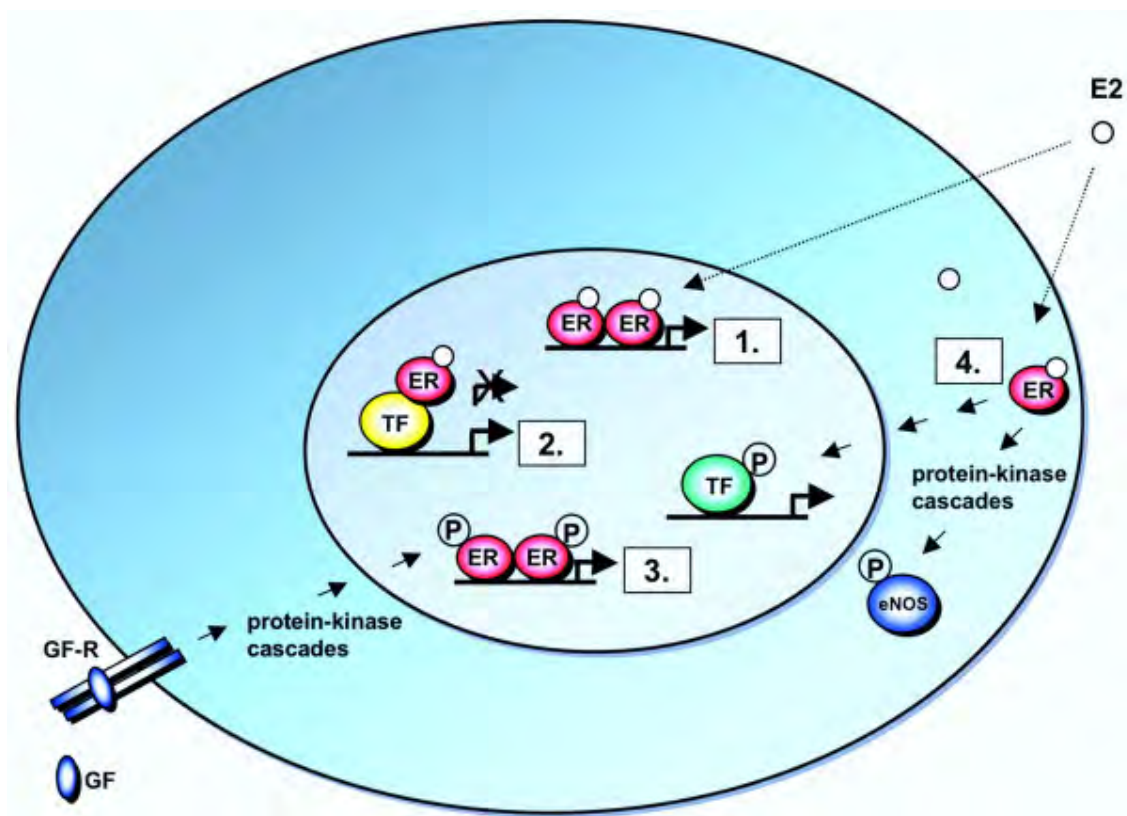


Figura 5 – Ilustração esquemática dos mecanismos de sinalização do receptores de estrógeno (ERs). **1. Mecanismo de ação clássico:** o estrógeno ligado ao receptor (E_2 -RE) ativa diretamente os EREs (*Estrogen Responsive Elements*) localizados em regiões promotoras específicas no interior do núcleo celular. **2. Mecanismo de ação indireto:** o E_2 -RE se complexa a um fator de transcrição (TF), como o NF-kappa β , que contata os EREs em promotores específicos. **3. Mecanismo de ação independente do ligante:** Fatores de crescimento (GF) ativam cascatas intracelulares de proteínas quinases que fosforilam (P) e ativam ERs sem a necessidade do ligante. **4. Mecanismos de ação não-genômicos:** o estrógeno se liga a receptores localizados na membrana celular iniciando uma cascata de resposta intracelular via ativação de proteínas quinases que resulta em funções alteradas de proteínas citoplasmáticas (p.ex. ativação de eNOS, regulação da expressão gênica pela fosforilação e ativação de um fator de transcrição).

Fonte: Bjornstrom and Sjoberg, 2005.

O RE- α é um importante regulador do desenvolvimento fisiológico da glândula mamária. A estimulação estrogênica desse receptor resulta na transcrição de vários genes, inclusive genes reguladores do ciclo celular (Feng et al., 2007; Nilsson et al., 2001). As células que contêm esse receptor bem expresso (15-30% das células do tecido mamário normal) produzem fatores de crescimento que induzem a proliferação de células vizinhas RE negativas. No tecido tumoral a porcentagem de células RE- α positivas aumenta sob estimulação autóloga ao invés da parácrina (Welboren et al., 2009).

O RE- β coexiste com o RE- α nas células epiteliais mamárias, no entanto em maiores quantidades, e também em outras células como as mioepiteliais e as estromais do tecido mamário (Ikeda e Inoue, 2004; Matthews e Gustafsson, 2003). Apesar de não se conhecer a função exata desses receptores nos tecidos mamários normais, o RE- β parece ser essencial para a diferenciação da glândula mamária normal no rato (Riggins et al., 2007; Nilsson et al., 2001). Em ratos *knockout* RE- $\beta^{-/-}$ as glândulas mamárias se desenvolvem normalmente até a puberdade (Riggins et al., 2007). Contudo, diversas anormalidades são notadas durante o período gestacional e lactacional, incluindo secreção incompleta de lipídeos, aumento do lúmen ductal e alveolar e uma redução no número total de alvéolos (Riggins et al., 2007). Além disso, a perda do RE- β provoca uma formação inadequada de junções de adesão intercelulares e expressão anormal de β -catenina, características freqüentemente associadas ao fenótipo maligno tumoral (Riggins et al., 2007). Numerosos experimentos têm descrito a perda da expressão de RE- β durante o processo de carcinogênese mamária (Bierie e Moses, 2009; Nott et al., 2008), indicando uma possível função supressora tumoral desse receptor.

Com essas informações, fica claro que um potencial alvo para terapia do câncer de mama é o bloqueio funcional da resposta estrogênica proliferativa da via RE- α nos tumores mamários. Atualmente, existem dois tipos de medicamentos que bloqueiam a resposta estrogênica: agentes antiestrogênicos que se ligam nos REs e bloqueiam a sua interação com os estrógenos endógenos como os SERMs (Tamoxifeno e Raloxifeno); e os inibidores de aromatases (Letrozol e Anastrozol) que bloqueiam a transformação de andrógenos em estrógenos ativos pela célula mamária tumoral (Park e Jordan, 2002; Bush, 2004). Os SERMs e os inibidores de andrógenos são utilizados no coquetel de quimioterapia em pacientes com câncer de mama agressivo ressecado cirurgicamente

(mastectomia radical) com o objetivo de reduzir a recorrência da doença (Bush, 2004; Katzenellenbogen e Katzenellenbogen, 2000).

O tamoxifeno ou [trans-1-(4βdimetilaminoetoxifenil)-1,2-difenil-1-butenol], também conhecido comercialmente por NOLVADEX® (citrato de tamoxifeno), é uma droga antagonista de estrógenos da família dos moduladores seletivos dos receptores de estrógenos (SERMs) (Jordan, 2006). Esse medicamento tem sido utilizado com sucesso a mais de 30 anos para prevenir e tratar neoplasias de mama dependentes do estímulo estrogênico. Estudos epidemiológicos demonstram que, quando o tratamento oral com tamoxifeno é aplicado a mulheres com câncer de mama RE-positivo por 5 anos após a ressecção cirúrgica do tumor, as chances de recorrência tumoral anual caem pela metade e as taxas de mortalidade pós-cirúrgica são reduzidas a um terço (Lien et al., 1991).

Os SERMs se ligam com alta afinidade ao domínio de ligação (LBD) dos REs, impedindo a sua ativação ao bloquear a interação desse receptor com os estrógenos (Kojetin et al., 2008). Esse efeito antiestrogênico é conhecido como antagonização por competição pelos receptores de estrógenos (Figura 6). Por esse motivo, a presença do tamoxifeno bloqueia os REs e impede a propagação do estímulo proliferativo, além de estimular a apoptose para as células mamárias. Em um experimento realizado com células tumorais mamárias humanas MCF-7, o tratamento com tamoxifeno estimulou a apoptose pela via mitocondrial por aumentar a concentração de Ca^{+2} ionizado intra-mitocondrial e atividade da enzima óxido nítrico sintase mitocondrial (mtNOS) (Nazarawicz et al., 2007). Ao estimular a mtNOS, o tamoxifeno desacopla a respiração mitocondrial, libera citocromos C ao citoplasma, eleva a lipoperoxidação mitocondrial, reduz a atividade catalítica da succinil-CoA:3-oxoacil CoA-transferase e induz a agregação mitocondrial, resultando em apoptose da célula em questão (Nazarawicz et al., 2007). Portanto, a combinação dos efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos induzidos pelo tamoxifeno resulta em uma regressão no número total de células e taxa de proliferação celular nos tumores mamários estrógeno-dependentes em mulheres tratadas com esse SERM (Nazarawicz et al., 2007; Mandlekar et al., 2000).

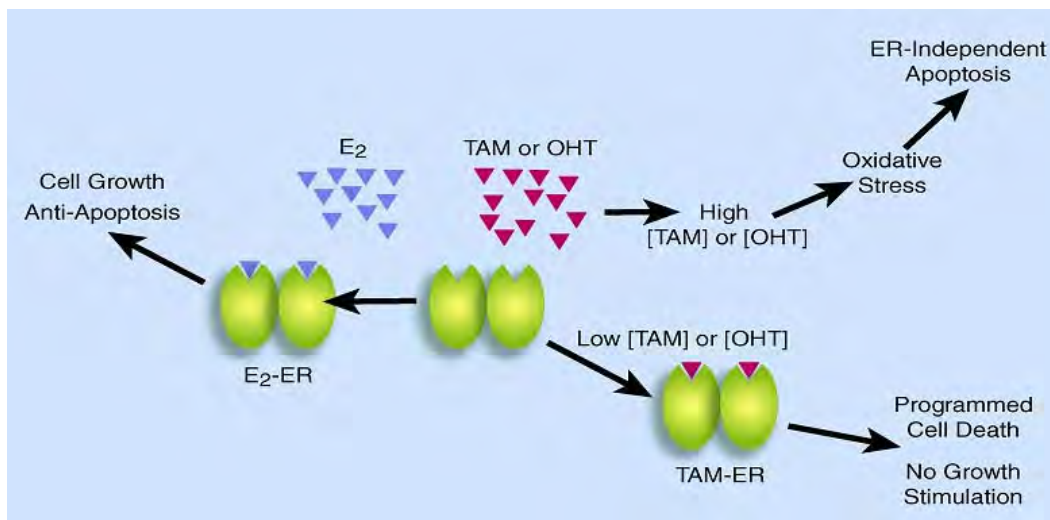


Figura 6 – Mecanismos de ação do estradiol (E₂) e dos SERMs tamoxifeno (TAM) ou 4-hidroxitamoxifeno (OHT), resultando em redução de proliferação celular e indução de apoptose, respectivamente.

Fonte: <http://www.life.uiuc.edu/shapiro/TamoxifenApoptosis.html>

A metabolização primária e secundária do tamoxifeno é extremamente complexa e depende da atividade de múltiplas enzimas do complexo citocromo P450 (CYPs) nos tecidos animais (Figura 7). Uma grande variedade de metabólitos pode ser detectada no soro humano de pacientes tratadas com tamoxifeno (Lien et al., 1991). A metabolização dessa droga tem papel fundamental em sua eficácia, visto que os metabólitos hidroxilados como o 4-hidroxitamoxifeno (OHT) têm 100 vezes maior afinidade pelos ERs que os demais metabólitos, embora corresponda a apenas 10% do volume total de metabólitos (Lien et al., 1991). Os metabólitos formados pela demetilação do tamoxifeno são predominantes em relação aos formados pela hidroxilação do composto primário. O endoxifeno (4-hidroxi-N-demetil tamoxifeno), o mais abundante metabólito com atividade anti-tumoral, é formado pela oxidação do N-desmetil tamoxifeno em uma reação catalizada pela enzima CYP2D6 (Wu et al., 2009). Estudos clínicos recentes demonstraram que polimorfismos genéticos associados a atividade reduzida ou ausente de CYP2D6 implicam em níveis menores de endoxifeno em mulheres com câncer de mama e, conseqüentemente, menor tempo de recorrência tumoral e pior taxa de sobrevida pós-cirúrgica (Abraham et al., 2010; Schroth et al., 2009).

A distribuição tecidual e viabilização do tamoxifeno às células alvo são fatores determinantes para a eficácia antiestrogênica da droga (Lien et al., 1991). Apenas 0,1% do tamoxifeno é detectado no soro, sugerindo uma extensa distribuição tecidual da

droga. Essa descrição da propriedade farmacocinética do tamoxifeno explica porque não existe uma correlação entre níveis séricos e resposta clínica nas pacientes (Ingle, 2007). Contudo, em ratos de laboratório existe correlação entre concentração intratumoral de tamoxifeno e regressão dose-dependente (Lien et al., 1991).

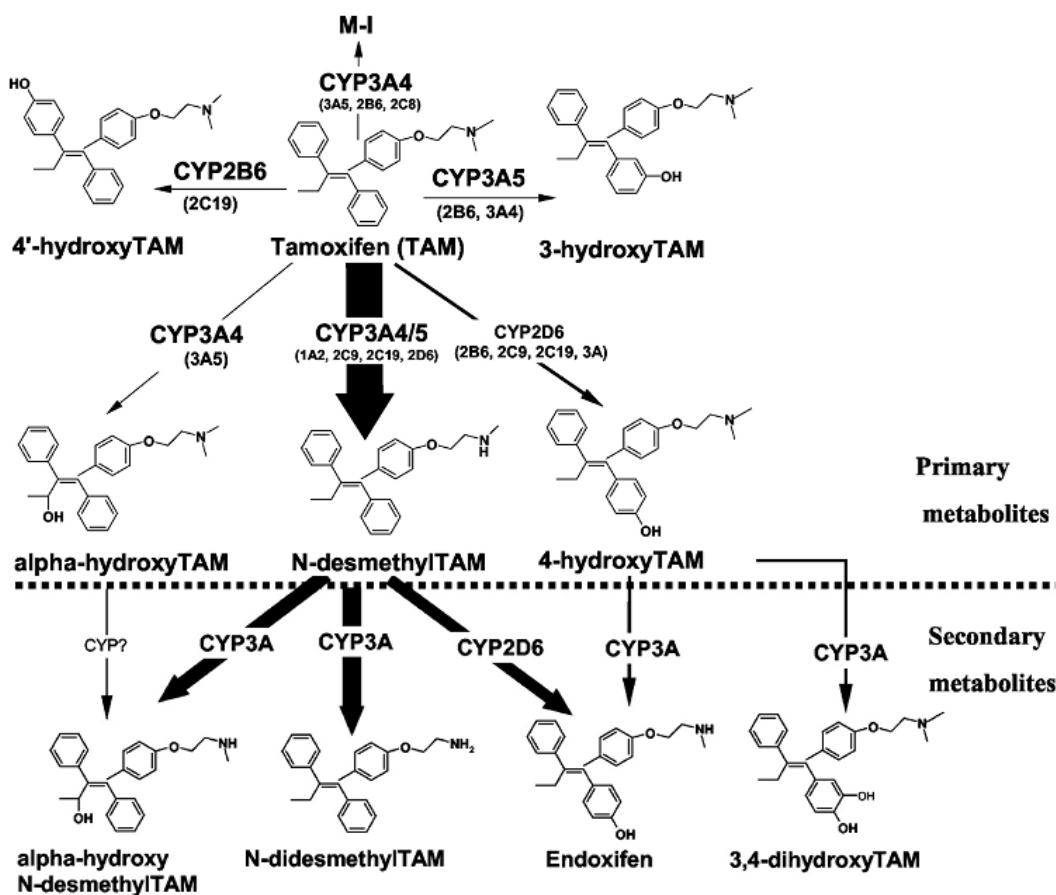


Figura 7 – Vias celulares para a biotransformação do tamoxifeno dependente das enzimas do complexo citocromo oxidase (CYPs).

Fonte: <http://sitemaker.umich.edu/rae/home>

Embora a utilização do tamoxifeno para o tratamento do câncer de mama seja aprovada pela US-Food and Drug Administration (FDA) desde 1998, alguns efeitos colaterais graves limitam sua utilização. O aumento no risco de câncer hepático e de endométrio (sarcoma uterino) é um grave efeito colateral do tamoxifeno (Brown, 2009; Ting et al., 2008; Kim et al., 2005). O aumento no risco é associado a um bloqueio múltiplo de ERs que resulta em danos mutagênicos/genotóxicos nesses órgãos-alvo (White, 1999; Kim et al., 2005). De fato, adutos de DNA foram detectados

principalmente no fígado de ratos tratados com tamoxifeno e iniciados para a hepatocarcinogênese (Kim et al., 2005; Brown, 2009). A extensão dos danos ao DNA das células depende diretamente da dose e do tempo de exposição dos animais ao tamoxifeno (Brown, 2009). Seis doses semanais de tamoxifeno administradas a ratos isogênicos F344 resultaram em aumento dose-dependente da frequência de mutações (*LacI*) no tecido hepático desses animais (Davies et al., 1997). Em outro experimento, camundongos recém-nascidos da linhagem CD-1 receberam tamoxifeno por um período pós-natal de cinco dias. Aos 14-17 meses de vida, aproximadamente 50% desses animais desenvolveram adenocarcinomas uterinos (Newbold et al., 1997).

Outros efeitos colaterais frequentemente relatados por pacientes em tratamento com tamoxifeno são a anorexia, plaquetopenia, leucopenia, neutropenia, anemias, hemorragias, endometriose, distúrbios gastrintestinais, pancreatite, hepatite esteatorrética e hipercalcemia (López et al., 2006; ANVISA, 2005).

3.3. Efeitos biológicos da *Ginkgo biloba*

3.3.1. Aspectos gerais e potencial quimiopreventivo

A *Ginkgo biloba* (do chinês, ginkgo: damasco prateado e biloba: formato bilobado de suas folhas) é uma gimnosperma dióica da família *Ginkgoaceae* que foi descrita inicialmente em 1690 pelo médico alemão Engelbert Kaelmpter (Jacobs e Browner, 2000). Nativa da Coreia, China e Japão, essa árvore pode chegar a uma altura de até 30 metros e viver por cerca de quatro mil anos. A *Ginkgo biloba* tem sobrevivido sem grandes alterações fenotípicas a mais de 200 milhões de anos e, por esse motivo, foi intitulada de "fóssil vivo" por Charles Darwin. Essa longevidade pode ser relacionada à sua capacidade de suportar insultos tóxicos e resistir a infecções microbianas (Jacobs e Browner, 2000). Apesar de ser uma das mais antigas espécies vegetais conhecidas pelo homem, a *Ginkgo biloba* só despertou o interesse dos pesquisadores após a Segunda Guerra Mundial. Após a explosão da bomba nuclear em Hiroshima, as espécies da família *Ginkgoaceae* foram as primeiras a reaparecer no solo da cidade devastada, sem apresentar sinais de alterações ou mutações genéticas (Jacobs e Browner, 2000).

O extrato hidroalcoólico das folhas de *Ginkgo biloba* (EGb) é uma mistura complexa de mais de 300 componentes farmacologicamente ativos (Smith et al., 1996). Os principais são os flavonóides, glicosídeos de flavona, lactonas diterpênicas,

ginkgolídeos, sesquiterpenos, superóxido dismutase dependente de ferro, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido ascórbico e catequinas (Jacobs e Browner, 2000). Comercialmente, o extrato de *Ginkgo biloba* contendo 24% de flavonóides (glicosídeos ginkgo-flavona) e 6% de terpenóides (ginkgolídeos e bilobalídeos) ocupa o primeiro lugar no *ranking* mundial de vendas de plantas medicinais e medicamentos naturais (Jacobs e Browner, 2000). Essa planta medicinal tem sido utilizada na medicina chinesa por mais de quatro mil anos para o tratamento de disfunções cardiopulmonares, e para promover a longevidade. Na Europa (principalmente França e Alemanha) e nos Estados Unidos, o EGb figura entre os produtos naturais mais comercializados, embora nem sempre sob fiscalização de agências governamentais reguladoras (Jacobs e Browner, 2000).

A interação sinérgica entre os diferentes princípios ativos presentes no EGb resulta no incremento do suprimento sangüíneo (pela redução da viscosidade do sangue) e redução da concentração de radicais livres de oxigênio (ROS) em diferentes tecidos animais como o tecido nervoso (Birks et al., 2002). Por isso, as indicações mais comuns da *Ginkgo biloba* são para o tratamento e prevenção de disfunções relacionadas ao envelhecimento como distúrbios de memória e funções cognitivas correlatas, labirintopatias (zumbidos e vertigens), Alzheimer, doenças vasculares periféricas e distúrbios circulatórios do cérebro e do sistema arterial periférico (DeKosky et al., 2008; Sierpina et al., 2003; Jacobs e Browner, 2000).

Os glicosídeos de flavona do tipo rutínico (flavonóides), em geral, reduzem a fragilidade vascular podendo evitar a lesão cerebral isquêmica. Os ginkgolídeos A, B, C e M, principais lactonas diterpênicas do EGb, inibem o fator de agregação plaquetária (PAF). Consequentemente, os ginkgolídeos inibem a agregação plaquetária, broncoconstrição, vasodilatação periférica, quimiotaxia de fagócitos e também inibem a liberação de compostos pró-inflamatórios. O resultado final da combinação desses efeitos biológicos induzidos pelos ginkgolídeos é o aumento na fluidez e circulação sanguínea nos tecidos (Ahlemeyer e Krieglstein, 2003). Além disso, a inibição da agregação plaquetária é útil para o tratamento de inflamação aguda, rejeição tecidual, asma e lesão isquêmica (Zhu et al., 2005). No sistema nervoso central (SNC), o EGb apresenta propriedades neuroprotetoras (evita danos neuronais) por modular o fluxo sanguíneo cerebral, amplificar o sistema antioxidante das células e alterar os níveis de neurotransmissores, óxido nítrico, glicocorticóides e fatores de crescimento (Ahlemeyer

e Krieglstein, 2003). *In vitro*, o EGb foi capaz de proteger neurônios da morte celular induzida por estímulos nocivos como a hipóxia (Klein et al., 1997) peróxido de hidrogênio (Guidetti et al., 2001). Além disso, o bilobalídeo isolado do EGb protegeu as células neuronais PC12 do estresse oxidativo induzido pela indução da via xantina oxidase (Zhou e Zhu, 2000).

Efeitos potencialmente anticarcinogênicos da *Ginkgo biloba* tem sido descritos. Esses efeitos são atribuídos a componentes do extrato que apresentam atividade antioxidante, anti-proliferativas, pró-apoptóticas, indutoras de enzimas hepáticas de detoxificação, anti-angiogênicas e de modulação da expressão gênica (DeFeudis et al., 2003). Estudos recentes têm demonstrado que extratos da folha, casca e raízes da *Ginkgo biloba* apresentam propriedades anticarcinogênicas potenciais que podem ser relacionadas à presença de moléculas com atividades antioxidante, anti-proliferativa, pró-apoptótica, indutora de enzimas hepáticas de detoxificação, anti-angiogênicas e de regulação gênica (DeFeudis et al., 2003). Pretner et al. (2006) demonstraram que o EGb e a ginkgolida B foram capazes de inibir de maneira dose-dependente a proliferação das células tumorais mamárias MDA-MB-231 que apresentam características altamente agressivas. Efeitos anti-proliferativos do EGb também foram observados em células de hepatoma SMMC-7721 e células de câncer oral SCC 1483 (Chen et al., 2002; Kim et al., 2005).

Em outro trabalho, foram analisados os efeitos quimiopreventivos do EGb em dois estudos: epidemiológico e em cultura de células tumorais de câncer ovariano humano (OVCA429, OVCA433, OVCA420 e HOSE-E6E7). No estudo epidemiológico foi observado que o uso regular da *Ginkgo biloba* como único suplemento dietético pode ser relacionado à redução dos riscos para o desenvolvimento de neoplasia não-mucínica de ovário (Ye et al., 2007). No estudo *in vitro*, a *Ginkgo biloba* mostrou efeitos anti-proliferativos significativos (~40%) nas células epiteliais de câncer ovariano e menor eficácia nas células mucinosas de câncer ovariano. A análise dos dados obtidos nesse estudo evidenciou os potenciais efeitos quimiopreventivos e terapêuticos da EGb sobre a carcinogênese ovariana humana (Ye et al., 2006). Efeitos terapêuticos também foram observados em pacientes com tumores malignos do trato digestório superior (faringe, esôfago e estômago) através da administração oral do extrato polissacarídico da casca da *Ginkgo biloba* (Xu et al., 2003), mediante a modulação da expressão de c-myc, bcl-2 e c-fos (Xu et al., 2003).

