

ELAINE DIAS DO CARMO

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO SISTÊMICA DE EXTRATO
LIOFILIZADO DE *Pfaffia glomerata* NA CARCINOGENESE
QUIMICAMENTE INDUZIDA PELO DMBA EM PELE DE
CAMUNDONGOS *HAIRLESS***

**Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de São José dos Campos,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-
Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL,
Área Biopatologia Bucal.**

ELAINE DIAS DO CARMO

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO SISTÊMICA DE EXTRATO LIOFILIZADO DE
Pfaffia glomerata NA CARCINOGENESE QUIMICAMENTE INDUZIDA
PELO DMBA EM PELE DE CAMUNDONGOS *HAIRLESS***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em
BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal

Orientador: Prof. Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa

São José dos Campos

2007

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

Bellini AB. Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2006.

Carmo, Elaine Dias.

Avaliação da ação sistêmica de extrato liofilizado de *Pfaffia glomerata* na carcinogênese quimicamente induzida pelo DMBA em pele de camundongos *hairless*/ Elaine Dias do Carmo; orientador Luiz Eduardo Blumer Rosa. _São José dos Campos, 2007.

107p.;IL

Tese (Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal)- Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.

Palavras-chaves: Plantas medicinais; quimioprevenção; toxicidade de drogas; 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno; carcinoma espinocelular; camundongos endogâmicos HRS; imunoistoquímica

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 24 de outubro de 2007.

Assinatura:

E-mail: elaine@fosjc.unesp.br/ diaselaine@bol.com.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carmo ED. Avaliação da ação sistêmica de extrato liofilizado de *Pfaffia glomerata* na carcinogênese quimicamente induzida pelo DMBA em pele de camundongos *hairless*. [Tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 2007.

Banca Examinadora

1) Prof. Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP

2) Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro

Departamento Ciências da Saúde

Universidade Federal de São Paulo

3) Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Divisão de Farmacologia e Toxicologia

Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP

4) Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberback Brandão

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP

5) Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Célio e Wanda**, pelo amor que me orienta.

Ao meu marido, **Juarez**, pelo amor que me estimula.

Ao meu filho, **Thomás**, pelo amor que me inspira.

Ao meu sobrinho, **João Victor**, pelo amor que me encanta.

Aos meus irmãos, **Régis e Eneida**, pelo amor que me confiam.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, **Prof. Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa** pela orientação, amizade e incentivo à minha carreira acadêmica.

À **Profª Adj. Rosilene Fernandes da Rocha** pelo carinho, atenção e principalmente pela confiança em meu trabalho.

À **Profª. Drª. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão** pela amizade, dedicação e apoio inestimável durante todos estes anos.

À **Profª. Drª. Maria Nadir Gasparoto Mancini** pela amizade e colaboração em uma das etapas deste trabalho.

Às amigas, **Susana, Gisele, Renata e Vanessa** pela amizade e carinho a mim dispensados, e em especial, à **Andresa**, grande amiga, incentivadora, colaboradora e cúmplice deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", na pessoa do diretor da F.O.S.J.C. **Prof^o Dr. José Roberto Rodrigues** pelo incentivo ao ensino e a pesquisa.

À **Prof^a Dra. Cristiane Yumi Koga Ito**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, pela dedicação ao nosso curso.

À **Prof^a Adj. Yasmin Rodarte Carvalho** pela competência, dedicação e disposição em transmitir conhecimentos.

A **todos os docentes** do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal pela atenção que dedicaram à minha formação.

Aos alunos de Iniciação Científica **Ana Paula, Micheline, Paula, Mariana e Luciano** pelo auxílio inestimável durante todas as etapas deste trabalho.

À **Prof^a. Dr^a. Marília Trieveiler Martins** pela atenção com que me recebeu no Laboratório de Patologia/Imunoistoquímica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para realização de uma etapa deste trabalho.

A **todos os colegas** de Pós-Graduação pelo convívio harmonioso durante todos estes anos.

À amiga e técnica de laboratório, **Ana Lourdes da Silva Machado**, pela amizade e auxílio na confecção das lâminas.

À **Ângela de Brito Bellini**, Diretora dos Serviços de Biblioteca e Documentação, pela orientação e pelo excelente trabalho de revisão das normas de apresentação deste trabalho.

Às funcionárias da Pós-Graduação **Rose, Erena, Cidinha e Lilian** pela atenção e dedicação dispensadas.

Aos funcionários do Biotério, **Antônio e Lourival**, pelo auxílio na manipulação dos animais durante a fase experimental deste trabalho.

À **Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e à **Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (Fundunesp)** pelo apoio financeiro durante o curso de Doutorado.

"Devagar se vai ao longe, diz a moral da conhecida fábula de Esopo, da tartaruga e a lebre. Muitas coisas que não podem ser superadas de imediato cedem quando enfrentadas pouco a pouco. A assiduidade e a persistência são irresistíveis e, com o tempo, superam e destroem as mais poderosas forças, pois o tempo é amigo e protetor daqueles que usam o juízo para aguardar a melhor ocasião e é inimigo destruidor daqueles que se adiantam sem pensar."