Propriedades quimiopreventivas do EGb também têm sido observadas em experimentos com roedores. Os tratamentos com EGb ou bilobalídeos purificados reduziram a formação de lesões pré-neoplásicas intestinais (focos de criptas aberrantes) induzidas pelo azoximetano (AOM) em ratos F344 machos (Suzuki et al., 2004). Em ratos Wistar, o EGb aumentou a atividade anti-oxidante e inibiu a progressão de lesões gástricas pré-neoplásicas através da regulação da proliferação celular e apoptose (Jiang et al., 2009). Em um trabalho prévio, nosso grupo de pesquisa identificou um potencial quimiopreventivo do extrato hidroalcoólico da folha da *Ginkgo biloba* sobre a etapa de iniciação da carcinogênese hepática em ratos da linhagem Wistar (Dias et al., 2007).

Os efeitos antioxidantes, anti-proliferativos, anti-angiogênicos e indutores enzimáticos apresentados pelo EGb são mecanismos de ação importantes para a prevenção da carcinogênese (De Feudis et al., 2003). O EGb possui diversos elementos químicos com propriedades antioxidantes, sendo os flavonóides e os terpenóides os mais estudados (Smith et al., 1996). A simples presença de agentes antioxidantes naturais proporciona um potencial quimiopreventivo importante ao EGb. A combinação dos agentes antioxidantes com outros elementos quimioprotetores como polissacarídeos estimulantes do sistema antioxidante das células (enzima superóxido dismutase) aumenta a capacidade quimiopreventiva do EGb em ratos (Smith et al., 1996). Além disso, o EGb possui compostos químicos anti-angiogênicos que inibem a enzima óxido nítrico sintase (De Feudis et al., 2003).

O extrato de *Ginkgo biloba* exerce efeitos anti-carcinogênicos também por modular a expressão de genes controladores do crescimento e proliferação celulares. Alguns componentes do EGb são mediadores químicos da transcrição gênica e podem ser utilizados potencialmente para o tratamento de algumas doenças crônicas (Gohil et al., 2002). Em um estudo com cDNA-microarray foi demonstrado que o EGb foi capaz de alterar a expressão de genes envolvidos na regulação da proliferação celular, diferenciação e apoptose em células de adenocarcinoma mamário humano (Li et al., 2002). Evidências na redução da expressão gênica e protéica dos controladores da apoptose bax e bcl-2 pelo EGb foram obtidas em modelo experimental de rato SAMP8 (Mak et al, 2006).

Outro efeito quimiopreventivo potencial do EGb é a sua capacidade de modular o crescimento de neoplasias hormônio-dependentes como mama e próstata. Recentemente, pesquisadores chineses descreveram atividades estrogênicas em alguns

flavonóides presentes no EGb como kampferol, quercetina e isoramnetina (fitoestrógenos) (Oh et al., 2004). Os fitoestrógenos são estrógenos vegetais que se ligam aos ER- α e β presentes nas células animais, atividade semelhante à dos moduladores seletivos dos receptores de estrógenos (SERMs), estimulando uma resposta estrogênica fraca na célula-alvo (Henley e Korach, 2010). Fitoestrógenos isolados do EGb induziram a proliferação seletiva de células tumorais mamárias MCF-7 ER-positivas com aumento da transcrição dos genes pS2 (responsivo de estrógeno) e PR (receptor de progesterona). O mesmo não aconteceu nas células tumorais mamárias MDA-MB-231 ER-negativas em resposta aos fitoestrógenos isolados do EGb, indicando uma provável atividade quimiopreventiva do EGb para a carcinogênese de mama *in vivo* (Oh e Chung., 2004). Alguns autores têm sugerido a utilização do EGb como um método alternativo à terapia de reposição hormonal (HRT) em mulheres na pós-menopausa. Segundo esses pesquisadores, o efeito estrogênico fraco induzido pelos fitoestrógenos do EGb provavelmente são suficientes para reduzir o impacto de alguns sintomas da menopausa como osteoporose e doença cardiovascular, sem aumentar o risco de desenvolver câncer de mama nessas mulheres (Oh et al., 2004).

3.3.2. Interação da *Ginkgo biloba* com tamoxifeno

Interações medicamentosas são frequentemente relatadas, estudadas e evitadas pelos órgãos governamentais reguladores na medicina humana. As enzimas do citocromo P450 (CYPs) são uma família de enzimas essenciais para a metabolização de drogas e outras moléculas exógenas, bem como a biossíntese de esteróides e prostaglandinas (VandenBrink e Isoherranen, 2010). A interação medicamentosa é o resultado direto da inibição ou indução da atividade das CYPs pelos medicamentos ingeridos. Assim, pode ocorrer uma potencialização ou atenuação da biodisponibilidade e eficácia dos medicamentos utilizados concomitantemente pelo paciente (VandenBrink e Isoherranen, 2010). O álcool é um indutor de CYPs muito frequentemente associado à interação medicamentosa (Seitz e Poschl, 1997) com antibióticos (p.ex. sulfametoxazol e trimetoprima), cloranfenicol, dimenidrinato (dramin), metoclopramida (Plasil), ácido acetil salicílico (aas), propanolol, barbitúricos (pentobarbital), antidiabéticos (sulfoniluréias) e outros medicamentos (Agência nacional de vigilância sanitária - ANVISA). Em relação às plantas medicinais, a interação medicamentosa ocorre nos pacientes que estão sendo tratados com medicamentos como os quimioterápicos e

utilizam medicamentos naturais sem o conhecimento do médico. Nesse caso, os pacientes entendem que os extratos de plantas naturais são inócuos e particularmente benéficos ao tratamento que estão sendo submetidos. O grande problema é que os extratos de numerosas plantas medicinais apresentam princípios farmacológicos ativos que induzem ou inibem as CYPs, caracterizando um potencial para a interação medicamentosa (Mendes et al., 2010).

Alguns constituintes do EGb são potentes inibidores de enzimas do complexo citocromo P450 em humanos (Gaudineau et al., 2004; Von Moltke et al., 2004). Assim, o EGb interage farmacologicamente com drogas anti-plaquetárias, antidepressivas, diuréticas e antiinflamatórias não-esteroidais (Jiang et al., 2005; Lei et al., 2009; Aruna e Naidu, 2007; Fontana et al., 2005; Zhao et al., 2002). Estudos recentes *in vitro* demonstraram que os flavonóides isolados do EGb reduziram a toxicidade de cancerígenos através da inibição da expressão e atividade da CYP1A2 e CYP1A1 (Lautraite et al., 2002). Estudos *in vivo* têm demonstrado a capacidade do EGb em induzir CYPs como a CYP2B1, CYP2B2 e CYP3A1 (Taki et al., 2009; Zhao et al., 2002). Em modelos humanos, o EGb é capaz de inibir significativamente a atividade da CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 e CYP3A4 (Gaudineau et al., 2004).

3.4. Modelo experimental de carcinogênese mamária

Os modelos experimentais de neoplasias mamárias induzidas pela administração de cancerígenos químicos em roedores são ferramentas extremamente úteis para o estudo das múltiplas etapas da carcinogênese mamária (Anderson, 1992; Thompson e Singh, 2000; Boone et al., 1992) e estudos de quimioprevenção da carcinogênese mamária (Mehta, 2000; Boone et al., 1992).

Os modelos experimentais de carcinogênese mamária induzida quimicamente em fêmeas das linhagens de ratos Sprague-Dawley e Wistar-Furth são os mais bem aceitos pela comunidade científica internacional. Os animais de ambas as linhagens são os mais susceptíveis ao desenvolvimento de lesões neoplásicas de mama induzidas por cancerígenos químicos específicos como o 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) e a N-metil-N-nitrosourea (MNU) (Russo e Russo, 2000; Mehta, 2000). Em geral, as neoplasias mamárias induzidas quimicamente pelo DMBA são carcinomas agressivos hormônio-dependentes (RE-positivos). A incidência, multiplicidade e tipos de tumores mamários podem ser influenciados por fatores como idade do animal, tempo de

exposição ao cancerígeno, história reprodutiva, desregulação endócrina, dieta e outros fatores que alteram o desenvolvimento e o grau de diferenciação da glândula mamária (Russo e Russo, 1994).

A DMBA é um poderoso cancerígeno sintético órgão-específico utilizado por pesquisadores do mundo todo para elaboração de modelos experimentais de carcinogênese de mama. Esse composto químico é enquadrado na classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Figura 8). Muitas classes de cancerígenos químicos possuem mecanismos de ação derivados de interações covalentes de seus metabólitos com o DNA como nitrosaminas, aminas aromáticas, micotoxinas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Loeb e Harris, 2008). A metabolização da DMBA pelas células animais resulta em um metabólito reativo carcinogênico com sítio reativo diidrodiol epóxido (Macejová e Brtko, 2001). De fato, os diidrodióis epóxidos tem potencial químico para formar íons carboxi-benzílicos, intermediários eletrofílicos que se ligam avidamente a sítios nucleofílicos celulares (Macejová e Brtko, 2001). A DMBA modifica covalentemente o DNA celular pela reação do sítio diidrodiol epóxido presente em seu metabólito com grupamentos amino-exocíclicos de desoxiguanosina e desoxiadenosina presentes nos ácidos nucleicos celulares (Macejová e Brtko, 2001).

In vivo, as células epiteliais mamárias presentes no broto terminal metabolizam o DMBA resultando em metabólitos com radicais diidrodióis epóxidos altamente reativos que causam danos irreparáveis no DNA dessas células. Esse efeito carcinogênico é seletivo para as células do broto terminal em comparação às demais células epiteliais mamárias, em decorrência da incapacidade dessas células de remover completamente os adutos de DNA induzidos pelos epóxidos reativos derivados da metabolização do DMBA (Macejová e Brtko, 2001). Assim, os animais são susceptíveis ao desenvolvimento de adenocarcinomas mamários apenas enquanto os brotos terminais estiverem presentes (aproximadamente após 5 semana de vida).

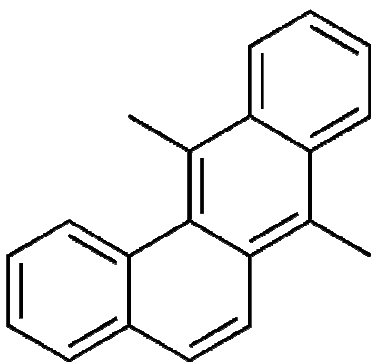


Figura 8 – Representação da estrutura química do hidrocarboneto policíclico aromático 7,12-dimetilbenz(o)antraceno (DMBA), de fórmula molecular $C_{20}H_{16}$.

Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>

Durante a exposição ao DMBA, alguns brotos terminais aumentam de tamanho e formam uma pequena massa de células denominada de proliferação intraductal que pode progredir a microtumores em 35 dias (Russo e Russo, 2000; Russo e Russo, 1996; Calaf e Russo, 1993). Os microtumores evoluem a carcinomas *in situ* e posteriormente a adenocarcinomas invasivos que rompem a membrana basal e invadem tecidos adjacentes como tecido conjuntivo, adiposo, derme e epiderme. Contudo, nem todos os brotos terminais expostos ao DMBA originam neoplasias malignas. A maioria dos brotos terminais não se converte a microtumores. Esse fenômeno explica o aparecimento de 1 a 5 tumores em cada rata iniciada com a DMBA em contraste à presença das 12 cadeias mamárias presentes nesse animal (Russo e Russo, 1996; Calaf e Russo, 1993).

O primeiro modelo experimental para o estudo de câncer de mama que utiliza o cancerígeno DMBA foi utilizado no ano de 1961 por Huggins. Em 1987, Russo e Russo caracterizaram os mecanismos de ação do DMBA. Os tumores experimentais mamários induzidos pelo DMBA mimetizam o comportamento de neoplasias malignas humanas, embora ambos não possam ser comparados em termos de latência relativa, parâmetros histopatológicos e endócrinos (Loeb e Harris, 2008; Costa et al., 2002; Russo e Russo, 2000). Assim, mesmo que a DMBA não seja um fator de risco para o câncer de mama humano, compostos com estrutura similar (p.ex. hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) tem sido constantemente relacionados ao desenvolvimento de neoplasias malignas experimentais e humanas. O grande número de publicações internacionais comprovam a valiosa importância prática da utilização experimental de DMBA em estudos que mimetizem o adenocarcinoma mamário humano. Atualmente, o uso de quimioterápicos como os SERMs (tamoxifeno de raloxifeno) para inibir o crescimento

de tumores malignos de mama ER-positivos é baseado cientificamente em modelos experimentais de câncer de mama induzidos pela DMBA (Kim et al., 2006).

3.5. Considerações finais

Os extratos das folhas verdes e casca da *Ginkgo biloba* têm demonstrado potencial anti-tumoral em modelos experimentais e em cultura de células. O potencial quimiopreventivo desses extratos é mediado pela presença de moléculas com atividade antioxidante, antiproliferativa, antiangiogênica, antiestrogênica e moduladoras da expressão de genes controladores do ciclo celular (Masteikova et al., 2007; Dias et al., 2008; DeFeudis et al., 2003; Sagar et al., 2006; Oh e Chung, 2006). Portanto, a nossa hipótese inicial era de que o EGb poderia retardar o crescimento de neoplasias mamárias RE-positivas induzidas pela DMBA em fêmeas SD com ou sem interação com tamoxifeno.

3.6. Referências

- ABRAHAM, J.E.; MARANIAN, M.J.; DRIVER, K.E.; PLATTE, R.; KALMYRZAEV, B.; BAYNES, C.; LUCCARINI, C.; SHAH, M.; INGLE, S.; GREENBERG, D.; EARL, H.M.; DUNNING, A.M.; PHAROAH, P.D.; CALDAS, C. CYP2D6 gene variants: association with breast cancer specific survival in a cohort of breast cancer patients from the United Kingdom treated with adjuvant tamoxifen. **Breast Cancer Res.**, v.12, p.R64, 2010.
- AHLEMEYER, B.; KRIEGLSTEIN, J. Pharmacological studies supporting the therapeutic use of *Ginkgo biloba* extract for Alzheimer's disease. **Pharmacopsychiatry**, v.36, p.8-14, 2003.
- ANDERSON, C.H.; BEATTIE, C.W. Cellular kinetics of rat mammary gland terminal end bud epithelium exposed to N-methyl-N-nitrosourea in vivo. **Cancer Res.**, v.15, p.5076-81, 1992.
- ARUNA, D.; NAIDU, M.U. Pharmacodynamic interaction studies of *Ginkgo biloba* with cilostazol and clopidogrel in healthy human subjects. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v.63, p.333-8, 2007.
- BIERIE, B.; MOSES, H.L. Gain or loss of TGFbeta signaling in mammary carcinoma cells can promote metastasis. **Cell Cycle**, v.8, p.3319-27, 2009.

-
- BIRKS, J.; GRIMLEY, E.V.; VAN DONGEN, M. *Ginkgo biloba* for cognitive impairment and dementia. **Coch. Dat. Syst. Rev.**, v.4, CD003120, 2002.
- BJÖRNSTRÖM, L.; SJÖBERG, M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. **Mol. Endocrinol.**, v.19, p.833-42, 2005.
- BOONE, C.W.; STEELE, V.E.; KELLOFF, G.J. Screening for chemopreventive (anticarcinogenic) compounds in rodents. **Mutat. Res.**, v.267, p.251-5, 1992.
- BRAZIER, N.C.; LEVINE, M.A. Drug-herb interaction among commonly used conventional medicines: a compendium for health care professionals. **Am. J. Ther.**, v.10, p.163-9, 2003.
- BROWN, K. Is tamoxifen a genotoxic carcinogen in women? **Mutagenesis**, v.24, p.391-04, 2009.
- BUSH, N.J. Advances in hormonal therapy for breast cancer. **Semin. Oncol. Nurs.**, v.23, p.46–54, 2007.
- CALAF, G.; RUSSO, J. Transformation of human breast epithelial cells by chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, v.14, p.483-92, 1993.
- CHEN, Q.; YANG, G.W.; AN, L.G. Apoptosis of hepatoma cells SMMC-7721 induced by *Ginkgo biloba* seed polysaccharide. **World J. Gastroenterol.**, v.8, p.832-6, 2002.
- COSTA, I.; SOLANAS, M.; ESCRICH, E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12 dimethylbenz(alpha)anthracene in the rat: a comparative analysis with human breast tumors. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.126, p.915-27, 2002.
- CUZICK, J. Breast cancer prevention in the developing world. **Breast Cancer Res.**, v.20, p.12, 2010.
- DAVIES, R.; OREFFO, V.I.; MARTIN, E.A.; FESTING, M.F.; WHITE, I.N.; SMITH, L.L.; STYLES, J.A. Tamoxifen causes gene mutations in the livers of lambda/lacI transgenic rats. **Cancer Res.**, v.57, p.1288-93, 1997.
- DEFEUDIS, F.V.; PAPADOPOULOS, V.; DRIEU, K. *Ginkgo biloba* extracts and cancer: a research area in its infancy. **Black. Pub. Fund. & Clin. Pharmacol.**, v.17, p.405–17, 2003.

-
- DEKOSKY, S.T.; WILLIAMSON, J.D.; FITZPATRICK, A.L.; KRONMAL, R.A.; IVES, D.G.; SAXTON, J.A.; LOPEZ, O.L.; BURKE, G.; CARLSON, M.C.; FRIED, L.P.; KULLER, L.H.; ROBBINS, J.A.; TRACY, R.P.; WOOLARD, N.F.; DUNN, L.; SNITZ, B.E.; NAHIN, R.L.; FURBERG, C.D. Ginkgo biloba for prevention of dementia: a randomized controlled trial. **JAMA**, v.300, p.2253-62, 2008.
- DIAS, M.C.; RODRIGUES, M.A.; REIMBERG, M.C.; BARBISAN, L.F. Protective effects of *Ginkgo biloba* against rat liver carcinogenesis. **Chem. Biol. Interact.**, v.173, p.32-42, 2008.
- DIERSSEN, J.W.; DE MIRANDA, N.F.; MULDER, A.; VAN PUIJENBROEK, M.; VERDUYN, W.; CLAAS, F.H.; VAN DE VELDE, C.J.; JAN FLEUREN, G.; CORNELISSE, C.J.; CORVER, W.E.; MORREAU, H. High-resolution analysis of HLA class I alterations in colorectal cancer. **BMC Cancer**, v.6, p.233, 2006.
- DUNN, B.K.; GREENE, M.H.; KELLEY, J.M.; COSTANTINO, J.P.; CLIFFORD, R.J.; HU, Y.; TANG, G.; KAZEROUNI, N.; ROSENBERG, P.S.; MEERZAMAN, D.M.; BUETOW, K.H. Novel pathway analysis of genomic polymorphism-cancer risk interaction in the breast cancer prevention trial. **Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.**, v.1, p.332-349, 2010.
- FENG, Y.; MANKA, D.; WAGNER, K.U.; KHAN, S.A. Estrogen receptor-alpha expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.104, p.14718-23, 2007.
- FONTANA, L.; SOUZA, A.S.; DEL BEL, E.A.; OLIVEIRA, R.M. *Ginkgo biloba* leaf extract (EGb 761) enhances catalepsy induced by haloperidol and L-nitroarginine in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.38, p.1649-54, 2005.
- FOX, E.M.; DAVIS, R.J.; SHUPNIK, M.A. ERbeta in breast cancer-onlooker, passive player, or active protector? **Steroids**, v.73, p.1039-51, 2008.
- GAUDINEAU, C.; BECKERMAN, R.; WELBOURN, S.; AUCLAIR, K. Inhibition of human P450 enzymes by multiple constituents of the *Ginkgo biloba* extract. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.318, p.1072-8, 2004.
- GAUDINEAU, C.; BECKERMAN, R.; WELBOURN, S.; AUCLAIR, K. Inhibition of human P450 enzymes by multiple constituents of the *Ginkgo biloba* extract. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.318, p.1072-8, 2004.

-
- GIACINTI, L.; CLAUDIO, P.P.; LOPEZ, M.; GIORDANO, A. Epigenetic information and estrogen receptor alpha expression in breast cancer. **Oncologist**, v.11, p.1-8, 2006.
- GOHIL, K.; PACKER, L. Global gene expression analysis identifies cell and tissue specific actions of *Ginkgo biloba* extract, EGb 761. **Cell Mol. Biol.**, v.48, p.625-31, 2002.
- GUIDETTI, C.; PARACCHINI, S.; LUCCHINI, S.; CAMBIERI, M.; MARZATICO, F. Prevention of neuronal cell damage induced by oxidative stress in-vitro: effect of different *Ginkgo biloba* extracts. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.53, p.387-92, 2001.
- HENLEY, D.V.; KORACH, K.S. Physiological effects and mechanisms of action of endocrine disrupting chemicals that alter estrogen signaling. **Hormones**, v.9, p.191-205, 2010.
- HEWITT, S.C.; O'BRIEN, J.E.; JAMESON, J.L.; KISSLING, G.E.; KORACH, K.S. Selective disruption of ER{alpha} DNA-binding activity alters uterine responsiveness to estradiol. **Mol. Endocrinol.**, v.23, p.2111-6, 2009.
- IKEDA, K.; INOUE, S. Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. **Arch. Histol. Cytol.**, v.67, p.435-42, 2004.
- JACOBS, B.P.; BROWNER, W.S. *Ginkgo biloba*: a living fossil. **Am. J. Med.**, v.108, p.341-2, 2000.
- JEMAL, A.; THOMAS, A.; MURRAY, T.; THUN, M. Cancer statistics. **CA Cancer J. Clin.**, v.52, p.23-47, 2002.
- JIANG, X.; WILLIAMS, K.M.; LIAUW, W.S.; AMMIT, A.J.; ROUFOGALIS, B.D.; DUKE, C.C.; DAY, R.O.; MCLACHLAN, A.J. Effect of ginkgo and ginger on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in healthy subjects. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v.59, p.425-32, 2005.
- JIANG, X.Y.; QIAN, L.P.; ZHENG, X.J.; XIA, Y.Y.; JIANG, Y.B.; SUN DA, Y. Interventional effect of *Ginkgo biloba* extract on the progression of gastric precancerous lesions in rats. **J. Dig. Dis.**, v.10, p.293-9, 2009.
- JORDAN, V.C. Tamoxifen (ICI46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer. **British J. Pharm.**, v.147, p.269-76, 2006.
- KATZENELLENBOGEN, B.S.; KATZENELLENBOGEN, J.A. Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta:

-
- regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v.2, p.335-44, 2000.
- KIM, K.S.; RHEE, K.H.; YOON, J.H.; LEE, J.G.; LEE, J.H.; YOO, J.B. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) induces apoptosis by the activation of caspase-3 in oral cavity cancer cells. **Oral Oncol.**, v.41, p.383-9, 2005.
- KIM, S.Y.; LAXMI, Y.R.; SUZUKI, N.; OGURA, K.; WATABE, T.; DUFFEL, M.W.; SHIBUTANI, S. Formation of tamoxifen-DNA adducts via O-sulfonation, not O-acetylation, of alpha-hydroxytamoxifen in rat and human livers. **Drug Metab. Dispos.**, v.33, p. 1673-8, 2005.
- KIM, S.Y.; SUZUKI, N.; LAXMI, Y.R.S.; UMEMOTO, A.; MATSUDA, T.; SHIBUTANI, S. Antiestrogens and the Formation of DNA Damage in Rats: A Comparison. **Chem. Res. Toxicol.**, v.19, p.852-858, 2006.
- KLEIN, J.; CHATTERJEE, S.S.; LÖFFELHOLZ, K. Phospholipid breakdown and choline release under hypoxic conditions: inhibition by bilobalide, a constituent of *Ginkgo biloba*. **Brain Res.**, v.755, p.347-50, 1997.
- KOJETIN, D.J.; BURRIS, T.P.; JENSEN, E.V.; KHAN, S.A. Implications of the binding of tamoxifen to the coactivator recognition site of the estrogen receptor. **Endocr. Relat. Cancer**, v.15, p.851-70, 2008.
- LAUTRAITE, S.; MUSONDA, A.C.; DOEHMER, J.; EDWARDS, G.O.; CHIPMAN, J.K. Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. **Mutagenesis**, v.17, p.45-53, 2002.
- LEI, H.P.; JI, W.; LIN, J.; CHEN, H.; TAN, Z.R.; HU, D.L.; LIU, L.J.; ZHOU, H.H. Effects of *Ginkgo biloba* extract on the pharmacokinetics of bupropion in healthy volunteers. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v.68, p.201-6, 2009.
- LI, W.; PRETNER, E.; SHEN, L.; DRIEU, K.; PAPADOPOULOS V. Common gene targets of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) in human tumor cells: relation to cell growth. **Cell Mol. Biol.**, v.48, p.655-62, 2002.
- LIEN, E.A.; SOLHEIM, E.; UELAND, P.M. Distribution of tamoxifen and its metabolites in rat and human tissues during steady-state treatment. **Cancer Res.**, v.51, p.4837-44, 1991.
- LO, P.K.; SUKUMAR, S. Epigenomics and breast cancer. **Pharmacogenomics**, v.9, p.1879-902, 2008.

-
- LOEB, L.A.; HARRIS, C.C. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. **Cancer Res.**, v.68, p.6863-72, 2008.
- LÓPEZ, M.; LELLIOTT, C.J.; TOVAR, S.; KIMBER, W.; GALLEGO, R.; VIRTUE, S.; BLOUNT, M.; VÁZQUEZ, M.J.; FINER, N.; POWLES, T.J.; O'RAHILLY, S.; SAHA, A.K.; DIÉGUEZ, C.; VIDAL-PUIG, A.J. Tamoxifen-induced anorexia is associated with fatty acid synthase inhibition in the ventromedial nucleus of the hypothalamus and accumulation of malonyl-CoA. **Diabetes**, v.55, p.1327-36, 2006.
- MACEJOVÁ, D.; BRTKO, J. Chemically induced carcinogenesis: a comparison of 1-methyl-1-nitrosurea, 7,12-dimethylbenzanthracene, diethylnitroso-amine and azoxymethan models (mini-review). **Endocrine Reg.**, v.35, p.53-9, 2001.
- MAK, Y.T.; CHAN, W.Y.; LAM, W.P.; YEW, D.T. Immunohistological evidences of *Ginkgo biloba* extract altering Bax to Bcl-2 expression ratio in the hippocampus and motor cortex of senescence accelerated mice. **Microsc. Res. Tech.**, v.69, p.601-5, 2006.
- MANDLEKAR, S.; HEBBAR, V.; CHRISTOV, K.; KONG, T. Pharmacodynamics of Tamoxifen and Its 4-Hydroxy and *N*-Desmethyl Metabolites: Activation of Caspases and Induction of Apoptosis in Rat Mammary Tumors and in Human Breast Cancer Cell Lines. **Cancer Res.**, v.60, p.6601-6, 2000.
- MASTEIKOVA, R.; MUSELIK, J.; BERNATONIENE, J.; BERNATONIENE, R. Antioxidative activity of Ginkgo, Echinacea, and Ginseng tinctures. **Medicina**, v.43, p.306-9, 2007.
- MATTHEWS, J.; GUSTAFSSON, J.A. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. **Mol. Interv.**, v.3, p.281-92, 2003.
- MEHTA, R.G. Experimental basis for the prevention of breast cancer. **Eur. J. Cancer**, v.36, p. 1275-82, 2000.
- MENDES, E.; HERDEIRO, M.T.; PIMENTEL, F. The use of herbal medicine therapies by cancer patients. **Acta Med. Port.**, v.23, p.901-8, 2010.
- MORIMOTO, L.; COALSON, J.; MOWAT, F.; O'MALLEY, C. Factors affecting receipt of chemotherapy in women with breast cancer. **Int. J. Womens Health**, v.2, p.107-22, 2010
- NAZAREWICZ, R.R.; ZENEBE, W.J.; PARIHAR, A.; LARSON, S.K.; ALIDEMA, E.; CHOI, J.; GHAFOURIFAR, P. Tamoxifen induces oxidative stress and

-
- mitochondrial apoptosis via stimulating mitochondrial nitric oxide synthase. **Cancer Res.**, v.67, p.1282-90, 2007.
- NEWBOLD, R.R.; JEFFERSON, W.N.; PADILLA-BURGOS, E.; BULLOCK, B.C. Uterine carcinoma in mice treated neonatally with tamoxifen. **Carcinogenesis**, v.18, p.2293-8, 1997.
- NILSSON, S.; MÄKELÄ, S.; TREUTER, E.; TUJAGUE, M.; THOMSEN, J.; ANDERSSON, G.; ENMARK, E.; PETTERSSON, K.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.A. Mechanisms of estrogen action. **Physiol. Rev.**, v.81, p.1535-65, 2001.
- NOTT, S.L.; HUANG, Y.; FLUHARTY, B.R.; SOKOLOV, A.M.; HUANG, M.; COX, C.; MUYAN, M. Do Estrogen Receptor beta Polymorphisms Play A Role in the Pharmacogenetics of Estrogen Signaling? **Curr. Pharmac. Person. Med.**, v.6, p.239-259, 2008.
- OH, S.M.; CHUNG, K.H. Antiestrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v.100, p.167-76, 2006.
- OH, S.M.; CHUNG, K.H. Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. **Life Sci.**, v.74, p.1325-35, 2004.
- PARK, W.C.; JORDAN, V.C. Selective estrogen receptor modulators (SERMS) and their roles in breast cancer prevention. **TRENDS Mol. Med.**, v.8, p.82-8, 2002.
- PARKIN, D.M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J. Clin.**, v.55, p.74-108, 2005.
- PARKIN, D.M.; PISANI, P.; FERLAY, J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. **Int. J. Cancer**, v.80, p.827-41, 1999.
- PRETNER, E.; AMRI, H.; LI, W.; BROWN, R.; LIN, C.S.; MAKARIOU, E.; DEFEUDIS, F.V.; DRIEU, K.; PAPADOPOULOS, V. Cancer-related overexpression of the peripheral-type benzodiazepine receptor and cytostatic anticancer effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761). **Anticancer Res.**, v.26, p.9-22, 2006.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V.E. Farmacognosia e Farmacobiotechnologia. **Revista de psiquiatria clínica**, v.30, no.6, 2003.
- RUSSO, J.; RUSSO, I.H. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, v.5, p.187-200, 2000.

-
- RUSSO, J.; RUSSO, I.H. Experimentally induced mammary tumors in rats. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.39, p.7-20, 1996.
- RUSSO, J.; RUSSO, I.H. Toward a physiological approach to breast cancer prevention. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.3, p.353-64, 1994.
- SAGAR, S.M.; YANCE, D.; WONG, R.K. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer-Part 1. **Curr. Oncol.**, v.13, p.14-26, 2006.
- SCHROTH, W.; GOETZ, M.P.; HAMANN, U.; FASCHING, P.A.; SCHMIDT, M.; WINTER, S.; FRITZ, P.; SIMON, W.; SUMAN, V.J.; AMES, M.M.; SAFGREN, S.L.; KUFFEL, M.J.; ULMER, H.U.; BOLÄNDER, J.; STRICK, R.; BECKMANN, M.W.; KOELBL, H.; WEINSHILBOUM, R.M.; INGLE, J.N.; EICHELBAUM, M.; SCHWAB, M.; BRAUCH, H. Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. **JAMA**, v.302, p.1429-36, 2009.
- SEGARS, J.H.; MARKS, M.S.; HIRSCHFELD, S.; DRIGGERS, P.H.; MARTINEZ, E.; GRIPPO, J.F.; BROWN, M.; WAHLI, W.; OZATO, K. Inhibition of estrogen-responsive gene activation by the retinoid X receptor beta: evidence for multiple inhibitory pathways. **Mol. Cell Biol.**, v.13, p.2258-68, 1993.
- SEITZ, H.K.; PÖSCHL, G. The role of gastrointestinal factors in alcohol metabolism. **Alcohol Alcohol**, v.32, p.543-9, 1997.
- SIERPINA, V.S.; WOLLSCHLAEGER, B.; BLUMENTHAL, M. *Ginkgo biloba*. **Am. Fam. Physician.**, v.68, p.923-6, 2003.
- SILVERMAN, S.L. New selective estrogen receptor modulators (SERMs) in development. **Curr. Osteoporos. Rep.**, v.8, p.151-3, 2010.
- SIMONCINI, T.; RABKIN, E.; LIAO, J.K. Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.23, p.198-203, 2003.
- SMITH, P.F.; MACLENNAN, K.; DARLINGTON, C.L. The neuroprotective properties of the *Ginkgo biloba* leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). **J. Ethnopharmacol.**, v.50, p.131-139, 1996.
- SNEDEKER, S.M. Pesticides and breast cancer risk: A review of DDT, DDE, and dieldrin. **Environ. Health Perspect.**, v.109, p.35-47, 2001.

-
- SUZUKI, R.; KOHNO, H.; SUGIE, S.; SASAKI, K.; YOSHIMURA, T.; WADA, K.; TANAKA, T. Preventive effects of extract of leaves of ginkgo (*Ginkgo biloba*) and its component bilobalide on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. **Cancer Lett.**, v.210, p.159-69, 2004.
- TAKI, Y.; YAMAZAKI, Y.; SHIMURA, F.; YAMADA, S.; UMEGAKI, K. Time-dependent induction of hepatic cytochrome P450 enzyme activity and mRNA expression by bilobalide in rats. **J. Pharmacol. Sci.**, v.109, p.459-62, 2009.
- THOMPSON, H.J.; SINGH, M. Rat models of premalignant breast disease. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, v.5, p.409-20, 2000.
- TING, A.Y.; KIMLER, B.F.; FABIAN, C.J.; PETROFF, B.K. Tamoxifen prevents premalignant changes of breast, but not ovarian, cancer in rats at high risk for both diseases. **Cancer Prev. Res.**, v.1, p.546-53, 2008.
- VANDENBRINK, B.M.; ISOHERRANEN, N. The role of metabolites in predicting drug-drug interactions: focus on irreversible cytochrome P450 inhibition. **Curr. Opin. Drug Discov. Devel.**, v.13, p.66-77, 2010.
- VON MOLTKE, L.L.; WEEMHOFF, J.L.; BEDIR, E.; KHAN, I.A.; HARMATZ, J.S.; GOLDMAN, P.; GREENBLATT, D.J. Inhibition of human cytochromes P450 by components of *Ginkgo biloba*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.56, p.1039-44, 2004.
- WEIGEL, M.T.; DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocr. Relat. Cancer**, v.17, p.245-62, 2010.
- WELBORN, W.J.; SWEEP, F.C.; SPAN, P.N.; STUNNENBERG, H.G. Genomic actions of estrogen receptor alpha: what are the targets and how are they regulated? **Endocr. Relat. Cancer**, v.16, p.1073-89, 2009.
- WOLF, M.S.; WESTON, A. Breast cancer risk and environmental exposures. **Environ. Health Perspect.**, v.105, p.891-896, 1997.
- WU, X.; HAWSE, J.R.; SUBRAMANIAM, M.; GOETZ, M.P.; INGLE, J.N.; SPELSBERG, T.C. The tamoxifen metabolite, endoxifen, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor alpha for degradation in breast cancer cells. **Cancer Res.**, v.69, p.1722-7, 2009.
- XU, A.H.; CHEN, H.S.; SUN, B.C.; XIANG, X.R.; CHU, Y.F.; ZHAI, F.; JIA, L.C. Therapeutic mechanism of *Ginkgo biloba* exocarp polysaccharides on gastric cancer. **World J. Gastroenterol.**, v.9, p.2424-7, 2003.

-
- XU, J.; WU, R.C.; O'MALLEY, B.W. Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. **Nat. Rev. Cancer.**, v.9, p.615-30, 2009.
- YE, B.; APONTE, M.; DAI, Y.; LI, L.; HO, M.C.; VITONIS, A.; EDWARDS, D.; HUANG, T.N.; CRAMER, D.W. *Ginkgo biloba* and ovarian cancer prevention: epidemiological and biological evidence. **Cancer Lett.**, v.251, p.43-52, 2007.
- ZHAO, L.Z.; HUANG, M.; CHEN, J.; EE, P.L.; CHAN, E.; DUAN, W.; GUAN, Y.Y.; HONG, Y.H.; CHEN, X.; ZHOU, S. Induction of propranolol metabolism by *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in rats. **Curr. Drug Metab.**, v.7, p.577-87, 2006.
- ZHOU, L.J.; ZHU, X.Z. Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.293, p.982-8, 2000.
- ZHU, W.; CHEN, G.; HU, L.; LUO, X.; GUI, C.; LUO, C.; PUAH, C.M.; CHEN, K.; JIANG, H. QSAR analyses on ginkgolides and their analogues using CoMFA, CoMSIA, and HQSAR. **Bio. Med. Chem.**, v.13, p.313-22, 2005.

4. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O câncer é umas das doenças mais prevalentes no mundo contemporâneo. O estilo de vida industrializado da sociedade humana atual têm favorecido o crescimento nas taxas de morbidade e mortalidade relacionadas às neoplasias (Parkin, 2005). A elevada taxa de mortalidade está diretamente associada a um diagnóstico tardio e dificuldades no tratamento dessa doença crônico-degenerativa. Por isso, a prevenção da carcinogênese com a utilização de compostos químicos é a melhor estratégia indicada para os humanos. Diversos compostos naturais capazes de prevenir ou auxiliar o tratamento da carcinogênese ainda não foram estudados e nem mesmo identificados na natureza.

O extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) tem demonstrado ação quimioprotetora em diversos trabalhos com células tumorais e modelos experimentais, inclusive em um trabalho previamente realizado pelo nosso grupo de pesquisa com ratos iniciados pela DEN. No trabalho de doutorado atual investigamos pioneiramente a atividade quimiopreventiva do EGb sobre a carcinogênese mamária em ratos Sprague-Dawley.

5. OBJETIVOS GERAIS

O presente projeto teve como objetivo avaliar a ação moduladora da *Ginkgo biloba* sobre o processo de carcinogênese química na mama de ratos. Assim, dois trabalhos independentes foram desenhados com objetivos e metodologias específicos:

- **Artigo 1.** Avaliar os efeitos quimioprotetores do extrato de *Ginkgo biloba* sobre a carcinogênese mamária induzida pela 7,12-dimetilbenz(o)antraceno (DMBA) em ratas da linhagem Sprague-Dawley.
- **Artigo 2.** Avaliar os possíveis efeitos terapêuticos e sinérgicos obtidos pela interação entre o extrato de *Ginkgo biloba* e o tamoxifeno em modelo experimental de carcinogênese mamária induzida pela 7,12-dimetilbenz(o)antraceno (DMBA) em ratas da linhagem Sprague-Dawley.

ARTIGO 1

“Efeitos da *Ginkgo biloba* sobre a carcinogênese mamária induzida pela DMBA em ratas Sprague-Dawley.”

Marcos C. Dias (1), Kelly S. Furtado (1), Luis F. Barbisan (2)*.

(1) Universidade Estadual Paulista-UNESP, Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Patologia, Botucatu, SP, 18618-970, Brasil; (2) Universidade Estadual Paulista-UNESP, Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Morfologia, Botucatu, SP, 18618-970, Brasil.

Sub-título: Ginkgo biloba e câncer de mama no rato

*Endereço para correspondência:

Luís Fernando Barbisan, Ph.D.

Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, 18618-970, SP, Brasil.

Telefone/Fax: +55 14 6811 6264

E-mail: barbisan@ibb.unesp.br

Revista sugerida: **Food and Chemical Toxicology**, ISSN: 0278-6915.

Resumo

O presente estudo teve como objetivo determinar a possível atividade quimioprotetora do extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) sobre o desenvolvimento de tumores mamários induzidos pela 7,12-dimetilbenz(o)antraceno (DMBA) em ratas da linhagem Sprague-Dawley (SD). Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, sendo dois grupos controles (positivo e negativo) e dois grupos-teste. As fêmeas SD foram iniciados aos 51 dias de idade com dose única i.g. de 60 mg/kg p.c. de DMBA ou receberam dose única de óleo de girassol (5m/kg p.c. veículo da DMBA). Então os animais receberam ou não a substância teste (EGb) misturada à ração basal nas concentrações de 0,1 e 0,2%. Ao final da 18ª semana, todos os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e coletados ovários, útero e tumores mamários. As amostras foram fixadas em formalina tamponada 10% e processadas para análise histopatológica. Amostras tumorais foram coletadas e armazenados a -70C para análise da expressão protéica apoptóticas bax, bcl-2 e do receptor de estrógeno alfa (RE- α). O tratamento com EGb por 18 semanas não modificou a latência, incidência, multiplicidade, tipo histológico nem foi capaz de impedir o crescimento e malignidade das neoplasias mamárias induzidas pela DMBA. Além disso, o tratamento com EGb não alterou a expressão protéica de bax, bcl-2 e do RE- α nas amostras tumorais. Esses resultados indicam que o EGb não altera o processo de carcinogênese mamária induzida pela DMBA em ratas SD, nas condições experimentais empregadas.

Palavras-chave: Neoplasias, Ginkgo biloba, ratas Sprague-Dawley, quimioprevenção.

Introdução

O extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) é um dos produtos naturais mais vendidos e consumidos em todo mundo (Jacobs and Browner, 2000). O EGb é uma mistura complexa de mais de 300 elementos químicos como flavonóides, lactonas diterpênicas, ginkgolideos, sesquiterpenos entre outros (Smith et al., 1996; Jacobs and Browner, 2000). Os componentes do EGb apresentam atividades antioxidantes, antiproliferativas, antiangiogênicas, antiestrogênicas e moduladoras da expressão de genes controladores do ciclo celular e apoptose (De Feudis et al., 2003; Sagar et al., 2006; Oh and Chung, 2004, 2006; Masteikova et al., 2007; Dias et al., 2008). A *Ginkgo biloba* têm sido utilizada no tratamento e prevenção de distúrbios circulatórios do cérebro e sistema arterial periférico, memória, Alzheimer entre outros (Jacobs et al., 2000; Sierpina et al., 2003; Dekosky et al., 2008). Além disso, existe uma grande expectativa da utilização do EGb na prevenção e tratamento do câncer, mas o corpo de evidências científicas ainda é insuficiente para garantia de sua eficácia (De Feudis et al., 2003).

Estudos epidemiológicos com relação ao potencial benéfico do EGb na prevenção do câncer são controversos, embora eficácia anti-tumoral tenha sido verificada em vários estudos *in vitro* e *in vivo*. Efeitos terapêuticos foram observados em pacientes com tumores malignos do trato digestório superior (faringe, esôfago e estômago) com a administração oral de extrato polissacarídeo da casca da *Ginkgo biloba* (Chen et al., 2002; Xu et al., 2003). Ye et al. (2007) observaram redução no risco de desenvolvimento de neoplasia não-mucínica de ovário em pacientes que fizeram o uso regular de EGb como suplemento. Biggs et al. (2010) observaram redução do risco de desenvolvimento de neoplasias de próstata mas aumento no risco de desenvolvimento de neoplasias de mama e cólon em pacientes que fizeram uso regular e prolongado de EGb.

O EGb e alguns de seus componentes isolados foram capazes de inibir de maneira dose-dependente a proliferação de células tumorais humanas como a MDA-MB-231 de adenocarcinoma mamário (Pretner et al., 2006), HL-60 de leucemia mielóide (Xu et al., 2004), OVCA429, 433 e 420 de adenocarcinoma ovariano não mucinoso (Ye et al., 2007), PaCa-2 and Panc-1 de adenocarcinoma de pâncreas (Zang et al., 2008), SMMC-7721 de hepatoma humano (Chen et al., 2002) e SCC-1483, 25 e SCC-QLL1 de carcinoma oral (Kim et al., 2005).

Em modelos experimentais de carcinogênese química em roedores, o tratamento oral com EGb reduziu a formação de focos de criptas aberrantes induzidos pela azoximetano no cólon de ratos F344 (Suzuki et al., 2004), a multiplicidade de tumores gástricos induzidos pelo benzo(a)pireno em camundongos Swiss (Jiang et al., 2009), a formação de focos de hepatócitos alterados com expressão da glutathione S-transferase forma placentária induzidos pela dietilnitrosamina em ratos Wistar (Dias et al., 2008) e a incidência de lesões pré-neoplásicas no estômago de ratos tratados com a N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Jiang et al., 2009).

O câncer é umas das doenças mais prevalentes no mundo contemporâneo e responsável por altas taxas de morbidade/mortalidade entre as doenças crônico-degenerativas (Parkin *et al.*, 2005). Atualmente, a frequência de novos casos de câncer de mama tem aumentado exponencialmente em mulheres mais jovens em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Jemal et al., 2002; Parkin et al., 2005). Esse fato, pode estar relacionado a fatores genéticos e ao aumento da exposição contínua das mulheres a múltiplos fatores de risco como idade, estilo de vida (tabagismo), hábitos alimentares, história familiar e reprodutiva (menarca precoce, nuliparidade, anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal), e exposição accidental ou ocupacional a contaminantes ambientais (Wolf and Weston, 1997;

Snedeker, 2001). Por outro lado, existem diversos compostos químicos naturais com potencial para prevenir, retardar ou até mesmo auxiliar no tratamento dessa doença (Kelloff et al 2006; De Flora and Ferguson, 2005). Considerando-se que muitos desses compostos naturais ainda não foram avaliados, fortalece-se a importância de se investigar o potencial quimiopreventivo do extrato de *Ginkgo biloba* na prevenção do câncer de mama visto ser um dos produtos herbais mais consumidos no mundo (Oh and Chung, 2006; Jacobs and Browner, 2000).

O presente estudo investigou o potencial quimiopreventivo do EGb sobre a carcinogênese mamária induzida quimicamente pela 7,12-dimetilbenz(o)antraceno (DMBA) em modelo experimental de média duração em ratas da linhagem Sprague-Dawley.

Material e Métodos

Animais e ambiente de experimentação

Ratas da linhagem Sprague-Dawley com 21 dias de idade foram adquiridas do Centro de Investigações Biológicas (CEMIB) (UNICAMP, Campinas-SP) e mantidas no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Durante toda a fase de adaptação e experimentação foram controladas as condições ambientais do biotério como temperatura (22 ± 2 °C), umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$), período de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão contínua do ar.

Todos os animais receberam ração comercial *ad libitum* (Nuvilab CR1 – Nuvital, Pr, Brasil) e água filtrada. Os animais foram pesados e passaram por avaliações clínicas semanais, e o consumo de ração e água avaliados três vezes por semana ao longo do experimento.

*Preparo da Ração comercial com extrato de *Ginkgo biloba**

O extrato hidroalcoólico liofilizado de *Ginkgo biloba* (EGb) utilizado nesse trabalho foi fornecido gentilmente pela empresa Centroflora do Brasil S.A., Botucatu-SP, Brasil. O controle de qualidade do extrato foi realizado por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) para assegurar a presença de cerca de 24% de flavonóides (ginkgo-flavona) e 6% de terpenóides (ginkgolídeos e bilobalídeos) (Dias et al., 2009). O extrato em pó foi misturado à ração comercial nas concentrações finais de 0,1 e 0,2%, baseado em estudos experimentais de quimioprevenção em ratos (Suzuki et al., 2004; Dias et al., 2008).

Delineamento Experimental e Processamento de Amostras Tumorais.

Todos os procedimentos realizados nesse trabalho estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do IBB-UNESP (Protocolo nº 51/08-CEEA).

Fêmeas da linhagem Sprague-Dawley com 51 dias de idade foram divididas aleatoriamente em quatro grupos experimentais. Os animais dos grupos G1 a G3 (n=20/grupo) foram iniciados com dose única de 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno (DMBA, 60 mg/kg p.c., i.g.) e os animais do grupo G4 (n=5) receberam apenas o veículo (óleo de girassol, 5 ml/kg, i.g.). Então, os animais dos grupos G2, G3 e G4 receberam EGb acrescido à ração basal nas concentrações de 0,1 e 0,2% e no grupo G1 apenas ração basal durante 18 semanas.

Durante todo o período experimental, as fêmeas foram examinadas semanalmente para a detecção de massas tumorais nas cadeias mamárias, sendo registrado o dia de aparecimento e sua localização anatômica. Após a eutanásia em câmara de CO₂, foram coletadas amostras das cadeias e tumores mamários, ovários e útero. Essas amostras foram fixadas em formalina tamponada 10%, processadas e embebidas em parafina, cortadas a 5 µm de espessura e coradas por hematoxilina-eosina (HE). Fragmentos dos tumores mamários com 300 mg foram coletados e armazenados a -70°C para a análise semi-quantitativa das proteínas apoptóticas bax, bcl-2 e do receptor de estrógeno-α (RE-α).

Durante a necropsia dos animais foi calculado volume tumoral pelo método de determinação do volume de elipses (*largura x altura x profundidade x 0,75 x 3,141592*) (Chatterjee et al., 2010). Os tumores mamários induzidos pela DMBA foram agrupados em três categorias levando-se em consideração seu volume médio em cada um dos

grupos experimentais: pequeno (0,37 a 5,30 cm³), médio (5,31 a 20 cm³) ou grande (20,01 a 146,57 cm³). Os valores foram definidos de acordo com a mediana dos tumores mamários. O diagnóstico e características histopatológicas das neoplasias mamárias foram analisados em cortes histológicos corados por HE, com base em critérios histopatológicos pré-estabelecidos (Costa et. al., 2002; Russo and Russo, 2002).