William J. Bennett

SUMÁRIO

RESUMO	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 Carcinogênese.....	13
2.2 Carcinogênese química induzida pelo 9,10-dimetil-1,2 - benzantraceno.....	14
2.3 Modelos animais.....	16
2.4 Carcinoma de pele não-melanoma.....	17
2.5 Quimioprevenção.....	19
2.5.1 Plantas e seus derivados utilizados na quimioprevenção do câncer.....	21
2.6 <i>Pfaffia glomerata</i>	23
2.7 Toxicidade das plantas medicinais.....	26
2.8 Marcadores imunistoquímicos associados à proliferação, apoptose e angiogênese	33
3 PROPOSIÇÃO	39
4 MATERIAL E MÉTODO.....	40
4.1 Animais.....	40
4.2 Obtenção de extrato liofilizado de <i>Pfaffia glomerata</i>	40
4.3 Administração sistêmica da <i>P. glomerata</i>	41
4.4 Carcinogênese.....	42
4.5 Avaliação clínica.....	43
4.6 Procedimentos cirúrgicos.....	44
4.6.1 Biópsia das lesões de pele	44
4.6.2 Coleta de sangue.....	44
4.6.3 Remoção de fígado e rins.....	45

4.7 Avaliação histológica de pele.....	45
4.8 Avaliação imunoistoquímica.....	48
4.8.1 Análise quantitativa da expressão de PCNA, VEGF, bax e bcl-2.....	51
4.9 Avaliação toxicológica	52
4.9.1 Avaliação macroscópica de fígado e rins.....	52
4.9.2 Avaliação histológica de fígado e rins.....	52
4.9.3 Análises bioquímicas.....	53
4.9.3.1 Determinação da atividade enzimática de fosfatase alcalina (ALP).....	53
4.9.3.2 Determinação da atividade de aspartato aminotransferase (AST).....	54
4.9.3.3 Determinação da concentração de uréia.....	54
4.10 Análise estatística.....	55
5 RESULTADOS.....	56
5.1 Análise clínica.....	56
5.2 Análise histológica.....	58
5.3 Análise imunoistoquímica.....	62
5.4 Análise toxicológica.....	68
5.4.1 Análise macroscópica de fígado e rins.....	68
5.4.2 Análise histológica de fígado e rins.....	69
5.4.3 Análises bioquímicas.....	72
6 DISCUSSÃO.....	75
7 CONCLUSÃO.....	83
8 REFERÊNCIAS.....	84
Anexo.....	102
Apêndices.....	103
<i>ABSTRACT</i>	107

CARMO ED. Avaliação da ação sistêmica de extrato liofilizado de *Pfaffia glomerata* na carcinogênese quimicamente induzida pelo DMBA em pele de camundongos *hairless* [tese]- Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito da administração sistêmica de extrato liofilizado de *Pfaffia glomerata* em modelo de carcinogênese química em pele de camundongos *hairless*, bem como investigar a toxicidade hepática e renal das doses administradas. Foram utilizados 32 camundongos *hairless*, fêmeas com 5 semanas de vida, distribuídos em grupos controle (C) e experimentais (E1, E2 e E3). Os grupos E1, E2 e E3 receberam a administração sistêmica de extrato liofilizado de *P. glomerata* nas doses de 200, 400 e 1000 mg/Kg/dia, respectivamente, via oral, durante 15 semanas. O grupo C recebeu somente água filtrada. Duas semanas após o início da administração de extrato liofilizado de *P. glomerata*, os animais foram submetidos à carcinogênese química induzida pelo DMBA a 0,5% na região do dorso. Na 15ª semana foi realizada a avaliação clínica, biópsia das lesões de pele, coletada amostra de sangue e removidos fígado e rins dos animais. As lesões de pele seguiram para avaliação histopatológica e imunoistoquímica, os órgãos para análise histopatológica e as amostras de sangue para toxicológica. Nesta última, foram realizadas as análises da atividade enzimática de fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase e da concentração de uréia. Comparados os grupos C e E o teste estatístico de Kruskal-Wallis não mostrou diferença estatística significativa em relação ao tipo, tamanho e graduação de malignidade das lesões. Não foi observada significância nas análises de fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase e uréia. O teste de correlação de Spearman mostrou relação significativa para VEGF e PCNA e o qui-quadrado para infiltrado inflamatório em fígado e rins. Conclui-se que o tratamento com as doses de 200, 400 e 1000mg/kg/dia de extrato liofilizado de *P. glomerata* não apresentou ação quimiopreventiva e revelou indícios de toxicidade hepática e renal neste modelo experimental.

PALAVRAS-CHAVES: Plantas medicinais; quimioprevenção; toxicidade de drogas; 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno; carcinoma espinocelular; camundongos endogâmicos HRS; imunoistoquímica.

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma basocelular (CB) e o carcinoma espinocelular (CEC), classificados como carcinomas de pele não-melanomas (CPNMs), são as lesões malignas mais comuns em populações brancas em todo o mundo e sua incidência aumenta a cada ano^{8,37}.