Western Blot

A técnica de *Western Blot* foi realizada com algumas adaptações seguindo o protocolo estabelecido por Zhou et al (2010). As amostras tumorais foram homogeneizadas em tampão de extração (Tris-HCl 500mM pH 7,6; NaCl 0,2 M; Triton X-100 1%; CaCl₂ 10mM; inibidor de protease 2μl/100ml) na proporção de 30 mg de tecido/100μl de tampão e mantidos a 4 °C durante duas horas. Após este procedimento, o material extraído foi centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado para dosagem de proteínas totais, realizada pelo método de Bradford em um leitor de Elisa a 495 nm (Spectra Max 190).

Em seguida, as amostras foram fervidas a 95 °C por 1 minuto e submetidas à eletroforese (100V) no gel de poliacrilamida (12 - 15%) em torno de 2h sob condições redutoras (betamercaptoetanol). Após a corrida, foi montado o sanduíche (esponja, 2 folhas de papel filtro grosso Whatman, gel, membrana de nitrocelulose, 2 folhas de papel filtro grosso Whatman, esponja) em uma cuba contendo tampão de transferência (Tris, glicina, metanol 20% e SDS 10%). Então foi realizada a transferência a 4 °C durante 1 hora e 30 minutos a 300 mA. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1h com leite desnatado (5%) e albumina bovina (3%) em TBS-T (Tris 0,05 M, NaCl a 0,15 M, pH 7.2, acrescido de Tween 20 a 1%), incubada com anticorpo primário específico anti-bax (1:200), anti-bcl-2 (1:200) e RE-α (1:200) e β-actina (1:500) (Santa Cruz

Biotechnology, EUA) durante 16 h, lavada com TBS-T (5x de 20 min.), incubada por 1h com anticorpo secundário (1:1000 anti-IgG de coelho, camundongo ou cabra, Santa Cruz Biotechnology, EUA) marcado com peroxidase e revelada com 3,3-diaminobenzidina (DAB). O peso molecular relativo das bandas foi determinado de acordo com o padrão de peso molecular introduzido durante a eletroforese (Precision plus-protein Kaleidoscope Standards, BIORAD, EUA). As análises semi-quantitativas relativas (em relação ao grupo G1) das bandas foram realizadas por densitometria através do software ImageMaster VDSTM (©2010 GE Healthcare, Alemanha), segundo protocolo operacional padrão do Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP. Os dados de densidade ótica (IOD) das bandas foram normalizados através da divisão do IOD da amostra pelo IOD da β -actina na mesma amostra para cada um dos parâmetros avaliados.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Sigma Stat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Os dados de peso corpóreo e ganho de peso, consumo de ração e água, multiplicidade de tumores e análises da expressão de proteínas por *western blot* foram analisados pelos testes ANOVA ou Kruskal-Wallis. Incidência de tipos, padrões e características histológicas das neoplasias mamárias foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fischer. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Resultados

Achados Gerais

Sete animais morreram durante o período experimental em decorrência da agressividade das neoplasias mamárias malignas induzidas pela DMBA (03 do grupo G1, 02 do grupo G2 e 03 do grupo G3, Figura 1). Esses animais não foram necropsiados em decorrência do avançado estado de autólise e de canibalismo pelos outros animais da caixa.

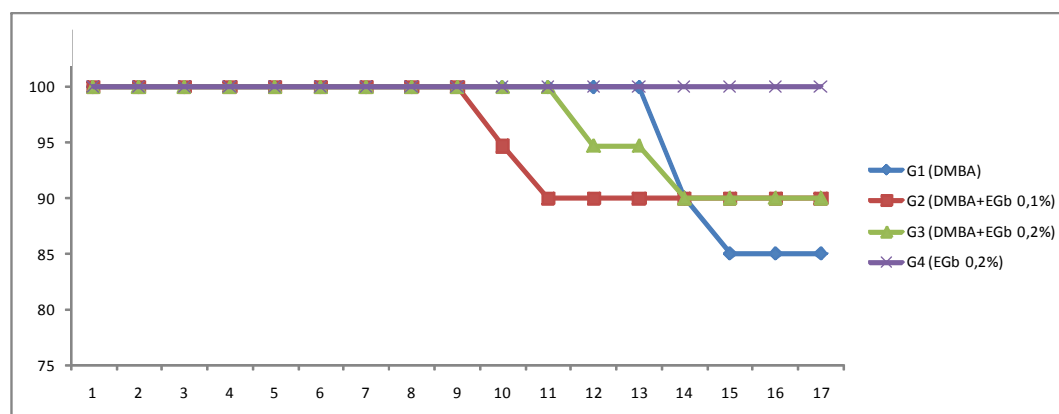


Figura 1 - Gráfico de sobrevivência dos animais nos diferentes grupos experimentais ao longo das 18 semanas do estudo. DMBA= 7,12-dimetilbenz(o)antraceno (dose única de 60 mg/kg p.c., i.g.), EGb= extrato de *Ginkgo biloba* (0,1 e 0,2 % na ração comercial).

Todos os grupos experimentais apresentaram ganho de peso corpóreo progressivo durante o período experimental, sem diferença estatística entre eles (ver Anexo 1). Não houve diferença estatística em relação aos pesos corpóreos inicial, final e ganho de peso entre os grupos experimentais. O consumo médio de água e ração e os pesos relativos dos ovários e útero foram semelhantes entre os diferentes grupos experimentais (ver Anexo 2).

A Figura 2 apresenta o número cumulativo de tumores palpáveis detectados ao longo das 18 semanas do estudo e mais os tumores pequenos detectados durante necropsia. Os tumores mamários começaram a aparecer nos animais iniciados com a DMBA em torno da 5ª semana do estudo (Tabela 1). Esse número aumentou progressivamente no decorrer do estudo e, nas quatro últimas semanas, houve um aumento significativo de tumores, mas semelhante nos três grupos experimentais. Os animais tratados apenas com EGb a 0,2% não desenvolveram neoplasias mamárias durante o período experimental. O tratamento com EGb (0,1 e 0,2%) não alterou a latência, incidência ou multiplicidade de tumores mamários detectados nesse período (Tabela 1) ($G1=G2=G3$, $p > 0,05$).

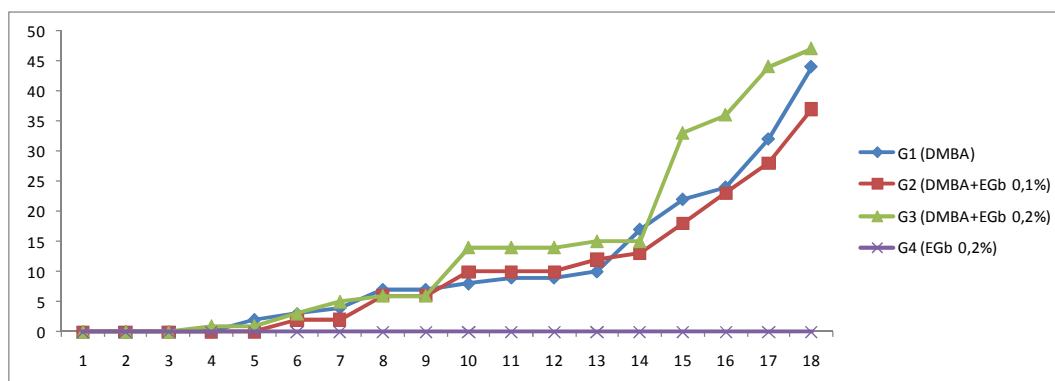


Figura 2 - Gráfico que representa o número cumulativo e a semana de detecção de tumores mamários palpáveis nos diferentes grupos experimentais ao longo do estudo mais os tumores identificados na necropsia (18ª. semana). DMBA= 7,12-dimetilbenz(o)antraceno (dose única de 60 mg/kg p.c., i.g.), EGb= extrato de *Ginkgo biloba* (0,1 e 0,2 % na ração comercial).

Tabela 1 – Dados de latência, incidência, multiplicidade e tipos histológicos das neoplasias mamárias induzidas pela DMBA nos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos Experimentais ³		
	DMBA (G1)	DMBA+EGb 0,1% (G2)	DMBA+EGb 0,2% (G3)
Número de animais	17	18	17
Latência Tumoral (dias) ¹	84.00 ± 27.26	87.50 ± 25.23	80.50 ± 29.28
Primeiro Tumor (dia)	35°	42°	28°
Incidência Tumoral (%)	16/17 (94)	15/18 (83)	17/17 (100)
Multiplicidade ^{1,2}	2,75 ± 1,83	2,46 ± 1,66	2,88 ± 1,76
Número de Tumores	44	37	49
Tipo histológico (%):			
Adenocarcinoma papilar	8 (40)	12 (40)	23 (49)
Adenocarcinoma papilar/ cribiforme	0 (0)	2 (6)	0 (0)
Adenocarcinoma tubular	8 (40)	5 (16)	19 (40)
Adenocarcinoma tubular/ cribiforme	0 (0)	2 (6)	2 (4)
Adenocarcinoma tubular/papilar	4 (20)	5 (16)	3 (6)

¹Dados expressos na forma de média ± SD; ²Número médio de tumores em animais com neoplasia;

³DMBA= 7,12-dimetilbenz(o)antraceno (dose única de 60 mg/kg p.c., i.g.), EGb= extrato de *Ginkgo biloba* (0,1 e 0,2 % na ração comercial).

O volume médio (cm³) dos tumores mamários nas três faixas de tamanho analisadas (pequeno, médio e grande) não diferiu entre os três grupos experimentais, mesmo nos tratados com EGb (G1=G2=G3, p> 0,05) (Figura 3). Um grande desvio padrão foi observado nos tumores entre os animais que receberam tratamentos semelhantes, até mesmo nos tumores de um mesmo animal.

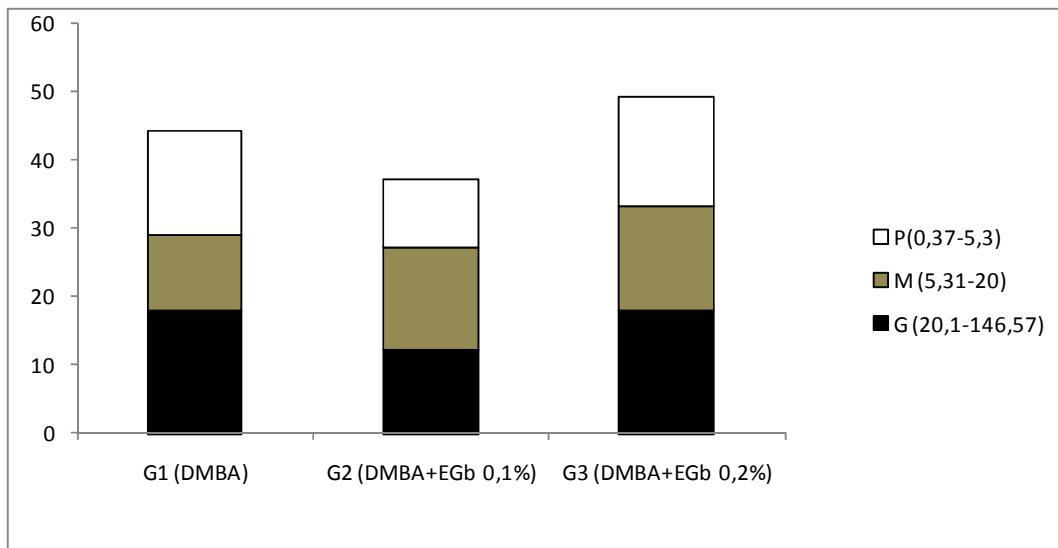


Figura 3 - Gráfico que representa o volume médio dos tumores mamários nos diferentes grupos experimentais ao final da 18ª semana do estudo. Os tumores foram classificados como pequeno (0,37-5,3 cm³), médio (5,31-20 cm³) ou grande (20,1-146,57 cm³). DMBA= 7,12-dimetilbenz(o)antraceno (dose única de 80 mg/kg p.c., i.g.), EGb= extrato de *Ginkgo biloba* (0,1 e 0,2 % na ração comercial).

A maioria dos tumores mamários induzidos pela DMBA foram diagnosticados como adenocarcinomas invasivos com padrão histológico papilífero ou tubular (Tabela 1, Figura 4). O tratamento com EGb não interferiu na evolução morfológica dos tumores induzidos pela DMBA, sendo os tumores mamários de padrão papilífero os mais frequentes nos diferentes grupos iniciados com a DMBA (40%, 46% e 49%, G1, G2 e G3, respectivamente).

A Tabela 2 apresenta os principais parâmetros morfológicos analisados nos cortes histológicos dos tumores mamários corados pela HE. Os achados histológicos foram semelhantes entre os grupos experimentais para cada parâmetro analisado ($G1=G2=G3$; $p > 0.05$). O infiltrado inflamatório (linfócitos, plasmócitos, e em menor proporção neutrófilos) foi classificado como leve a moderado na maioria dos adenocarcinomas nos três grupos experimentais. Uma grande proporção dos tumores não mostrou a presença de necrose intratumoral (50%; 65,4%, 63,8% para os grupos G1, G2 e G3, respectivamente). Quando presente e, especialmente de maneira extensa, a necrose foi associada ao padrão comedo (Figura 4-D).

A grande maioria dos adenocarcinomas apresentou menos que 10 mitoses/campo (85%, 76,9% e 74,5% nos grupos G1, G2 e G3, respectivamente). Em relação à atividade apoptótica, os adenocarcinomas com menos de 6 células apoptóticas/campo predominaram em todos os tratamentos experimentais (75%, 88,5% e 76,6% nos grupos G1, G2 e G3, respectivamente). A reatividade estromal foi predominantemente classificada como leve nos adenocarcinomas em todos os grupos experimentais (45%, 69,2%, 48,9% nos grupos G1, G2 e G3, respectivamente).

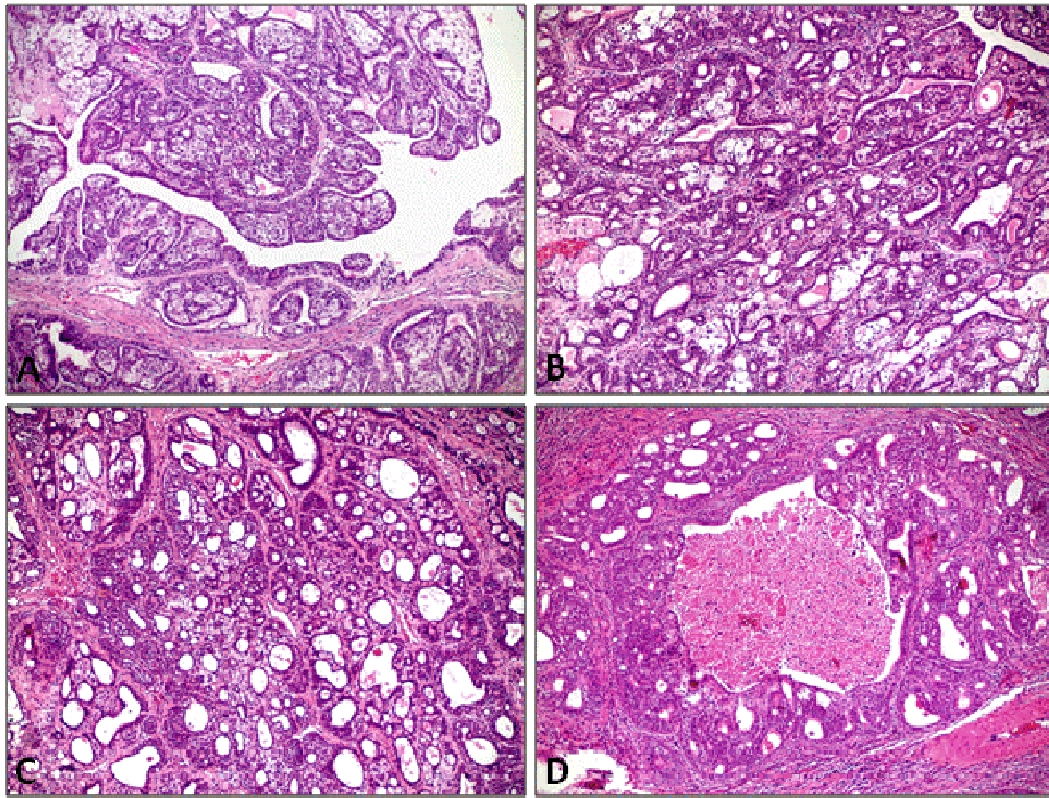


Figura 4 – Padrão histológico dos tumores mamários induzidos pela DMBA mostrando: (A) adenocarcinoma papilar (ou papilífero); (B) adenocarcinoma tubular; (C) adenocarcinoma tubular cribiforme; (D) adenocarcinoma tubular comedo. Coloração histológica de HE, objetiva de 10x.

Análise de Expressão das Proteínas bax, bcl-2 e RE- α

A Figura 5 indica a variação da expressão protéica de bax, bcl-2 e RE- α analisados pela técnica semi-quantitativa de *Western blot*. Os anticorpos específicos para bax e bcl-2 apresentaram reatividade cruzada provavelmente porque ambas são proteínas da grande família Bcl. As bandas corretas foram detectadas com base no peso molecular (em kDa) obtido pela comparação com o padrão caleidoscópico (não mostrado). A banda referente à proteína estrutural constitutiva β -actina foi utilizada para a normalização dos dados em cada um dos grupos experimentais.

Tabela 2 - Análise dos parâmetros histológicos (dos tumores mamários induzidos pela DMBA nos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos Experimentais ¹		
	DMBA	DMBA+EGb 0,1%	DMBA+EGb 0,2%
	(G1)	(G2)	(G3)
Número de tumores	20	26	47
Infiltrado de Mastócitos			
0	4/20 (20)	4/26 (15)	8/47 (17)
1	5/20 (25)	7/26 (27)	17/47 (36)
2	9/20 (45)	15/26 (58)	17/47 (36)
3	2/20 (10)	0/26 (0)	5/47 (10)
Infiltrado Inflamatório ²			
0	0/20 (0)	1/26 (4)	1/47 (2)
1	6/20 (30)	10/26 (39)	15/47 (32)
2	11/20 (55)	11/26 (42)	25/47 (53)
3	3/20 (15)	4/26 (15)	6/47 (13)
Necrose			
Ausente	10/20 (50)	17/26 (65)	30/47 (64)
Focal	6/20 (30)	7/26 (27)	11/47 (23)
Difusa	4/20 (20)	2/26 (8)	6/47 (13)
Secreção			
Ausente	6/20 (30)	8/26 (31)	10/47 (21)
Focal	10/20 (50)	11/26 (42)	31/47 (66)
Difusa	4/20 (20)	7/26 (27)	6/47 (13)

Continuação da Tabela 2

Reação Estromal

0	6/20 (30)	4/26 (15)	17/47 (36)
1	9/20 (45)	18/26 (69)	23/47 (49)
2	5/20 (25)	4/26 (15)	6/47 (13)
3	0/20 (0)	0/26 (0)	1/47 (2)

Mitose/ 10 campos

≤ 3	13/20 (65)	11/26 (42)	17/47 (36)
4-6	2/20 (10)	6/26 (23)	9/47 (19)
7-9	2/20 (10)	2/26 (8)	7/47 (15)
10-19	3/20 (15)	5/26 (19)	8/47 (17)
≥ 20	0/20 (0)	2/26 (8)	3/47 (6)

Apoptose/ 10 campos

1-3	5/20 (25)	10/26 (38)	21/47 (45)
4-9	9/20 (45)	7/26 (27)	15/47 (32)
≥ 20	2/20 (10)	1/26 (4)	6/47 (13)

¹DMBA= 7,12-dimetilbenz(o)antraceno (dose única de 60 mg/kg p.c., i.g.), EGb= extrato de *Ginkgo biloba* (0,1 e 0,2 % na ração comercial). ² Dados expressos em porcentagem.

O gráfico da Figura 5 representa o valor numérico e a porcentagem de aumento ou redução de IOD normalizados dos grupos G2 e G3 em relação ao grupo controle (G1). O tratamento com EGb não modificou a expressão protéica de bax, bcl-2 e RE- α nos tumores mamários induzidos pela DMBA (G2=G3=G1, $p>0,05$).

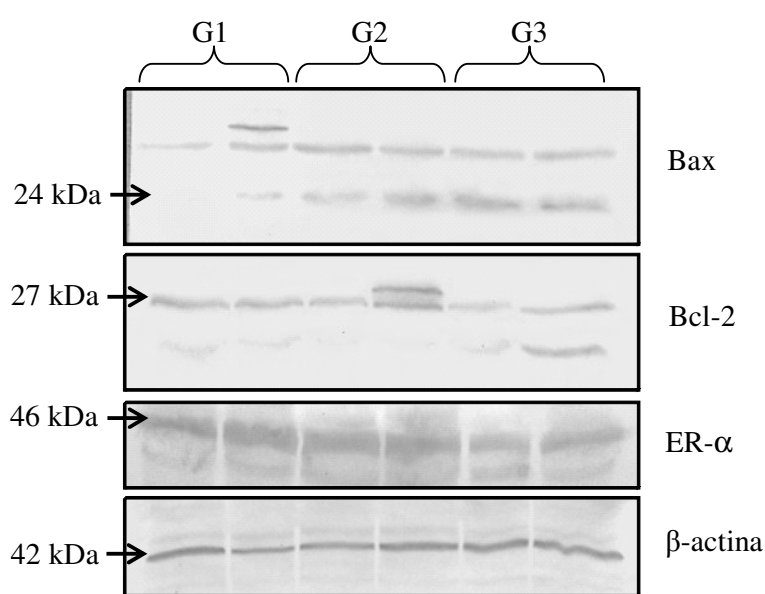
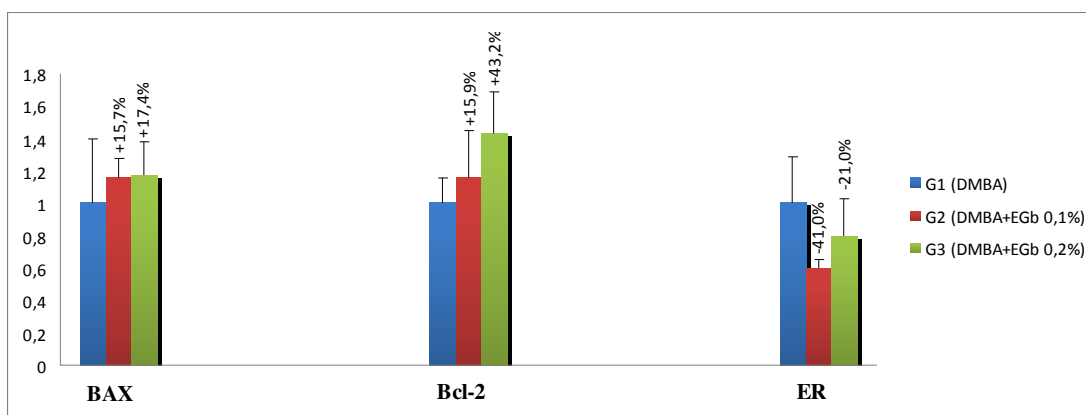


Figura 5 – Variação na expressão protéica de Bax, bcl-2 e receptor de estrógeno (ER) em relação ao grupo controle positivo (G1), com valor estipulado em 1, normalizados pela proteína estrutural β -actina. O gráfico representa o valor numérico e a porcentagem de aumento ou redução na expressão dos marcadores em cada um dos grupos experimentais ao final da 18ª semana do estudo. A imagem representa as bandas (setas) referentes à expressão protéica nos diferentes grupos experimentais.

Discussão

Os resultados do presente estudo indicam que o tratamento com extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) não retardou o aparecimento e desenvolvimento de neoplasias mamárias induzidas pela 7,12-dimetilbenz(o)antraceno (DMBA) em ratas da linhagem Sprague-Dawley (SD). Modelos experimentais *in vivo* que mimetizem a doença humana são necessários para elucidar a natureza do processo de carcinogênese e a influência de fatores endógenos e externos para o desenvolvimento neoplásico (Costa et al., 2002). As neoplasias mamárias induzidas pela DMBA ou N-metil-N-nitrosourea (MNU) em ratas da linhagem SD apresentam padrões e comportamentos biológicos semelhantes às neoplasias mamárias humanas (Russo and Russo, 2000; Mehta, 2000). Nesse contexto, o modelo experimental de neoplasias mamárias induzidas pela administração da DMBA em ratas SD é uma ferramenta útil para estudos de prevenção da carcinogênese mamária (Boone et al., 1992; Mehta, 2000).

A ingestão média estimada de EGb pelas fêmeas SD, durante as 18 semanas do experimento, foi em torno de 70 mg e 150 mg/Kg/dia para as concentrações de 0,1 e 0,2%, respectivamente. Comparada com a dose clínica de 180-220 mg/dia ou 2,85 mg/kg/dia calculada para um indivíduo de 70kg (Singh et al., 2008; Mahadevan and Park, 2008), a dose estimada diária das fêmeas SD foi em torno de 25 (0,1%) e 50 (0,2%) vezes maior que a recomendada para o homem. As concentrações de EGb 0,1% e 0,2% foi escolhida com base em relatos anteriores de efeitos benéficos do EGb na carcinogênese química em outros modelos experimentais com roedores (Suzuki et al., 2004; Dias et al., 2008). Assim, mesmo em altas doses comparada com a da clínica, o EGb não foi capaz de modular o aparecimento e crescimento de neoplasias mamárias induzidas pela DMBA.

Por estimativa média, as fêmeas consumiram cerca de 16,8 (0,1%) e 32 (0,2%) mg/kg/dia de flavonóides presentes no EGb, baseado na concentração de ~24% flavonóides no extrato. Os flavonóides são componentes importantes da dieta humana embora não sejam considerados nutrientes, ou seja, substâncias sem valor nutritivo (Havasteen, 2002; Brownson et al., 2002). Os flavonóides existem como agliconas, glicosídeos ou como outras estruturas que contenham flavonóides, como as flavolignanas (Bravo, 1998; Havasteen, 2002; Brownson et al., 2002). Embora esses compostos apresentem atividade antioxidante importante para a prevenção de doenças, alguns estudos indicam que flavonóides em doses elevadas podem apresentar ação pró-oxidante com ação deletéria para as células (Decker, 1997; Galati et al., 2002). O EGb utilizado neste estudo possui como principais flavonóis glicosilados a quercitina e kampferol (Dias et al., 2008). Estudos experimentais indicam que a ingestão de quercetina nas concentrações de 2,5 ou 20 g por kg de ração (0,25 e 20%, respectivamente) reduziu a latência tumoral em fêmeas iniciadas com cancerígenos químicos, indicando potencial carcinogênico, principalmente em tumores mamários estrógenos positivos (Pereira et al., 1996; Singh et al., 2010). Nesse estudo, o EGb não reduziu significativamente o tempo de latência nem a incidência e multiplicidade dos tumores mamários, indicando ausência de efeito carcinogênico desse extrato, apesar de o mesmo conter grandes concentrações de flavonóides.

Nesse estudo, realizamos uma análise histopatológica detalhada dos tumores mamários induzidos pela DMBA. Essa análise, adaptada da classificação histopatológica de tumores humanos, é uma ferramenta útil para o diagnóstico e graduação da agressividade dos tumores mamários induzidos quimicamente (Costa et al., 2002). A maioria das neoplasias induzidas pela DMBA foi diagnosticada como invasiva e de origem epitelial. De fato, outros trabalhos da literatura têm demonstrado

resultados semelhantes em modelos experimentais com roedores e DMBA com incidência superior a 90% de adenocarcinomas mamários (Costa et al., 2002; Russo and Russo, 1996).

O extrato de *Ginkgo biloba* apresenta um efeito bifásico podendo ser agonista e/ou antagonista dos estrógenos endógenos como o E₂, dependendo da concentração dos estrógenos e da dose de EGb utilizada (10-1000 µg/ml) em ensaios de proliferação com células MCF-7 (Oh and Chung, 2004; Oh and Chung, 2006). O EGb exerce efeitos anti-estrogênicos diretos através da competição com os estrógenos endógenos pelos receptores de estrógenos- α e β mas induzindo uma resposta pleiotrópica fraca estrógeno-dependente na célula e indiretos pela indução da metabolização e inibição da biosíntese de E₂ resultando em uma depleção sérica desse hormônio (Oh and Chung, 2006). Esses efeitos detectados *in vitro* se devem principalmente à presença de fitoestrógenos como os flavonóides kaempferol, quercetina, e derivados de isoramnetina em sua composição (Oh et al. 2004). A depleção dos estrógenos endógenos (E₂) também ocorre pela indução de feedback negativo pelos fitoestrógenos presentes no EGb (Oh e Chung, 2006). Apesar da descrição completa dos efeitos anti-estrogênicos do EGb *in vitro*, efeitos semelhantes na prevenção da carcinogênese mamária não foram detectados em nosso trabalho *in vivo*.

O estrógeno estimula o crescimento e proliferação das células além de induzir a expressão genética de c-fos, erbB2, receptor de estrógenos (REs), catepsina D, pS2 e receptor de progesterona (Oh and Chung, 2004). Em nosso estudo, analisamos a expressão protéica de RE- α para identificar uma possível atividade anti-estrogênica indireta do EGb. Entretanto, nas condições experimentais empregadas, o EGb não foi

capaz de bloquear os efeitos deletérios induzidos pelos estrógenos endógenos nos tumores mamários pelo bloqueio da expressão de RE- α .

A proteína anti-apoptótica bcl-2 está localizada na membrana externa mitocondrial, onde previne a apoptose por inibir a ativação dos membros da família pro-apoptótica Bax e Bak (Bishay et al., 2000; Lindsay et al. 2010). A interação entre essas proteínas é fundamental para a transdução dos sinais apoptóticos à mitocôndria, induzindo a permeabilização de sua membrana, liberação das proteínas do complexo citocromo oxidase no citoplasma e posterior clivagem/ativação dos fatores ativadores de caspases que induzem a célula à morte celular programada. O extrato de *Ginkgo biloba* pode exercer efeitos anti-carcinogênicos por modular a expressão de genes controladores do crescimento e proliferação celulares, como evidenciado em ensaios *in vitro*. Evidências de redução da expressão gênica e protéica dos controladores da apoptose bax e bcl-2 pelo EGb com efeito neuroprotetor foram observadas em camundongos (Mak et al, 2006). Em um trabalho publicado em 2010, Zhou et al. observaram efeitos antitumorais dos ácidos ginkgólicos (AGs) sobre células tumorais hepáticas humanas Hep-2 e atribuíram esse efeito a redução da relação bax/bcl-2 induzida pelos AGs. Entretanto, em nosso estudo, o EGb não apresentou propriedade indutora de apoptose via modulação da expressão de bcl-2 e/ou bax.

No modelo experimental utilizado nesse trabalho, a DMBA induziu tumores malignos de forma não sincronizada (heterogêneos quanto a latência, incidência, multiplicidade, volume e padrão histopatológico). Isso significa que a resposta animal ao cancerígeno foi individual, sendo que uns animais desenvolveram rapidamente múltiplos tumores e outros não desenvolveram nenhum tumor até o final do experimento. Por isso, a utilização de outros modelos experimentais de carcinogênese mamária mais sincronizados (Woditschka et al., 2009) poderiam detectar com maior

sensibilidade a atividade carcinogênica ou anti-carcinogênica do EGb, reduzindo essa variabilidade de resposta, típica de animais não-isogênicos (Festing, 1992).

Em conclusão, os resultados deste estudo indicam que o extrato de *Ginkgo biloba*, sob as condições experimentais utilizadas, não apresentou efeito quimiopreventivo contra a carcinogênese mamária em ratas da linhagem Sprague-Dawley.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da “Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo” (FAPESP) (processo nº 98/5985-5), do “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq) (processo nº47452/2008-0) e a empresa Centroflora do Brasil S.A., Botucatu-SP, Brasil, pelo fornecimento do EGb (cód. 500821).

Referências

- Arikawa, A.Y., Gallaher, D.D., 2008. Cruciferous vegetables reduce morphological markers of colon cancer risk in dimethylhydrazine-treated rats. *Journal of Nutrition* 138, 526–32.
- Biggs, M.L., Sorkin, B.C., Nahin, R.L., Kuller, L.H., Fitzpatrick, A.L., 2010. *Ginkgo biloba* and risk of cancer: secondary analysis of the ginkgo evaluation of memory (gem) study. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 19, 694-8.
- Bishay, K., Ory, K., Lebeau, J., Levalois, C., Olivier, M.F., Chevillard, S., 2000. DNA damage-related gene expression as biomarkers to assess cellular response after gamma irradiation of a human lymphoblastoid cell line. *Oncogene* 19, 916-23.

-
- Boone, C.W., Steele, V.E., Kelloff, G.J., 1992. Screening for chemopreventive (anticarcinogenic) compounds in rodents. *Mutation Research* 267, 251-5.
- Bravo, L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56, 317-33.
- Brownson, D.M., Azios, N.G., Fuqua, B.K., Dharmawardhane, S.F., Mabry, T.J., 2002. Flavonoid effects relevant to cancer. *Journal of Nutrition* 132, 3482S-9S.
- Chatterjee, M., Janarthan, M., Manivannan, R., Rana, A., Chatterjee, M., 2010. Combinatorial effect of fish oil (Maxepa) and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) in the chemoprevention of DMBA-induced mammary carcinogenesis in rats. *Chemico-Biological Interactions* 188, 102-10.
- Chen, Q., Yang, G.W., An, L.G., 2002. Apoptosis of hepatoma cells smmc-7721 induced by *Ginkgo biloba* seed polysaccharide. *World Journal of Gastroenterology* 8, 832-6.
- Chen, Q., Yang, G.W., An, L.G., 2002. Apoptosis of hepatoma cells SMMC-7721 induced by *Ginkgo biloba* seed polysaccharide. *World Journal of Gastroenterology* 8, 832-6.
- Costa, I., Solanas, M., Escrich, E., 2002. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12 dimethylbenz(alpha)anthracene in the rat: a comparative analysis with human breast tumors. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 126, 915-27.
- De feudis, F.V., Papadopoulos, V., Drieu, K., 2003. *Ginkgo biloba* extracts and cancer: a research area in its infancy. *Blackwell Publishing Foundation & Clinical Pharmacology* 17, 405-17.

-
- De Flora, S., Ferguson, L.R., 2005. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation Research* 591, 8-15.
- Decker, E.A., 1997. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition Reviews* 55, 396-8.
- Dekosky, S.T., Williamson, J.D., Fitzpatrick, A.L., Kronmal, R.A., Ives, D.G., Saxton, J.A., Lopez, O.L., Burke, G., Carlson, M.C., Fried, L.P., Kuller, L.H., Robbins, J.A., Tracy, R.P., Woolard, N.F., Dunn, L., Snitz, B.E., Nahin, R.L., Furberg, C.D., 2008. *Ginkgo biloba* for prevention of dementia: a randomized controlled trial. ginkgo evaluation of memory (gem) study investigators. *JAMA* 300, 2253-62.
- Dias, M.C., Rodrigues, M.A.M., Reimberg, M.C., Barbisan, L.F., 2008. Protective effects of *Ginkgo biloba* against rat liver carcinogenesis. *Chemico-Biological Interactions* 173, 32-42.
- Festing, M.F. 1992. The scope for improving the design of laboratory animal experiments. *Laboratory Animals* 26, 256-68.
- Galati, G., Sabzevari, O., Wilson, J.X., O'Brien, P.J., 2002. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 177, 91-104.
- Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96, 67-202.
- Jacobs, B.P., Browner, W.S., 2000. *Ginkgo biloba*: a living fossil. *American Journal of Medicine* 108, 341-2.
- Jemal, A., Thomas, A., Murray, T., Thun, M., 2002. Cancer statistics. *CA Cancer Journal for Clinicians* 52, 23-47.

-
- Jiang, X.Y., Qian, L.P., Zheng, X.J., Xia, Y.Y., Jiang, Y.B., Sun, D.A., 2009. Interventional effect of *Ginkgo biloba* extract on the progression of gastric precancerous lesions in rats. *Journal of Digestive Diseases* 10, 293-9.
- Kang, J.W., Kim, J.H., Song, K., Kim, S.H., Yoon, J.H., Kim, K.S., 2010. Kaempferol and quercetin, components of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761), induce caspase-3-dependent apoptosis in oral cavity cancer cells. *Phytotherapy Research* 24, S77-82.
- Kelloff, G.J., Lippman, S.M., Dannenberg, A.J., Sigman, C.C., Pearce, H.L., Reid, B.J., Szabo, E., Jordan, V.C., Spitz, M.R., Mills, G.B., Papadimitrakopoulou, V.A., Lotan, R., Aggarwal, B.B., Bresalier, R.S., Kim J., Arun, B., Lu, K.H., Thomas, M.E., Rhodes, H.E., Brewer, M.A., Follen, M., Shin, D.M., Parnes, H.L., Siegfried, J.M., Evans, A.A., Blot, W.J., Chow, W.H., Blount, P.L., Maley, C.C., Wang, K.K., Lam, S., Lee, J.J., Dubinett, S.M., Engstrom, P.F., Meyskens, F.L.Jr., O'Shaughnessy, J., Hawk, E.T., Levin, B., Nelson, W.G., Hong, W.K., 2006. Progress in chemoprevention drug development: the promise of molecular biomarkers for prevention of intraepithelial neoplasia and cancer--a plan to move forward. *Clinical Cancer Research* 12, 3661-97.
- Kim, K.S., Rhee, K.H., Yoon, J.H., Lee, J.G., Lee, J.H., Yoo, J.B., 2005. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) induces apoptosis by the activation of caspase-3 in oral cavity cancer cells. *Oral Oncology* 41, 383-9.
- Lindsay, J., Esposti, M.D., Gilmore, A.P., 2010. Bcl-2 proteins and mitochondria-Specificity in membrane targeting for death. *Biochimica et Biophysica Acta* [Epub ahead of print].
- Mahadevan, S., Park, Y., 2008. Multifaceted therapeutic benefits of *Ginkgo biloba* L.: chemistry, efficacy, safety, and uses. *Journal of Food Science* 73, R14-9.

-
- Mak, Y.T., Chan, W.Y., Lam, W.P., Yew, D.T., 2006. Immunohistological evidences of *Ginkgo biloba* extract altering Bax to Bcl-2 expression ratio in the hippocampus and motor cortex of senescence accelerated mice. *Microscopy Research Technique* 69, 601-5.
- Masteikova, R., Muselik, J., Bernatoniene, J., Bernatoniene, R., 2007. Antioxidative activity of ginkgo, echinacea, and ginseng tinctures. *Medicina* 43, 306-9.
- Mehta, R.G., 2000. Experimental basis for the prevention of breast cancer. *European Journal of Cancer* 36, 1275-82.
- Oh, S.M., Chung K.H., 2006. Antiestrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. *Journal of Steroid Biochemical and Molecular Biology* 100, 167-76.
- Oh, S.M., Chung, K.H., 2004. Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. *Life Science* 74, 1325–35.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer Journal for Clinicians* 55, 74-108.
- Pereira, M.A., Grubbs, C.J., Barnes, L.H., Li, H., Olson, G.R., Eto, I., Juliana, M., Whitaker, L.M., Kelloff, G.J., Steele, V.E., Lubet, R.A., 1996. Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary cancer in rats. *Carcinogenesis* 17, 1305-11.
- Pretner, E., Amri, H., Li, W., Brown, R., Lin, C.S., Makariou, E., De feudis, F.V., Drieu, K., Papadopoulos, V., 2006. Cancer-related overexpression of the peripheral-type benzodiazepine receptor and cytostatic anticancer effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761). *Anticancer Research* 26, 9-22.

-
- Russo, J., Russo, I.H., 1996. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Research and Treatment* 39, 7-20.
- Russo, J., Russo, I.H., 2000. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *Journal of Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5, 187-200,
- Sagar, S.M., Yance, D., Wong, R.K., 2006. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer - part 1. *Current Oncology* 13, 14-26.
- Sierpina, V.S., Wollschlaeger, B., Blumenthal, M., 2003. *Ginkgo biloba*. *American Family Physician* 68, 923-6.
- Singh, B., Kaur, P., Gopichand, Singh, R.D., Ahuja, P.S., 2008. Biology and chemistry of *Ginkgo biloba*. *Fitoterapia* 79, 401-18.
- Smith, P.F., MacLennan, K., Darlington, C.L., 1996. The neuroprotective properties of the *Ginkgo biloba* leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). *Journal of Ethnopharmacology* 50, 131-9.
- Snedeker, S.M., 2001. Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE, and Dieldrin. *Environmental and Health Perspective* 109, 35-47.
- Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., Sasaki, K., Yoshimura, T., Wada, K., Tanaka, T., 2004. Preventive effects of extract of leaves of ginkgo (*Ginkgo biloba*) and its component bilobalide on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Cancer Letters* 210, 159-69.
- Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., Sasaki, K., Yoshimura, T., Wada, K., Tanaka, T., 2004. Preventive effects of extract of leaves of ginkgo (*Ginkgo biloba*) and its component bilobalide on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Cancer Letters* 210, 159-69.
- Wolf, M.S., Weston, A., 1997. Breast cancer risk and environmental exposures. *Environmental and Health Perspective* 105, 891-896.

-
- Xu, A.H., Chen, H.S., Sun, B.C., Xiang, X.R., Chu, Y.F., Zhai, F., Jia, L.C., 2003. Therapeutic mechanism of *Ginkgo biloba* exocarp polysaccharides on gastric cancer. World Journal of Gastroenterology 9, 2424-7.
- Ye, B., Aponte, M., Dai, Y., Li, L., Ho, M.C., Vitonis, A., Edwards, D., Huang, T.N., Cramer, D.W., 2007. *Ginkgo biloba* and ovarian cancer prevention: epidemiological and biological evidence. Cancer Letters 251, 43-52.
- Woditschka, S., Haag, J.D., Sullivan, R., Gould, M.N., 2009. A short-term rat mammary carcinogenesis model for the prevention of hormonally responsive and nonresponsive in situ carcinomas. Cancer Prevention Research 2, 153-60.
- Zhang, Y., Chen, A.Y., Li, M., Chen, C., Yao, Q., 2008. *Ginkgo biloba* extract kaempferol inhibits cell proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. Journal of Surgical Research 148, 17-23.
- Zhang, Y., Chen, A.Y., Li, M., Chen, C., Yao, Q., 2008. *Ginkgo biloba* extract kaempferol inhibits cell proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. Journal of Surgical Research 148, 17-23.
- Zhou, C., Li, X., Du, W., Feng, Y., Kong, X., Li, Y., Xiao, L., Zhang, P., 2010. Antitumor effects of ginkgolic acid in human cancer cell occur via cell cycle arrest and decrease the Bcl-2/Bax ratio to induce apoptosis. Chemotherapy 56, 393-402.

ARTIGO 2

“Efeitos da *Ginkgo biloba* sobre as propriedades antitumorais do Tamoxifeno na carcinogênese mamária induzida quimicamente em ratas Sprague-Dawley.”

Marcos C. Dias (1), Kelly S. Furtado (1), Gilberto Uemura (2), Luis F. Barbisan (3)*.

(1) Universidade Estadual Paulista-UNESP, Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Patologia, Botucatu, SP, 18618-970, Brasil; (2) Universidade Estadual Paulista-UNESP, Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Botucatu, SP, 18618-970, Brasil; (3) Universidade Estadual Paulista-UNESP, Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Morfologia, Botucatu, SP, 18618-970, Brasil.

Sub-título: Ginkgo biloba, Tamoxifeno e câncer de mama no rato

*Endereço para correspondência:

Luís Fernando Barbisan, Ph.D.

Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, 18618-970, SP, Brasil.

Telefone/Fax: +55 14 6811 6264

E-mail: barbisan@ibb.unesp.br

Revista sugerida: **Chemico-Biological Interactions**, ISSN: 0009-2797

Resumo

O presente estudo foi desenhado para investigar a possível interação entre o Tamoxifeno (TAM) e o extrato de *Ginkgo biloba* EGb sobre a regressão de tumores mamários induzidos pela 7,12-dimetil-benz(o)antraceno (DMBA) em ratas da linhagem Sprague-Dawley (SD). As fêmeas SD com tumores mamários palpáveis foram divididas em quatro grupos experimentais e tratadas diariamente por um período de 28 dias: (G1) TAM (10 mg/kg p.c., i.g); (G2 e G3) TAM (10 mg/kg p.c., i.g) + EGb (50 ou 100 mg/Kg p.c., i.p.) ou (G4) EGb (100 mg/kg b.wt., i.p.). A eficácia terapêutica dos diferentes tratamentos foi avaliada pelas análises de redução no volume tumoral (cm³), análise morfométrica de áreas viva/em regressão/ em necrose (mm²) e análise imunoistoquímica de proliferação celular (PCNA), apoptose (caspase-3-clivada), receptor de estrógeno alfa (RE- α), p63 e β -catenina. O tratamento com TAM (G1) significativamente reduziu o volume tumoral (77,9%) e induziu a regressão histológica dos tumores mamários. Por outro lado, nos animais tratados apenas com EGb (G4) o volume do tumor mamário aumentou durante o período experimental (178.7%) e o índice de proliferação celular em área viva dos tumores foi maior quando comparado aos grupos tratados com TAM (G4>G1=G2=G3, p<0,001). Os índices de imunoexpressão de caspase-3, RE, p63 e β -catenina em áreas vivas tumorais não diferiram entre os tratamentos experimentais (G1=G2=G3=G4, p>0,05). Os resultados sugerem que o tratamento simultâneo com EGb não altera os efeitos terapêuticos do TAM em ratas SD. Além disso, o tratamento com EGb *per se* não foi capaz de reduzir o crescimento dos tumores mamários, indicando ausência de efeitos terapêuticos.

Palavras-Chave: carcinogênese química, planta medicinal, tumores mamários, roedor, quimioterapia, ginkgo.

Introdução

O câncer de mama é uma doença crônico-degenerativa de bases genéticas cujas taxas de morbidade e mortalidade tem aumentado nos últimos anos, principalmente em países industrializados [1-3]. Além de fatores genéticos como os genes BRCA1 e BRCA2, outros fatores influenciam o risco para o desenvolvimento de câncer de mama como os reprodutivos (idade avançada, gravidez tardia, ausência de gravidez), obesidade, alcoolismo, sedentarismo, hormônios exógenos (contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal), menopausa, hábitos alimentares e estilo de vida [1-3]. As modalidades terapêuticas habituais como ressecção cirúrgica parcial ou total (mastectomia), radioterapia, quimioterapia, anticorpos monoclonais e terapias endócrinas apresentam impacto negativo sobre a qualidade de vida dos pacientes [4].

As drogas antiestrogênicas são capazes de bloquear a resposta intracelular aos receptores de estrógenos (RE) de maneira direta (bloqueio de REs) ou indireta (inibidores de aromatase), melhorando o prognóstico e a qualidade de vida das pacientes com câncer de mama [5,6]. Os bloqueadores diretos de REs como Tamoxifeno (TAM) e Raloxifeno, conhecidos como moduladores seletivos dos receptores de estrógeno (SERMs), foram estabelecidos como drogas terapêuticas de primeira linha para o tratamento de tumores mamários dependentes do estímulo estrogênico [7]. O Tamoxifeno (TAM) reduz a incidência de câncer de mama em mulheres com alto risco pré e pós-menopausa, com aumento da sobrevida livre de doença e diminuição das recorrências observadas em pacientes com tumores hormonalmente dependentes [8]. Contudo, uma avaliação criteriosa do uso do TAM revelou alguns efeitos colaterais importantes como o aumento do risco para desenvolvimento de câncer de endométrio, trombose venosa profunda, embolia pulmonar e desenvolvimento de resistência

adquirida [9-11]. Assim, os efeitos colaterais indesejáveis obtidos nos tratamentos com SERMs têm estimulado o uso de técnicas alternativas como a medicina complementar e alternativa (MCA). Na última década, o interesse em MCA tem crescido rapidamente no mundo capitalista. Anúncios comerciais têm estimulado a aquisição e consumo em massa de ervas e plantas medicinais, vitaminas e suplementos nutricionais como medicamentos promissores para a prevenção e cura do câncer. Por isso, o uso de MCA é mais comum entre os pacientes com câncer do que na população sadia [12]. De fato, estimativas recentes sugerem uma prevalência de 7-64% para o uso de plantas medicinais pelos pacientes em 26 estudos realizados em todo o mundo [13,14] e até 72% dos pacientes não informam seu médico do consumo simultâneo de MCA [15]. Apesar do entusiasmo da sociedade pelas ervas ou remédios "naturais", para a maioria delas não há evidências científicas concretas que garantam a eficácia e segurança desses medicamentos. Além disso, na maioria dos casos os efeitos adversos e interações medicamentosas não foram bem estudadas e catalogadas [16]. Assim, a avaliação da atividade farmacológica de cada MCA em combinação com outros medicamentos em bioensaios *in vivo* de curto e médio prazo e estudos clínicos devem ser realizados.

A *Ginkgo biloba* é um dos medicamentos naturais utilizados como MCA mais vendidos e consumidos por mulheres com câncer de mama em todo o planeta [17]. O extrato hidroalcoólico das folhas verdes da *Ginkgo biloba* (EGb) é uma mistura complexa de mais de 300 elementos químicos como flavonóides, lactonas diterpênicas, ginkgolídeos, sesquiterpenos e outros [17,18]. Os componentes do EGb apresentam características antioxidantes, antiproliferativas, anti-angiogênicas, antiestrogênicas e moduladoras da expressão de genes controladores do ciclo celular [19]. A *Ginkgo biloba* têm sido utilizada para o tratamento e prevenção de distúrbios circulatórios do cérebro e sistema arterial periférico, memória, Alzheimer e outros [17, 20, 21]. Por

outro lado, o EGb tem demonstrado a capacidade de modular a atividade e expressão das enzimas de Fase I (CYPs) e Fase II (Glutathione-S-transferase, DT-diaforase e quinina redutase) [22-24]. A alteração da função dessas enzimas metabolizadoras de drogas pela ingestão simultânea de EGb pode ser perigosa para o paciente [24].

A combinação de plantas medicinais com terapia anti-neoplásica pode implicar em um aumento ou redução dos efeitos farmacológicos desejados de ambas as drogas [13]. Assim, o presente estudo investigou a potencial interação medicamentosa entre o EGb, um dos produtos herbais mais consumidos no mundo, e o Tamoxifeno na regressão de tumores mamários induzidos pela 7,12-dimetil-benz(o)antraceno (DMBA) em ratas da linhagem Sprague-Dawley (SD).

Material e Métodos

Animais e ambiente de experimentação

Ratas fêmeas da linhagem Sprague-Dawley com 21 dias de idade foram adquiridas do CEMIB-UNICAMP (Campinas-SP) e mantidas no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP por um período de aclimação de duas semanas antes de serem iniciadas com o DMBA. Durante toda a fase de experimentação foram controladas as condições ambientais do biotério como temperatura (22 ± 2 °C), umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$), período de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão contínua do ar.

Todos os animais receberam *ad libitum* ração basal (NUVILAB CR1 – NUVITAL, PR) acrescida ou não com a substância teste e água filtrada. Os animais foram pesados e passaram por avaliações clínicas semanalmente, e o consumo de ração e água avaliados três vezes por semana ao longo do experimento.

Tratamentos experimentais com DMBA, extrato de Ginkgo biloba e Tamoxifeno

O cancerígeno 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno (DMBA, Sigma-Aldrich do Brasil S.A., Alemanha) foi diluído em óleo de girassol e aplicado (dose única) nos animais com 51 dias de idade pela via intra-gástrica na dose de 80 mg/kg p.c.

O extrato hidroalcoólico liofilizado de *Ginkgo biloba* (EGb) utilizado nesse trabalho foi fornecido gentilmente pela empresa Centroflora do Brasil S.A., Botucatu-SP. Os controles de qualidade periódicos realizados frequentemente pela empresa por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) nos assegura a presença de 24% de flavonóides (ginkgo-flavona) e 6% de terpenóides (ginkgolídeos e bilobalídeos). Devido a sua característica parcialmente solúvel em água, o EGb foi diluído em etanol 10% e posteriormente aquecido a 40 °C por 3 minutos. Após a evaporação do etanol, a solução aquosa de EGb foi injetada nos animais pela via peritoneal nas doses de 50 e 100 mg/kg p.c. diariamente pelos 28 dias de tratamento experimental.

O citrato de tamoxifeno (Nolvadex®) foi adquirido do laboratório AstraZeneca UK Limited Macclesfield, Cheshire, Reino Unido. Os comprimidos de tamoxifeno foram completamente triturados, diluídos em óleo de canola (3mg/ml) e aplicados nos animais via gavagem na dose de 10 mg/Kg p.c. diariamente pelos 28 dias de tratamento experimental. Essa dose foi adaptada do tratamento indicado pela FDA em humanos [25].

Delineamento Experimental e Processamento de Amostras Tumerais.

Todos os procedimentos realizados nesse trabalho estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNESP (Protocolo nº 51/08-CEEA).

Fêmeas da linhagem Sprague-Dawley com 51 dias de idade foram iniciadas com dose única de 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno (DMBA, 80 mg/kg p.c., i.g.). Os animais que apresentaram tumores maiores que 1 cm de diâmetro foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (10 ratos/grupo), com duração de 28 dias: (G1) TAM (10 mg/kg p.c., i.g.), (G2) TAM + EGb (50 mg/Kg p.c., i.p.), (G3) TAM + EGb (100 mg/Kg p.c., i.p.), (G4) EGb (100 mg/Kg p.c., i.p.). Os animais do grupo 4 receberam injeções diárias (i.g.) do veículo do TAM (óleo de canola). Antes de entrarem nos tratamentos experimentais, os tumores dos animais foram biopsiados sob anestesia com pentobarbital sódico (45 mg/kg p.c., i.p.). Durante esse procedimento um pequeno fragmento de cada tumor foi coletado, fixado em formalina tamponada 10% e processado para as análises histológicas.

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ ao final dos 28 dias de tratamento experimental. Após a eutanásia, foram coletadas amostras de soro (dosagens bioquímicas de ALT e estradiol), fígado, rins direito e esquerdo, ovários direito e esquerdo, útero, cadeias mamárias laterais e tumores mamários (análises). Essas amostras foram fixadas em formalina tamponada 10%, processadas para histologia, embebidas em parafina, cortadas a 3-5 µm e coradas pela hematoxilina-eosina (HE). Os tumores mamários foram corados imunoistoquimicamente para PCNA, caspase-3-clivada, p63, receptor de estrógeno (RE) e β-catenina.

Imunoistoquímica dos tumores mamários

As lâminas histológicas dos tumores mamários pré-tratadas com solução de poly-D-lisina passaram pelos seguintes processos: desparafinização, recuperação antigênica (3 minutos a 120 °C na panela de pressão Pascal), bloqueio de peroxidases endógenas (10 minutos no peróxido de hidrogênio 3%), bloqueio de ligações

inespecíficas (60 minutos no leite desnatado 1%), conjugação *over-night* com anticorpo primário específico (1:200 monoclonal anti-PCNA, clone PC10, DakoCytomation; 1:50 anti-caspase-3-clivada; 1:75 monoclonal anti-p63, DakoCytomation; 1:50 monoclonal anti-ER- α , clone 6F11, BioCare Medical; 1:200 monoclonal anti- β -catenina, Santa Cruz Biotechnology Inc.), conjugação com anticorpo secundário biotilado (1:200 por 60 minutos, Vector Laboratories Inc.) e solução de estreptavidina-biotina-peroxidase (1:50 por 45 minutos, Merck), revelação com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina tetracolorido (DAB, Sigma-Aldrich do Brasil, por 10 minutos), contra-coloração (Hematoxilina de Harris), desidratação e montagem. Controles negativos para cada uma das reações imunoistoquímicas foram realizadas em lâminas paralelas pela omissão do anticorpo primário.

Medidas de volume e área dos tumores mamários

O volume em cm^3 foi calculado a partir de três medidas externas de acordo com o método de determinação do volume das elipses (*largura x altura x profundidade x 0,75 x 3,141592*) [26]. As medidas foram obtidas com auxílio de um paquímetro após a anestesia dos animais com pentobarbital sódico (45 mg/kg p.c.) no início (imediatamente antes da biópsia) e no final dos tratamentos. O crescimento ou regressão tumoral foram calculados pela subtração do volume final pelo inicial.

As lâminas tumorais coradas por H.E. foram analisadas morfometricamente no sistema analisador de imagens Nikon (Microphot-FXA) conectado ao KS-300 (Kontron Elektronik, Germany), na objetiva de 20x. As porcentagens de áreas viva, em regressão e necrótica foram determinadas em relação à área total do corte ($\mu\text{m}^2/\text{cm}^3 \times 100$). A área total dos tumores mamários foi medida no sistema Macro-Stand device (com vídeo câmera CCD black-and-white, Sony DC-777 acoplada ao KS-300).

Índices de proliferação celular e apoptose e análises de RE- α , p63 e β -catenina

Essas análises foram realizadas apenas nas áreas vivas dos tumores mamários. Os índices de proliferação celular e apoptose foram determinados pela porcentagem de células nuclearmente marcadas pelo PCNA (fase “S” do ciclo celular) e caspase-3-clivada, respectivamente, em relação ao número total de células analisadas em 10-20 campos visuais na objetiva de 40x (~135 células/campo). As porcentagens de células marcadas pelo RE- α (núcleo), proteína p63 (núcleo) e β -catenina (núcleo e citoplasma) foram determinados em relação ao número total de células analisadas em 10-20 campos visuais na objetiva de 40x.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Sigma Stat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Os dados de peso corpóreo, análises bioquímicas, volume tumoral (cm^3), área tumoral viva/em regressão/em (cm^2), índices de proliferação celular e apoptose e índices de marcação de RE- α , p63 e β -catenina foram analisados pelos testes ANOVA ou Kruskal-Wallis. A comparação de dados entre a biópsia (antes) e o tumor (depois) foi feita através do teste de T para amostras dependentes. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Resultados

Achados gerais

Após o início dos tratamentos experimentais com EGb e TAM durante 28 dias, todos os animais apresentaram perda de peso corpóreo (ver Anexo 3). Os animais tratados apenas com TAM (G1) apresentaram perda média de $23,43 \pm 14,48$ gramas,

calculado pela diferença de pesos finais e iniciais desses animais (ver Anexo 4). Os animais tratados com TAM + EGb 50 ou 100 mg/kg (G2 e G3, respectivamente) apresentaram perdas médias de $41,17 \pm 12,48$ e $38,8 \pm 25,84$ gramas, respectivamente. Os animais tratados apenas com EGb 100 mg/kg (G4) apresentaram perda média de $20 \pm 17,78$ gramas. Apesar da aparente diferença entre os tratamentos experimentais, nenhuma diferença significativa foi observada nos dados referentes a pesos corpóreos médios iniciais e finais em decorrência do alto desvio padrão entre eles ($G1=G2=G3$, $p>0,05$). Os consumos médios de ração e água também foram semelhantes entre os grupos experimentais durante os tratamentos experimentais (dados não mostrados).

O peso hepático relativo médio não diferiu entre os três grupos tratados com TAM independente do tratamento com EGb ($G1=G2=G3$, $p>0,005$). O grupo tratado apenas com EGb (G4) apresentou maior peso hepático relativo médio em relação ao grupo tratado apenas com TAM (G1) ($G4>G1$, $p=0,0234$) (ver Anexo 5). Os pesos dos ovários esquerdos e direitos não apresentaram diferença estatística entre os diferentes tratamentos experimentais ($G1=G2=G3=G4$, $p>0,05$).

Dosagens bioquímicas de ALT e estradiol

A Tabela 1 indica os valores das dosagens bioquímicas médias de alanina aminotransferase (ALT) e estradiol no plasma dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os valores de ALT e estradiol não diferiram entre os grupos experimentais tratados ou não com TAM e EGb ($G1=G2=G3=G4$, $p>0,05$).

Tabela 1 – Dosagens bioquímicas de alanina-aminotransferase (ALT) e estradiol nos diferentes grupos experimentais.¹

Grupo/Tratamento ²	ALT (u/l)	Estradiol (pg/ml)
(G1) TAM	39,17 ± 10,78	57,80 ± 13,26
(G2) TAM+EGb50	47,83 ± 11,25	42,83 ± 8,59
(G3) TAM+EGb100	47 ± 14,51	34 ± 16,80
(G4) EGb100	35,75 ± 17,21	38,00 ± 14,90

¹Dados expressos na forma de média ± desvio-padrão; TAM = Tamoxifeno (10 mg/Kg p.c., i.g.), EGb = extrato de *Ginkgo biloba* (50-100 mg/Kg p.c., i.p.).

Medidas de volume e área dos tumores mamários

A Figura 1 demonstra os volumes tumorais médios antes e após o tratamento experimental por 28 dias. No início do experimento, o volume dos tumores mamários não diferiu significativamente entre os grupos (G1=G2=G3=G4, $p>0,05$). Por outro lado, ao final do experimento, os animais que receberam TAM (G1, G2 e G3) apresentaram volumes tumorais médios bem menores em relação aos que receberam apenas EGb (G1=G2=G3<G4, $p<0,001$). Nos três grupos experimentais que receberam tamoxifeno, os tumores mamários sofreram uma regressão média de 83%. Não houve diferença estatística na redução do volume tumoral entre os três grupos tratados com TAM independentemente do tratamento simultâneo com EGb (G1=G2=G3, $p>0,05$). Entretanto, uma diferença significativa foi observada entre os três grupos que receberam TAM (G1, G2 e G3) em relação ao que recebeu apenas EGb (G1=G2=G3>G4, $p=0,0008$). No grupo 4, os tumores mamários dos animais sofreram um aumento médio de 178,7% em seu volume (Figura 1).

As medidas morfométricas das áreas específicas (viva/em regressão/em necrose) dos tumores mamários estão apresentadas na Figura 2 e exemplos fotográficos estão

apresentados na Figura 3. Os tumores dos animais que não receberam TAM (G4) apresentaram grande parte de área viva (80,86%), moderada necrose (18,67%) e pouca área em regressão (0,47%) (Tabela 2 e Anexo 6). O tratamento com TAM modificou a expressão morfológica dessas áreas (48,83%; 1,49% e 36,35% respectivamente). Os animais que receberam o tratamento combinado com TAM e EGb 100mg/kg (G3) apresentaram a maior taxa de redução na área viva ($G3 < G4$, $p=0,0457$), na área necrótica ($G3 < G4$, $p=0,0376$) e aumento na área em regressão ($G3 > G4$, $p=0,0042$) em relação aos animais que não receberam tamoxifeno (G4) (ver Anexo 7).

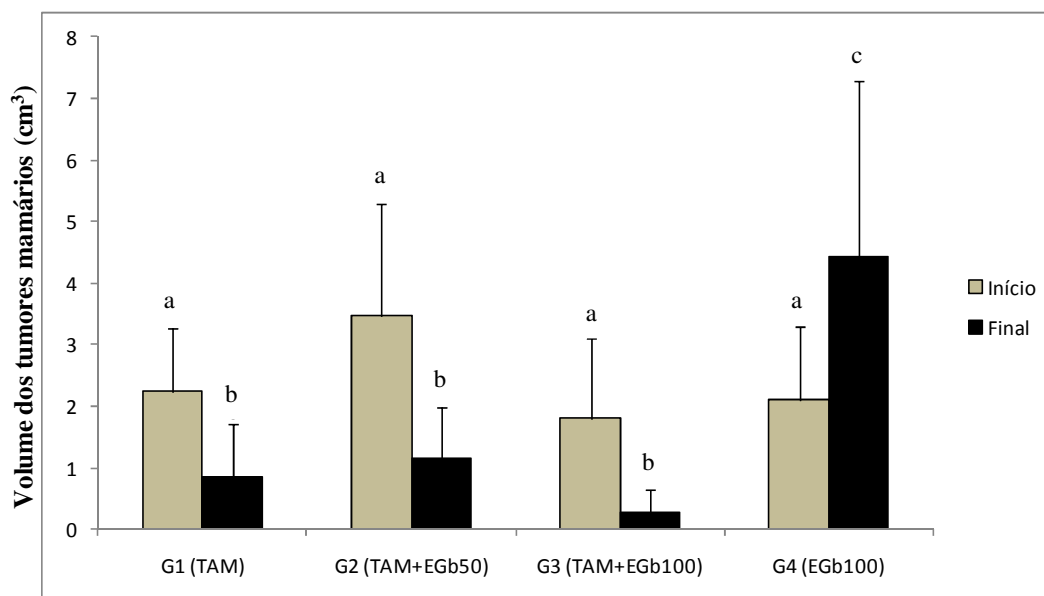


Figura 1 – Gráfico que representa o volume em cm^3 dos tumores mamários no início e final dos 28 dias de tratamento. TAM = tamoxifeno (10 mg/Kg p.c., i.p.); EGb = Extrato de *Ginkgo biloba* (50 ou 100 mg/Kg p.c., i.g.). ^{a,b,c}Diferenças significativas representadas por letras diferentes ($p < 0,05$).

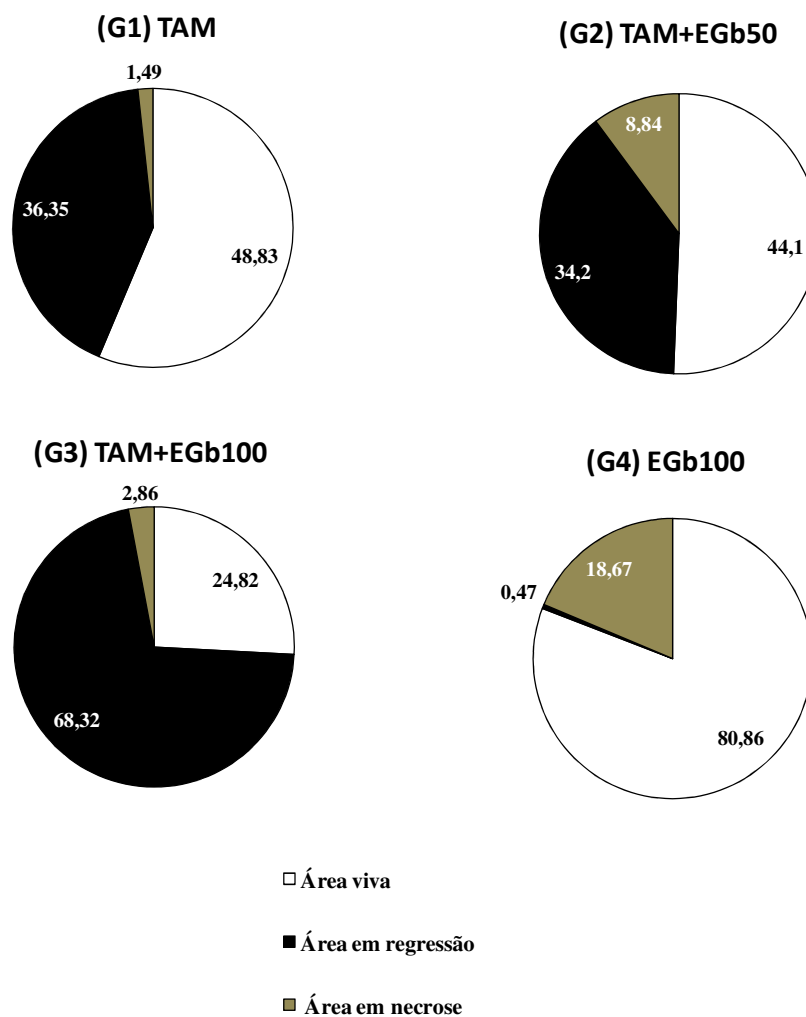


Figura 2 – Análise morfométrica que representa a porcentagem média de área viva, área em regressão e área em necrose nos tumores mamários distribuídos pelos grupos experimentais ao final dos 28 dias de tratamento. TAM = tamoxifeno (10 mg/Kg p.c., i.p.); EGb = Extrato de *Ginkgo biloba* (50 ou 100 mg/Kg p.c., i.g.).

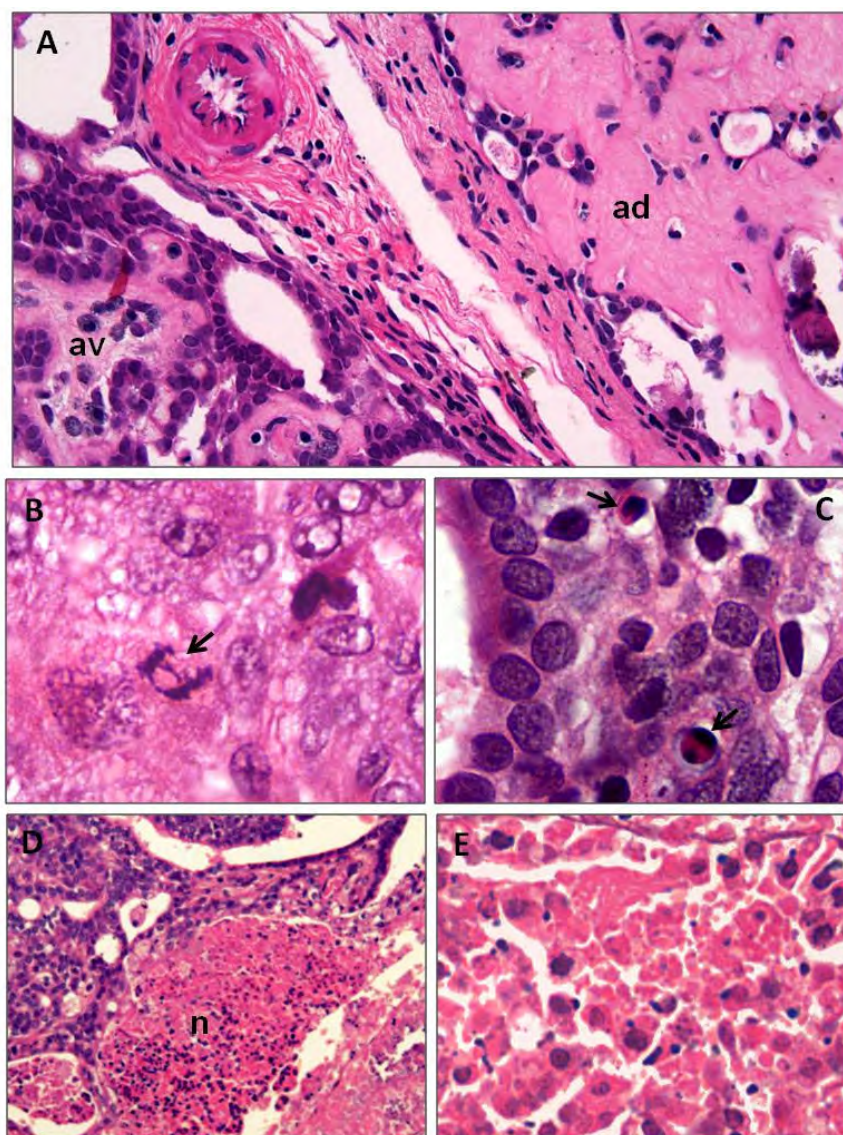


Figura 3 – Cortes histológicos de tumores mamários corados pela técnica de HE. (A) Região de limite entre área viva (av) e área em regressão com deposição hialina estromal (ad), objetiva 40x. (B) Área viva tumoral evidenciando uma mitose anômala (seta), objetiva de 100x. (C) Área viva tumoral evidenciando apoptoses (setas) no meio do parênquima preenchido por células neoplásicas, objetiva de 100x. (D) Tumor mamário vivo com áreas de necrose focais (n), objetiva de 20x. (E) Área necrótica com *debris* celulares em grande aumento, objetiva de 100x.

Índices de proliferação celular e apoptose e análises de RE- α , p63 e β -catenina

Nos fígados dos animais distribuídos pelos grupos experimentais, os índices de mitose e apoptose foram contados nos cortes histológicos corados por HE (Tabela 2). Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais quando comparamos os índices mitótico e apoptótico ($G1=G2=G3=G4$, $p>0,05$).

Tabela 2 – Índices de mitose e apoptose no fígado nos diferentes grupos experimentais ao final dos 28 dias de tratamento experimental.¹

Grupo/Tratamento ²	Mitose (%)	Apoptose (%)
(G1) TAM	0,010 $\pm$ 0,02	0,037 $\pm$ 0,05
(G2) TAM+EGb50	0,005 $\pm$ 0,01	0,095 $\pm$ 0,08
(G3) TAM+EGb100	0,032 $\pm$ 0,06	0,067 $\pm$ 0,10
(G4) EGb100	0,053 $\pm$ 0,09	0,164 $\pm$ 0,10

¹Dados expressos na forma de média $\pm$ desvio-padrão; TAM = Tamoxifeno (10 mg/Kg p.c., i.g.), EGb = extrato de *Ginkgo biloba* (50-100 mg/Kg p.c., i.p.).

A cinética de proliferação celular nas biópsias e áreas vivas dos tumores mamários (ver Anexo 9) foi avaliada pelos índices de proliferação celular (%) e apoptose (%), determinados a partir da expressão imunoistoquímica de células marcadas por PCNA e caspase-3 clivada (Figuras 4-A e 4-B, respectivamente). Os três grupos que receberam TAM (G1, G2 e G3) apresentaram redução significativa na porcentagem de células em proliferação nas áreas vivas após os tratamentos quando comparamos aos valores de referência para as biópsias ($p<0,05$). O tratamento com o EGb não alterou essa propriedade terapêutica anti-proliferativa do TAM ($G1=G2=G3$, $p>0,05$). Por outro lado, nos tumores dos animais tratados apenas com EGb (G4), o índice de proliferação

foi relativamente maior nos tumores quando comparado à biópsia ($p < 0,001$). Quando comparamos os tumores nos quatro grupos, a porcentagem média de células em proliferação (PCNA⁺) foi significativamente maior nos tumores dos animais que foram tratados apenas com EGb (~6%) em relação aos demais grupos experimentais que receberam TAM e EGb (<1%) ($G4 > G1 = G2 = G3$, $p < 0,005$). A porcentagem de células em apoptose (caspase-3-clivada⁺) não diferiu no início do experimento (biópsia) nem foi modificada pelo tratamento com TAM independente da presença ou não do EGb ($G1 = G2 = G3 = G4$, $p > 0,05$).

A Figura 5 representa a marcação imunoistoquímica de todos os parâmetros avaliados nas áreas vivas dos tumores mamários (PCNA, caspase-3 clivada, RE, p63 e β -catenina). A porcentagem de células marcadas imunoistoquimicamente para ER, p63 e β -catenina (intracitoplasmática e intranuclear) nas áreas vivas das neoplasias mamárias não foram modificadas pelos tratamentos experimentais ($G1 = G2 = G3 = G4$, $p > 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Porcentagem de células marcadas na área viva dos tumores mamários nos diferentes grupos experimentais ao final dos 28 dias de tratamento experimental.¹

Grupos ²	ER ³	P63	β -catenina (%)	
	(%)	(%)	Citoplasma ⁺	Núcleo ⁺
(G1) TAM	4.2 $\pm$ 4.45	3.2 $\pm$ 3.56	0.9 $\pm$ 0.9	6.0 $\pm$ 15.54
(G2) TAM+EGb50	9.57 $\pm$ 7.86	2.23 $\pm$ 1.93	0.54 $\pm$ 0.52	6.1 $\pm$ 14.7
(G3) TAM+EGb100	4.92 $\pm$ 5.79	3.14 $\pm$ 1.19	1.4 $\pm$ 1.14	20.0 $\pm$ 22.39
(G4) EGb100	10.06 $\pm$ 5.7	3.42 $\pm$ 2.69	1.5 $\pm$ 0.92	0.37 $\pm$ 0.74

¹Dados expressos na forma de média $\pm$ SD. ²DMBA = 7,12-dimethyl-benz(a)antraceno (80 mg/Kg p.c., i.g.); TAM = tamoxifeno (10 mg/Kg p.c., i.p.); EGb = Extrato de *Ginkgo biloba* (50 or 100 mg/Kg, i.g.). ³ER = receptor de estrógeno.

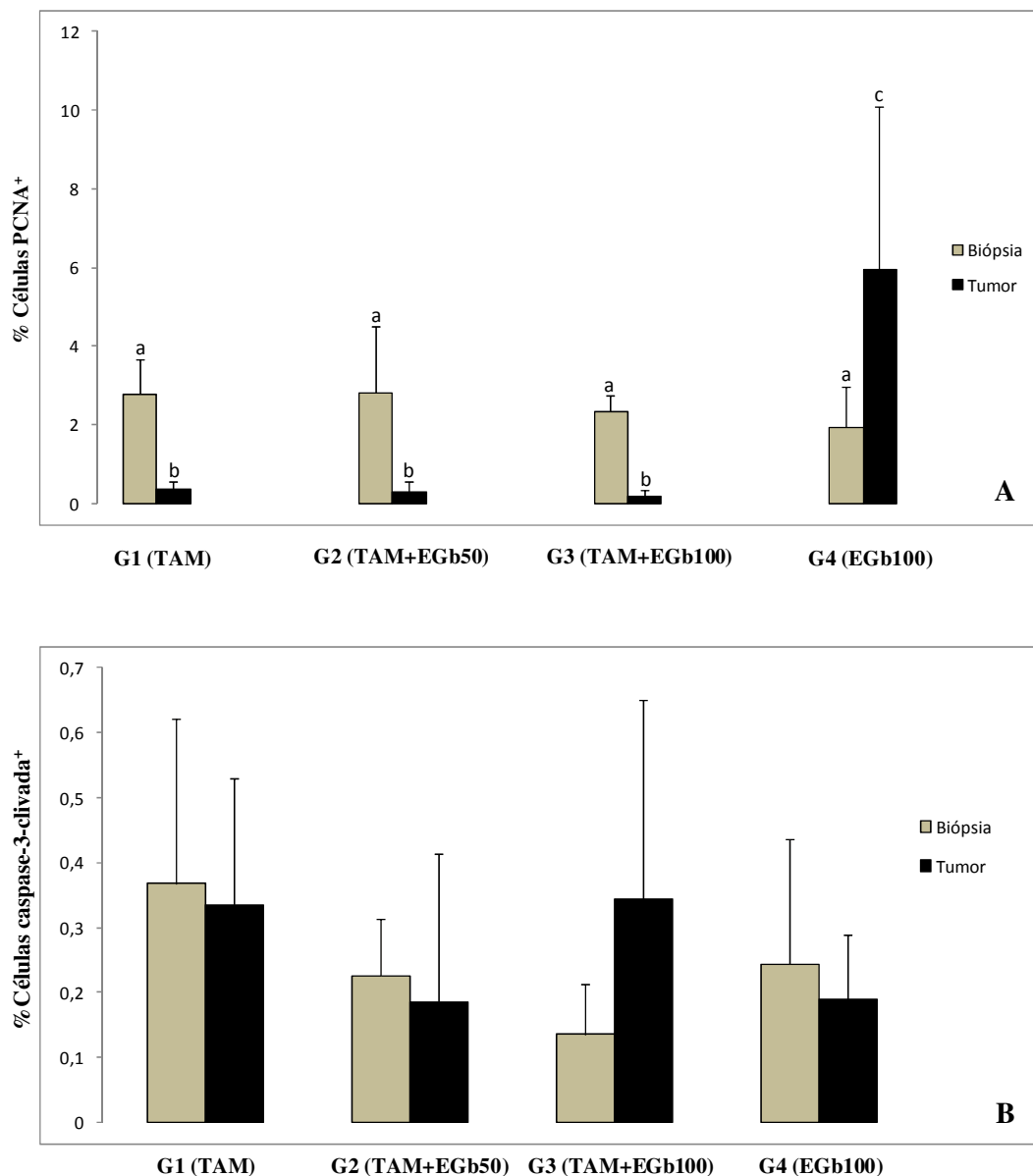


Figura 4 – Gráfico que representa a porcentagem de células em proliferação (PCNA⁺) e em apoptose (caspase-3-clivada⁺) na área viva dos tumores mamários antes (biópsia) e após (tumores) os tratamentos experimentais. TAM = tamoxifeno (10 mg/Kg p.c., i.p.); EGb = Extrato de *Ginkgo biloba* (50 ou 100 mg/Kg p.c., i.g.). ^{a,b,c}Letras diferentes correspondem a médias diferentes (p<0,05).

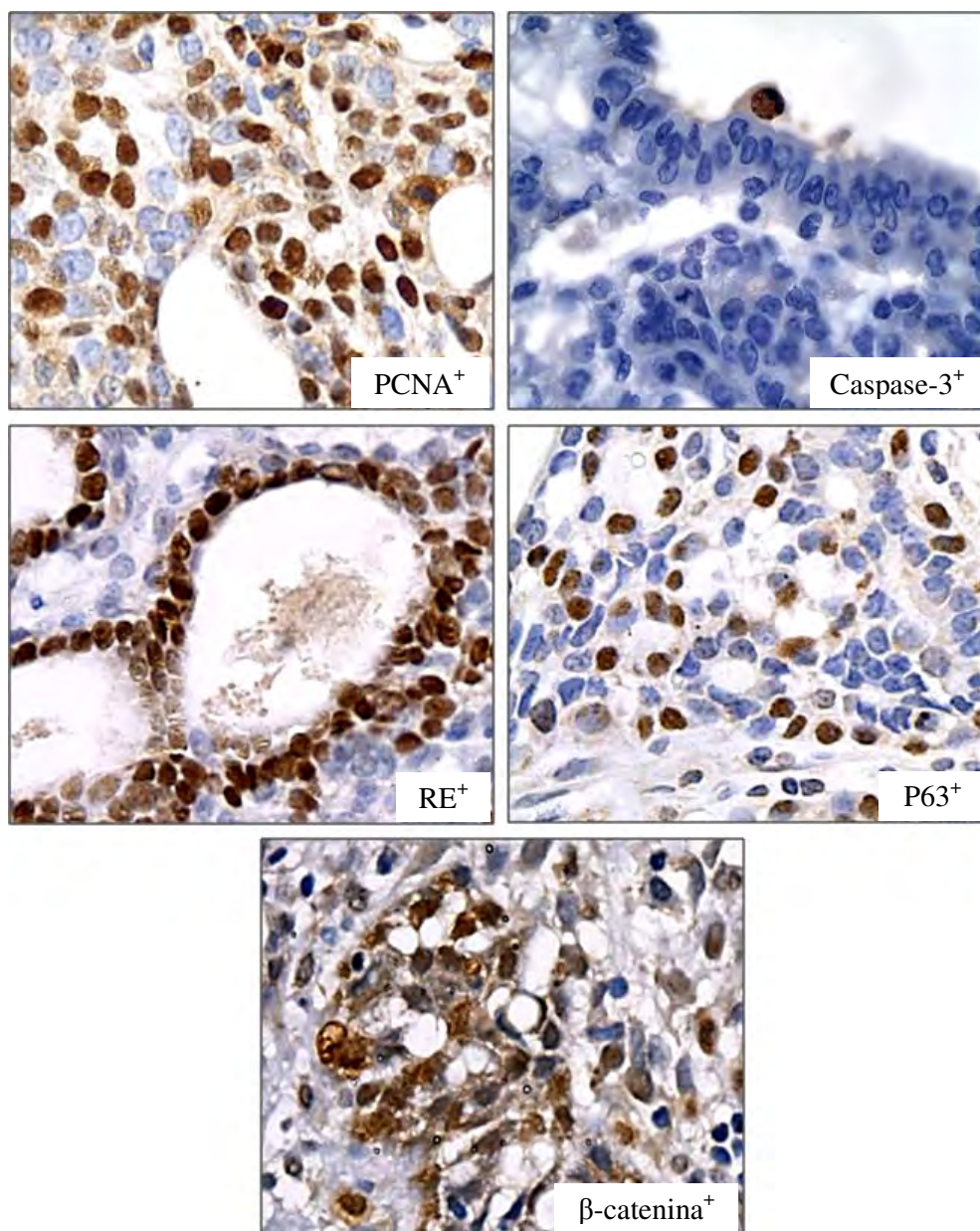


Figura 5 – Exemplos da marcação imunoistoquímica dos biomarcadores utilizados nesse trabalho nas áreas vivas dos tumores mamários induzidos pela DMBA em fêmeas SD. Objetiva de 400x.

Discussão

Os resultados descritos nesse estudo indicam que o tratamento i.p. com EGb não interferiu nas propriedades anti-carcinogênicas do quimioterápico tamoxifeno (TAM) no modelo de carcinogênese mamária induzida quimicamente pela DMBA em ratas Sprague-Dawley. O tratamento com TAM mostrou-se eficiente na redução do volume tumoral com indução de regressão tumoral detectada histologicamente nas neoplasias mamárias induzidas pela DMBA. Esses efeitos terapêuticos da TAM tem sido relatos na literatura [27, 28].

Os dados de ganho de peso corpóreo, consumo de ração e água, pesos relativos hepático, uterinos, ovarianos não foram alteradas pelo tratamento com o EGb. Alguns animais tratados com EGb morreram no decorrer do estudo em decorrência da agressividade dos tumores induzidos pela DMBA, mesmo nos animais que receberam o agente quimioterápico TAM. A resposta dos animais ao iniciador foi individual sendo que alguns animais desenvolveram tumores logo no início do protocolo de iniciação e outros apenas próximo do término do estudo. Alguns animais iniciados não desenvolveram tumores durante todo o período experimental enquanto outros desenvolveram até seis tumores, sendo variável também o volume desses tumores no mesmo animal. De fato, a individualidade de resposta foi observada para o DMBA, TAM e EGb e ocorreu em praticamente todos os parâmetros avaliados, como pode ser observado pelo alto desvio padrão nas análises em geral.

A alanina-aminotransferase (ALT) é um biomarcador sérico muito utilizado na rotina laboratorial para identificar danos hepáticos. Aumentos nos níveis séricos de ALT podem estar diretamente relacionados à hepatite, cirrose hepática, tumores de fígado, icterícia obstrutiva, miocardite, infarto do miocárdio e outras patologias [29]. A dosagem bioquímica sérica de ALT realizada nesse trabalho sugere que o TAM,

administrado na dose de 10mg/kg (semelhante à dose terapêutica humana) [25], não induziu danos hepáticos agudos nos três grupos tratados com esse quimioterápico. De fato, a arquitetura hepática manteve-se preservada em todos os fígados dos animais tratados e não-tratados com o TAM e nenhuma lesão histológica foi detectada nos cortes em HE. O tratamento com TAM também não induziu aumento no número de mitose e apoptose no fígado desses animais. Por outro lado, achados recentes da literatura indicam que o TAM induz câncer de fígado em ratos e aumenta a incidência de câncer de endométrio em mulheres [30]. Dependendo da dose e do tempo de exposição, o TAM se liga covalentemente ao DNA e induz a formação de adutos de DNA no genoma de hepatócitos *in vitro* [31]. Apesar disso, adutos de DNA induzidos pelo TAM não têm sido detectados em todos os experimentos com animais e humanos [32, 33]. Neste trabalho, a ausência de lesões e preservação da arquitetura normal e dos níveis séricos de ALT demonstraram que a exposição de curta-duração (28 dias) à dose terapêutica humana de TAM não causou efeito tóxico evidente no fígado das fêmeas SD. Além disso, o EGb também se mostrou seguro para o fígado mesmo quando administrado por um curto período de tempo nas doses utilizadas nesse trabalho.

O extrato de *Ginkgo biloba* apresenta um efeito bifásico podendo ser agonista e/ou antagonista dos estrógenos endógenos como o E₂, dependendo da concentração dos estrógenos e da dose de EGb utilizada (10-1000 µg/ml) em ensaios de proliferação com células MCF-7 [34, 35]. Os fitoestrógenos presentes no EGb se ligam com alta afinidade e competem com os estrógenos endógenos pelo REs (competição por antagonização) e induzem a depleção de E₂ via *feedback* negativo. Nesse estudo, o EGb não induziu alterações nos níveis séricos de E₂, mesmo sendo administrado pela via peritoneal e em uma dose elevada quando comparado à dose comercial oral humana de 180-220 mg/dia [36-38]. A manutenção dos níveis séricos de E₂ nos animais que receberam o EGb

explica, em parte, a ausência de efeito terapêutico do EGb (G4) sobre as lesões tumorais induzidas pela DMBA. São necessários novos estudos experimentais para se detectar a possível depleção de E_2 pela presença de fitoestrógenos no EGb, embora dificilmente doses menores de EGb exerçam efeitos antiestrogênicos nesse modelo de carcinogênese mamária induzida pela DMBA. Talvez outros modelos experimentais que induzam o desenvolvimento de tumores mamários menores e menos agressivos que os induzidos pela DMBA possam relatar com maior clareza a atividade anti-estrogênica do EGb através da depleção de E_2 .

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma molécula (36 kDa) que atua como co-fator para a DNA-polimerase durante a replicação do material genético da célula (principalmente na fase “S” do ciclo celular) [39]. Por isso, a PCNA é comumente utilizada como um biomarcador específico de proliferação celular em diversos modelos experimentais de carcinogênese química [39-42]. Nesse trabalho, o índice de proliferação celular (porcentagem de células PCNA⁺) foi nitidamente reduzido pelo quimioterápico TAM (G1, G2 e G3) quando comparamos antes (biópsias) e após tratamentos (tumores). Esse resultado pode ser explicado pelo bloqueio do estímulo de proliferação estrógeno-responsivo através da acoplagem e inutilização dos REs pelas moléculas de TAM [43]. Os fitoestrógenos presentes no EGb não apresentaram a mesma eficácia anti-estrogênica e não modularam os efeitos terapêuticos do TAM.

As caspases são proteases cistienil-aspartato específicas que pertencem à Família C14 [44]. As caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9, e 10 clivadas proteoliticamente estão envolvidas diretamente na regulação e execução da apoptose. Assim, a caspase-3-clivada é uma caspase efetora frequentemente utilizada como biomarcador para a morte celular [45]. Nesse trabalho, os índices de apoptose (porcentagem de células caspase-3-clivada⁺) não diferiram entre os grupos experimentais antes e após os tratamentos experimentais.

Provavelmente, as células transformadas presentes nos tumores malignos induzidos pela DMBA sejam resistentes à apoptose ou os tratamentos com TAM e EGb não apresentam a capacidade de indutora de apoptose. Outros trabalhos experimentais *in vitro* e *in vivo* voltados para os componentes envolvidos na apoptose são necessários para investigar potenciais mecanismos envolvidos em ambas as possibilidades citadas.

A p63 é uma proteína análoga à p53 expressa no núcleo de células basais regenerativas de numerosos tecidos epiteliais como pele, tecido mioepitelial mamário, epitélio da cavidade oral, prostático e urotelial [46]. Em contraste à função supressora tumoral da p53, a hiperexpressão de variantes de p63 tem sido observada em numerosos carcinomas escamosos sugerindo que essa proteína atue como um oncogene [47]. De fato, ensaios “*in vitro*” com transfecção gênica demonstraram que variantes da p63 são capazes de modular a transcrição de alguns genes regulados pelo p53 [46]. Por isso, trabalhos recentes têm demonstrado que o ‘status’ funcional das células mioepiteliais pode ser associado à agressividade/invasividade tumorais [48]. Em nosso estudo, os tratamentos com TAM e EGb não interferiram na porcentagem de células p63⁺ na área viva dos tumores mamários, indicando ausência de efeitos benéficos pela modulação do funcionamento do sistema p63. Os tumores mamários malignos induzidos pela DMBA são inicialmente originados das células epiteliais dos brotos terminais (TEBs) devido à sua incapacidade de remover completamente os adutos de DNA induzidos pelos epóxidos reativos derivados da metabolização do DMBA. A baixa porcentagem de células p63⁺ nos tumores analisados no nosso estudo comprova a manutenção da origem em TEBs nos tumores induzidos pela DMBA.

Está bem estabelecido que a β -catenina funciona como um oncogene quando está translocada para o núcleo das células [49]. Em situações normais, a β -catenina regula a adesão célula a célula por ligar as caderinas ao citoesqueleto. Além disso, essa

molécula participa da regulação da transdução de sinais de transcrição dependentes dos fatores de ligação ao DNA Tcf/Lef [50]. Recentemente, o papel da β -catenina para a alveologênese mamária foi bem estabelecida. Em camundongos com o fenótipo MMTV- Δ N89 β -catenin foram detectadas erupções hiperplásicas ao longo do duto mamário em fêmeas jovens, representando uma alveologênese precoce [51]. De fato, supressores da sinalização β -catenina inibem a alveologênese em camundongos [52]. No nosso trabalho, a porcentagem de células que expressam a β -catenina translocada para o citoplasma e principalmente para o núcleo foi utilizada como um biomarcador de malignidade dos tumores induzidos pela DMBA. Ambos os tratamentos com TAM e EGb não modificaram o padrão de marcação da B-catenina indicando ausência de modulação dessa via oncogênica por esses tratamentos.

Em conclusão, os resultados deste estudo indicam que o EGb, sob as condições experimentais utilizadas, não apresenta efeitos terapêuticos contra a carcinogênese mamária em fêmeas da linhagem Sprague-Dawley. A administração concomitante do EGb não potencializou os efeitos benéficos do TAM em todos os parâmetros avaliados. O quimioterápico Tamoxifeno se mostrou muito eficaz para reverter o quadro neoplásico induzido pela DMBA no tratamento de 28 dias. Esses dados são relatos *in vivo* importantes que comprovam a eficácia do Tamoxifeno e refutam a hipótese dos efeitos quimiopreventivos e quimioterápicos do EGb sobre a carcinogênese mamária.

Agradecimentos:

Os autores agradecem o apoio financeiro da “Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo” (FAPESP) (processo nº 98/5985-5), do “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq) (processo nº47452/2008-0) e a empresa Centroflora do Brasil S.A., Botucatu-SP, Brasil, pelo fornecimento do EGb (cód. 500821).

Referências

- [1]J. Cuzik. Breast cancer prevention in the developing world. *Breast Cancer Res.* 20 (2010) 12.
- [2]D.M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, P. Pisani. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* 55 (2005) 74-108.
- [3]C. Bouchardy, G. Fioretta, H.M. Verkooijen, G. Vlastos, P. Schaefer, J.F. Delaloye, I. Neyroud-caspar, S. Balmer-Majno, Y. Wespi, M. Forni, P. Chappuis, A.P. Sappino, E. Rapiti. Recent increase of breast cancer incidence among women under the age of forty. *Br. J. Cancer* 96 (2007) 1743-6.
- [4]Dierssen J.W.; DE Miranda, N.F.; Mulder, A.; Van Puijenbroek, M.; Verduyn, W.; Claas, F.H.; Van de Velde, C.J.; Jan Fleuren, G.; Cornelisse, C.J.; Corver, W.E.; Morreau, H. High-resolution analysis of HLA class I alterations in colorectal cancer. *BMC Cancer* 6 (2006) 233.
- [5]W.C. Park, V.C. Jordan. Selective estrogen receptor modulators (SERMS) and their roles in breast cancer prevention. *TRENDS Mol. Med.* 8 (2002) 82-8.
- [6]N.J. Bush. Advances in hormonal therapy for breast cancer. *Semin. Oncol. Nurs.* 23 (2007) 46–54.
- [7]S.L. Silverman. New selective estrogen receptor modulators (SERMs) in development. *Curr. Osteoporos. Rep.* 8 (2010) 151-3.
- [8]V.C. Jordan. Tamoxifen (ICI46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer. *British J. Pharm.* 147 (2006) 269–76.
- [9]K. Brown. Is tamoxifen a genotoxic carcinogen in women? *Mutagenesis* 24 (2009) 391-04.

-
- [10]I.N.H. White. The tamoxifen dilemma. *Carcinogenesis* 20 (1999) 1153-60.
- [11]A.Y Ting, B.F. Kimler, C.J. Fabian, B.K. Petroff. Tamoxifen prevents premalignant changes of breast, but not ovarian, cancer in rats at high risk for both diseases. *Cancer Prev. Res.* 1 (2008) 546-53.
- [12]L.M. Digianni, J.E. Garber, E.P. Winer. Complementary and alternative medicine use among women with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 34S-8S.
- [13]A. Sparreboom, M.C. Cox, M.R. Acharya, W.D. Figg. Herbal remedies in the United States: potential adverse interactions with anticancer agents. *J. Clin. Oncol.* 22 (2004) 2489-503.
- [14]E. Ernst, B.R. Cassileth. The prevalence of complementary/alternative medicine in cancer: a systematic review. *Cancer* 83 (1998) 777-82.
- [15]T.B. Klepser, W.R. Doucette, M.R. Horton, L.M. Buys, M.E. Ernst, J.K. Ford, J.D. Hoehns, H.A. Kautzman, C.D. Logemann, J.M. Swegle, M. Ritho, M.E. Klepser. Assessment of patients' perceptions and beliefs regarding herbal therapies. *Pharmacother.* 20 (2000) 83-7.
- [16]A. Cassidy. Are herbal remedies and dietary supplements safe and effective for breast cancer patients? *Breast Cancer Res.* 5 (2003) 300-2.
- [17]B.P. Jacobs, W.S. Browner. *Ginkgo biloba*: a living fossil. *Am. J. Med.* 108 (2000) 341-2.
- [18]P.F. Smith, K. MacLennan, C.L. Darlington, The neuroprotective properties of the *Ginkgo biloba* leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). *J. Ethnopharmacol.* 50 (1996) 131-9.
- [19]F.V. Defeudis, V. Papadopoulos, K. Drieu. *Ginkgo biloba* extracts and cancer: a research area in its infancy. *Black. Pub. Fund. & Clin. Pharmacol.* 17 (2003) 405-17.
- [20]S.T. Dekosky, J.D. Williamson, A.L. Fitzpatrick, R.A. Kronmal, D.G. Ives, J.A. Saxton, O.L. Lopez, G. Burke, M.C. Carlson, L.P. Fried, L.H. Kuller, J.A. Robbins, R.P. Tracy, N.F. Woolard, L. Dunn, B.E. Snitz, R.L. Nahin, C.D. Furberg. *Ginkgo biloba* for prevention of dementia: a randomized controlled trial. *Ginkgo Evaluation of Memory (GEM) Study Investigators. JAMA* 300 (2008) 2253-62.
- [21]V.S. Sierpina, B. Wollschlaeger, M. Blumenthal. *Ginkgo biloba*. *Am. Fam. Physician.* 68 (2003) 923-6.

-
- [22] K. Sasaki, S. Hatta, K. Wada, N. Ueda, T. Yoshimura, T. Endo, M. Sakata, T. Tanaka, M. Haga. Effects of extract of *Ginkgo biloba* leaves and its constituents on carcinogen-metabolizing enzyme activities and glutathione levels in mouse liver. *Life Sci.* 70 (2002) 1657-67.
- [23] L.L. Von moltke, J.L. Weemhoff, E. Bedir, I.A. Khan, J.S. Harmatz, P. Goldman, D.J. Greenblatt. Inhibition of human cytochromes P450 by components of *Ginkgo biloba*. *J. Pharm. Pharmacol.* 56 (2004) 1039-44.
- [24] C. Gaudineau, R. Beckerman, R. Welbourn, S.K. Auclair. Inhibition of human P450 enzymes by multiple constituents of the *Ginkgo biloba* extract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318 (2004) 1072-8.
- [25] J.R. Bernardes, S. Nonogaki, M.T. Seixas, G. Rodrigues de Lima, E.C. Baracat, L.H. Gebrim. Effect of a half dose of tamoxifen on proliferative activity in normal breast tissue. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 67(1999) 33-8.
- [26] C. Zhou , X. Li, W. Du, Y. Feng, X. Kong, Y. Li, L. Xiao, P. Zhang. Antitumor effects of ginkgolic acid in human cancer cell occur via cell cycle arrest and decrease the Bcl-2/Bax ratio to induce apoptosis. *Chemotherapy* 56 (2010) 393-402.
- [27] E.A. Lien, K. Wester, P.E. Lønning, E. Solheim, P.M. Ueland. Distribution of tamoxifen and metabolites into brain tissue and brain metastases in breast cancer patients. *Br. J. Cancer* 63 (1991) 641-5.
- [28] M.J. Scandlyn, E.C. Stuart, T.J. Somers-Edgar, A.R. Menzies, R.J. Rosengren. A new role for tamoxifen in oestrogen receptor-negative breast cancer when it is combined with epigallocatechin gallate. *Br. J. Cancer.* 99 (2008) 1056-63.
- [29] J. Ozer, M. Ratner, M. Shaw, W. Bailey, S. Schomaker. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* 245 (2008) 194-205.
- [30] D. Li, Y. Dragan, V.C. Jordan, M. Wang, H.C.. Effects of chronic administration of tamoxifen and toremifene on DNA adducts in rat liver, kidney, and uterus. *Cancer Res.* 57 (1997) 1438-41.

-
- [31] M.R. Osborne, A. Hewer, D.H. Phillips. Stereoselective metabolic activation of alpha-hydroxy-N-desmethyltamoxifen: the R-isomer forms more DNA adducts in rat liver cells. *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2004) 697-701.
- [32] G. Gamboa da Costa, L.P. McDaniel-Hamilton, R.H. Heflich, M.M. Marques, F.A. Beland. DNA adduct formation and mutant induction in Sprague-Dawley rats treated with tamoxifen and its derivatives. *Carcinogenesis* 22 (2001) 1307-15.
- [33] S.Y. Kim, Y.R. Laxmi, N. Suzuki, K. Ogura, T. Watabe, M.W. Duffel, S. Shibutani. Formation of tamoxifen-DNA adducts via O-sulfonation, not O-acetylation, of alpha-hydroxytamoxifen in rat and human livers. *Drug Metab. Dispos.* 33 (2005) 1673-8.
- [34] S.M. Oh, K.H. Chung. Antiestrogenic activities of Ginkgo biloba extracts. *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* 100 (2008) 167-76.
- [35] S.M. Oh, K.H. Chung. Estrogenic activities of Ginkgo biloba extracts. *Life Science* 74 (2004) 1325-35.
- [36] B. Singh, P. Kaur, R.D. Singh, P.S. Ahuja. Biology and chemistry of Ginkgo biloba. *Fitoterapia* 79 (2008) 401-18.
- [37] S. Mahadevan, Y. Park. Multifaceted therapeutic benefits of Ginkgo biloba L.: chemistry, efficacy, safety, and uses. *J. Food Science* 73 (2008) R14-9.
- [38] H.P. Fransen, S.M. Pelgrom, B. Stewart-Knox, D. de Kaste, H. Verhagen. Assessment of health claims, content, and safety of herbal supplements containing Ginkgo biloba. *Food Nutr. Res.* 54 (2010).
- [39] Y. Hirose, T. Tanaka, T. Kawamori, M. Ohnishi, H. Makita, H. Mori, K. Satoh, A. Hara. Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rats. *Carcinogenesis* 16 (1995) 2337-42.

-
- [40] C.J. Fabian, B.F. Kimler, J. Anderson, O.W. Tawfik, M.S. Mayo, W.E.Jr. Burak, J.A. O'Shaughnessy, K.S. Albain, D.M. Hyams, G.T. Budd, P.A. Ganz, E.R. Sauter, S.W. Beenen, W.E. Grizzle, J.P. Fruehauf, D.W. Arneson, J.W. Bacus, M.D. Lagios, K.A. Johnson, D. Browne. Breast cancer chemoprevention phase I evaluation of biomarker modulation by arzoxifene, a third generation selective estrogen receptor modulator. *Clin Cancer Res.* 10 (2004) 5403-17.
- [41] M.C. Dias, M.A.M. Rodrigues, M.C. Reimberg, L.F. Barbisan. Protective effects of Ginkgo biloba against rat liver carcinogenesis. *Chem. Biol. Inter.* 173 (2008) 32-42.
- [42] J.R. Zapaterini, L.T. Bidinotto, M.A.M. Rodrigues, L.F. Barbisan. Chemopreventive effects of mate against mouse mammary and colon carcinogenesis. *Hum Exp Toxicol.* (2010). [Epub ahead of print]
- [43] D.J. Kojetin, T.P. Burris, E.V. Jensen, S.A. Khan. Implications of the binding of tamoxifen to the coactivator recognition site of the estrogen receptor. *Endocr. Relat. Cancer* 15 (2008) 851-70.
- [44] A.J. Barrett, N.D. Rawlings. Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol. Chem.* 382 (2001) 727-33.
- [45] S. Krajewski, M. Krajewska, B.C. Turner, C. Pratt, B. Howard, J.M. Zapata, V. Frenkel, S. Robertson, Y. Ionov, H. Yamamoto, M. Perucho, S. Takayama, J.C. Reed. Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 6 (1999) 29-40.
- [46] M.D. Westfall, J.A. Pietenpol p63: molecular complexity in development and cancer *Carcinogenesis* 25 (2004) 857-64.

-
- [47] A. Yang, M. Kaghad, Y. Wang, E. Gillet, M. Fleming, V. Dotsch, N. Andrews, D. Caput, F. McKeon. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing and dominant-negative activities. *Mol. Cell.* 2 (1998) 305-16.
- [48] A. Ribeiro-Silva, L.N.Z. Ramalho, S.B. Garcia, S. Zucoloto. The Relationship Between p63 and p53 Expression in Normal and Neoplastic Breast Tissue. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 127 (2003) 336-40.
- [49] S.Y. Lin, W. Xia, J.C. Wang, K.Y. Kwong, B. Spohn, Y. Wen, R.G. Pestell, M.C. Hung. Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: Its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (2000) 4262–4266.
- [50] S. Hatsell, T. Rowlands, M. Hiremath, P. Cowin. β -catenin and Tcfs in Mammary Development and Cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neop.* 8 (2003) 145-58.
- [51] A. Imbert, R. Eelkema, S. Jordan, H. Feiner, P. Cowin. 1N89 β -catenin induces precocious development, differentiation, and neoplasia in mammary gland. *J. Cell Biol.* 153 (2001) 555–568.
- [52] S. B. Tepera, P. D. McCrea, and J. M. Rosen. A betacatenin survival signal is required for normal lobular development in the mammary gland. *J. Cell Sci.* 116 (2003) 1137–1149.

7. Conclusões

- 1) O tratamento por 18 semanas com o extrato de *Ginkgo biloba* (EGb), administrado pela via oral (acrescida na ração comercial), não induziu toxicidade geral e hepática nos animais.
- 2) O tratamento com EGb nas concentrações de 0,1 e 0,2% não foi eficaz em prevenir o desenvolvimento de neoplasias mamárias induzidas pela DMBA em fêmeas SD. Existe a atividade quimiopreventiva do EGb possa ser melhor analisada em outros modelos experimentais que induzam tumores mamários de forma mais sincronizada.
- 3) O TAM na dose clínica humana (10 mg/kg, i.g.) é um medicamento quimioterápico eficaz contra a carcinogênese mamária induzida no modelo experimental com a DMBA.
- 4) O tratamento com EGb *per se* nas doses de 50 e 100 mg/kg (i.p.) não foi eficaz em reduzir o crescimento de tumores mamários induzidos pela DMBA em fêmeas SD.
- 5) Em geral, o EGb não potencializou e nem reduziu as propriedades terapêuticas do TAM sobre a carcinogênese mamária. Portanto, a interação medicamentosa entre ambos não foi significativa nesse modelo experimental.
- 6) O EGb (100 mg/kg) apresentou um efeito potencializador das propriedades terapêuticas do TAM por reduzir as áreas viva e necrótica, e aumentar a área em regressão dos tumores mamários induzidos pela DMBA em ratas SD. Entretanto, esse resultado não se refletiu nas análises de regressão do volume tumoral, proliferação celular, apoptose e demais biomarcadores utilizados nesse trabalho.

ANEXO 1

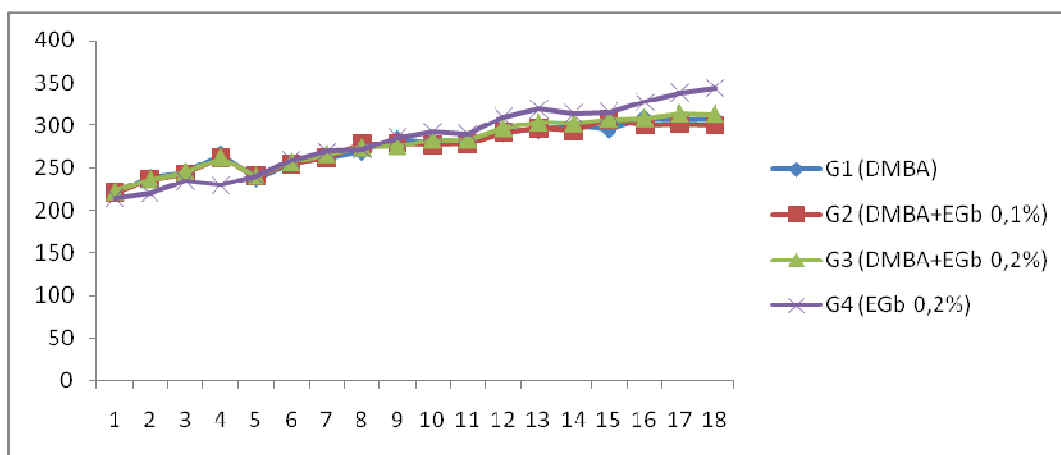


Figura 1 - Gráfico da evolução do peso corpóreo médio dos diferentes grupos experimentais ao longo das 18 semanas do estudo. DMBA= 7,12-dimetilbenz(o)antraceno (dose única de 60 mg/kg p.c., i.g.), EGb= extrato de *Ginkgo biloba* (0,1 e 0,2 % adicionados na ração basal).

ANEXO 2

Tabela 1 - Dados de peso corpóreo, consumo de ração, água e de EGb e peso relativo dos ovários e útero nos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros ¹	Grupos Experimentais			
	DMBA	DMBA+EGb 0,1%	DMBA+EGb 0,2%	EGb 0,2%
	(G1)	(G2)	(G3)	(G4)
Peso Corpóreo:				
Inicial (g)	222,12 ± 21,81	220,67 ± 25,37	222,67 ± 16,65	220,10 ± 21,58
Final (g)	308,90 ± 25,23	300,44 ± 44,81	312,78 ± 38,29	349,20 ± 31,18
Ganho (g)	86,90 ± 31,87	79,78 ± 32,25	90,11 ± 30,53	129,20 ± 32,93
Consumo:				
Ração (g/rato/dia)	18,82 ± 1,50	19,89 ± 2,58	20,27 ± 1,97	19,92 ± 2,25
Água (ml/rato dia)	31,87 ± 2,91	34,14 ± 3,60	36,64 ± 3,40	35,20 ± 6,59
EGb (mg/kg/dia)	0	72,83 ± 17,07	147,03 ± 32,68	148,92 ± 36,17
Peso Relativo:				
Ovário D (%)	0,0210 ± 0,008	0,0190 ± 0,006	0,0195 ± 0,004	0,0170 ± 0,005
Ovário E (%)	0,0193 ± 0,007	0,0196 ± 0,005	0,0199 ± 0,006	0,0173 ± 0,004
Útero (%)	0,172 ± 0,049	0,197 ± 0,099	0,144 ± 0,044	0,167 ± 0,020

¹Dados expressos na forma de média ± SD; ²DMBA= 7,12-dimetilbenz(o)antraceno (dose única de 80 mg/kg p.c., i.g.), EGb= extrato de *Ginkgo biloba* (0,1 e 0,2 % adicionados na ração basal).

ANEXO 3

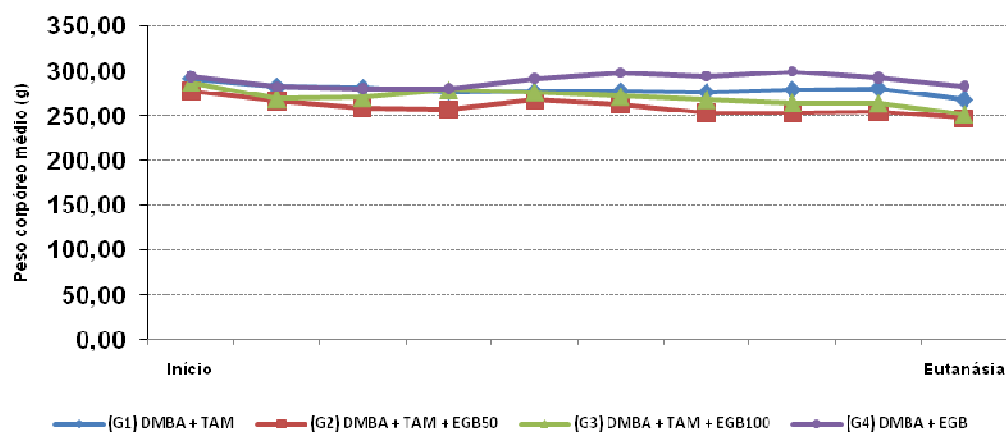


Figura 2 - Gráfico de evolução do peso corpóreo médio dos animais nos diferentes grupos experimentais, ao longo dos 28 dias de tratamento experimental. DMBA = 7,12-dimetilbenz(o)antraceno (dose única de 80 mg/kg p.c., i.g.), TAM = Tamoxifeno (10 mg/Kg p.c., i.g.), EGB = extrato de *Ginkgo biloba* (50-100 mg/Kg p.c., i.p.).

ANEXO 4

Tabela 2 – Peso corpóreo inicial (PCi), peso corpóreo final (PCf) e ganho de peso corpóreo (GPC) dos animais distribuídos pelos diferentes grupos experimentais.¹

Grupo/Tratamento ²	PCi (g)	PCf (g)	GPC (g)
(G1) TAM	291,33 ± 12,56	267,67 ± 9,75	-23,43 ± 14,48
(G2) TAM+EGb50	277,17 ± 21,19	247,25 ± 12,97	-41,17 ± 12,48
(G3) TAM+EGb100	287,17 ± 29,59	251,80 ± 20,9	-38,8 ± 25,84
(G4) EGb100	293,40 ± 8,32	283 ± 2,83	-20 ± 17,78

¹Dados expressos na forma de média ± desvio-padrão; ²DMBA = 7,12-dimetilbenz(o)antraceno (dose única de 80 mg/kg p.c., i.g.), TAM = Tamoxifeno (10 mg/Kg p.c., i.g.), EGb = extrato de *Ginkgo biloba* (50-100 mg/Kg p.c., i.p.).

ANEXO 5

Tabela 3 – Pesos hepáticos final (HF) e relativo (HR), pesos ovarianos esquerdo (OE) e direito (OD) distribuídos pelos grupos diferentes experimentais.¹

Grupo/Tratamento ²	HF (g)	HR (g)	OE (%)	OD (%)
(G1) TAM	9,67 ± 2,01	5,53 ± 0,57	0,02 ± 0,006	0,019 ± 0,005
(G2) TAM+EGb50	8,78 ± 2,94	3,38 ± 1,24	0,017 ± 0,07	0,013 ± 0,008
(G3) TAM+EGb100	10,76 ± 1,21	4,15 ± 0,67	0,013 ± 0,007	0,019 ± 0,015
(G4) EGb100	13,20 ± 2,41	4,53 ± 0,24*	0,019 ± 0,007	0,017 ± 0,004

¹Dados expressos na forma de média ± desvio-padrão; ²DMBA = 7,12-dimetilbenz(o)antraceno (dose única de 80 mg/kg p.c., i.g.), TAM = Tamoxifeno (10 mg/Kg p.c., i.g.), EGb = extrato de *Ginkgo biloba* (50-100 mg/Kg p.c., i.p.). *Diferença significativa em relação ao grupo G1 (G4 < G1, p = 0,0234).

ANEXO 6

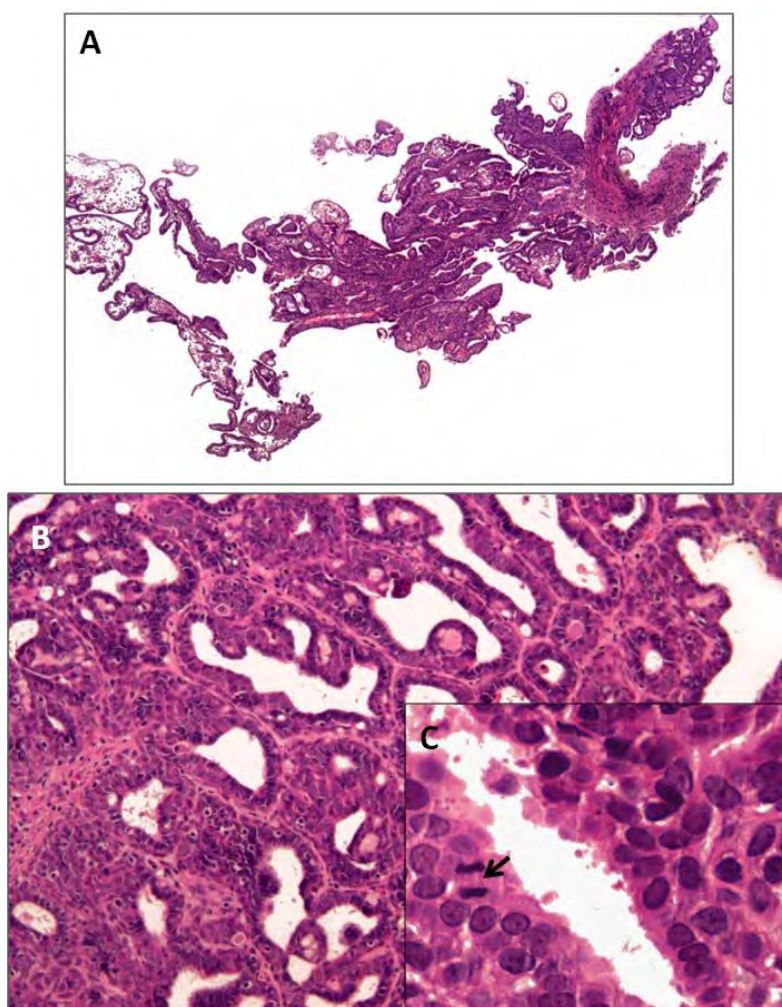


Figura 3 - Cortes histológicos corados em HE de um tumor mamário antes e após o tratamento experimental com EGb (G4). No início do tratamento o tumor apresentava características histológicas de neoplasias agressivas com 100% de área viva, como pode ser observado panoramicamente no corte histológico de biópsia (A), objetiva de 10x. Com a ausência de tamoxifeno no tratamento experimental, o mesmo tumor apresentou maioria de sua área total constituída por área viva ao final do (B), objetiva de 20x. Em maior aumento, observa-se a presença de numerosas células neoplásicas e mitose (seta (C), objetiva de 100x.

ANEXO 7

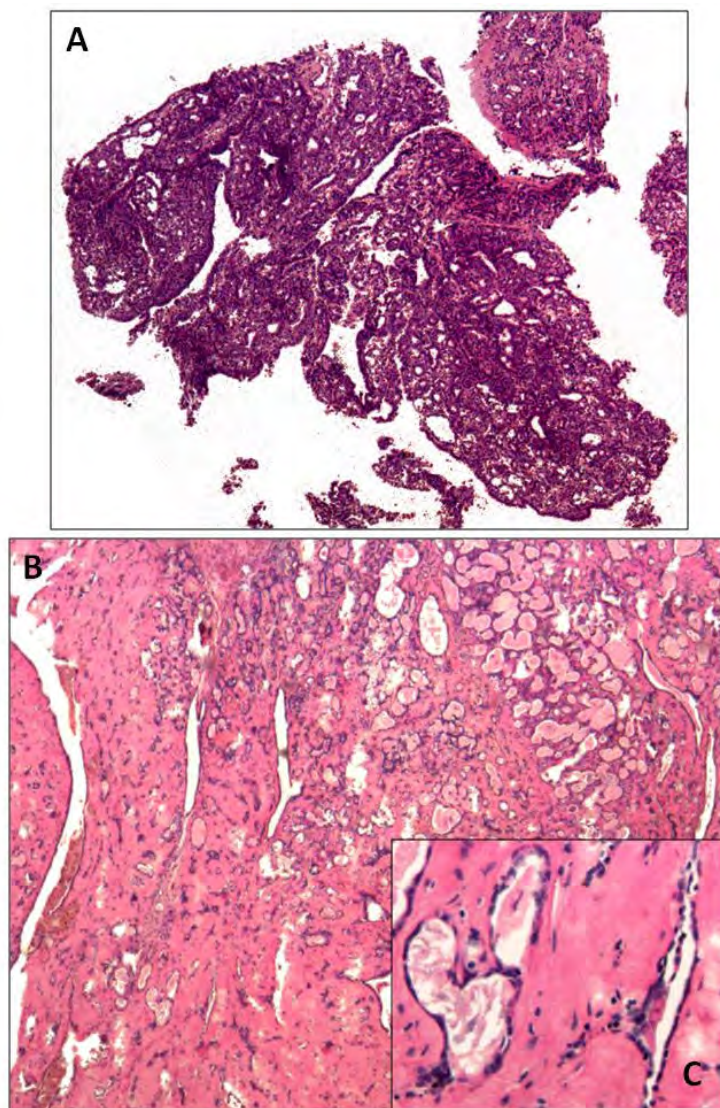


Figura 4 - Cortes histológicos corados em HE de um tumor mamário antes e após o tratamento experimental com tamoxifeno (G1). No início do tratamento o tumor apresentava características histológicas de neoplasias agressivas com 100% de área viva, como pode ser observado panoramicamente no corte histológico de biópsia (A), objetiva de 10x. Após o tratamento experimental, o mesmo tumor apresentou maioria de sua área total constituída por área em degeneração com hialinização estromal (B), objetiva de 10x. Em maior aumento, claramente observa-se a hialinização estromal e a reduzida espessura epitelial desse tumor (C), objetiva de 20x.

ANEXO 8

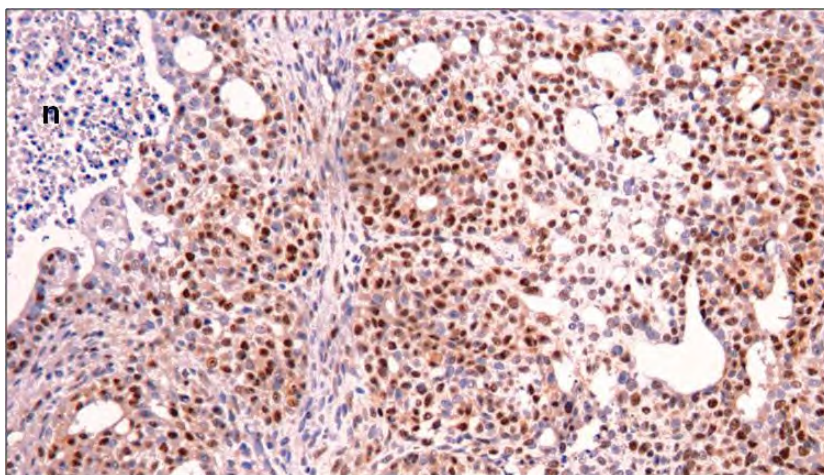


Figura 5 – Corte histológico de tumor mamário corado pela técnica de imunoistoquímica para PCNA. Nitidamente ocorre uma predominância de células marcadas (núcleos intensamente corados em marrom) nas áreas vivas tumorais. As áreas em necrose não expressam esse marcador (n), objetiva de 20x.