Tal fato tem estimulado estudos com enfoque tanto preventivo quanto terapêutico. A quimioprevenção é uma das modalidades de controle do câncer de pele e consiste na utilização de agentes químicos naturais ou sintéticos que previnem e detêm a carcinogênese^{9,50,58}.

Diversos estudos têm validado o uso de compostos naturais e de seus derivados na quimioprevenção. Alguns destes compostos estudados, que têm sido identificados como potenciais agentes quimiopreventivos, são o chá verde, a cúrcuma, o alho, o tomate e a *Pfaffia*. Tais agentes naturais, administrados sistêmica ou topicamente, em modelos animais têm mostrado sua ação antineoplásica nos diferentes estágios da carcinogênese^{9,12,44,48,59,64,107}.

A busca por novos medicamentos é uma urgente necessidade na quimioprevenção do câncer, sendo que os naturais são considerados como uma rica e potencial reserva para a descoberta destas novas substâncias anticarcinogênicas¹¹⁰.

As pesquisas devem buscar compostos naturais que demonstrem eficácia farmacológica sem provocar efeitos colaterais, pois os medicamentos naturais podem causar danos irreversíveis ao usuário, decorrentes, por exemplo, da interação destes com outras plantas e até mesmo com outros medicamentos alopáticos^{25,32}.

As plantas do gênero *Pfaffia*, mostram-se promissoras na quimioprevenção do câncer, já que os estudos em modelos animais demonstraram suas propriedades antiinflamatória e antineoplásica e a segurança de uso em relação à toxicidade^{74,106,107,127}, justificando, desta maneira, a realização deste trabalho.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O câncer é um dos mais antigos males da humanidade¹²⁸. A denominação câncer foi utilizada pela primeira vez por Galeno (aproximadamente 138-201 d.C.), origina-se da tradução latina da palavra grega *Karkinos* (crustáceo, caranguejo)²⁰ e sua relação com carcinoma deveu-se presumivelmente ao fato deste infiltrar qualquer região tecidual, agarrando-se de modo obstinado à semelhança de um caranguejo³³.

O câncer é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo⁴⁹.

A etiopatogenia do câncer é entendida como resultado da quebra dos mecanismos reguladores que governam o comportamento de crescimento normal das células, ou seja, a regulação é perdida nas células cancerosas que se proliferam de maneira descontrolada, independente da necessidade de renovação celular, e finalmente espalham-se por todo o organismo, interferindo nas funções dos tecidos e órgãos^{31,69}.

2.1 Carcinogênese

A carcinogênese envolve uma complexa sucessão de eventos, que usualmente se desenvolve durante muitos anos e pode ser dividida em três estágios: iniciação, promoção e progressão^{20,31,53,67}.

A iniciação é o resultado de uma alteração genética que leva à proliferação anormal de uma única célula^{31,53}. Além desta alteração, ou seja, da modificação no DNA, são necessárias a replicação e a proliferação celular para que a mutação possa se fixar⁶⁷.

Durante a promoção da neoplasia, o material genético alterado das células iniciadas modifica a expressão dos genes que regulam a diferenciação e o crescimento celular⁶⁷, resultando na proliferação ou expansão clonal das células iniciadas^{20,53}.

Muitos carcinógenos são tanto iniciadores quanto promotores. Entretanto, uma dose baixa não indutora torna-se efetiva se administrada juntamente com substâncias não carcinogênicas, como por exemplo, o 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA), conhecido promotor de neoplasia. Tais substâncias podem levar à alterações da proliferação celular e da expressão fenotípica⁶⁷.

O terceiro estágio da carcinogênese consiste na transformação de uma lesão pré-maligna para uma maligna, o que envolve sucessivas modificações na expressão gênica das células neoplásicas, além de depender também de fatores do hospedeiro^{20,67}.

O câncer representa o resultado final de toda seqüência e é estabelecido quando as células adquirem a capacidade autônoma de invasão e metástase⁵³.

2.2 Carcinogênese química induzida pelo 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno

A observação de que a exposição dos seres humanos a determinadas substâncias presentes no meio ambiente ou em seu local de trabalho poderiam levar ao desenvolvimento do câncer é muito antiga, datando do final do século XVIII⁶⁷.

Percival Pott (1775), conforme relatado em alguns trabalhos^{20,37,67}, foi o primeiro a observar que o câncer poderia ser causado por agentes químicos, descrevendo que limpadores de chaminé apresentavam risco aumentado de desenvolver CEC de escroto, devido à exposição aos produtos do carvão e da fuligem que se depositavam sobre a pele.

Os principais carcinógenos químicos capazes de desencadear neoplasias malignas são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), as aminas aromáticas, os azocompostos, as nitrosaminas, os alquilantes, as aflatoxinas e o asbesto²⁰.

Os HPAs são uma importante classe de agentes químicos mutagênicos, encontrados no ambiente ocupacional e residencial e estão entre os mais perigosos poluentes atmosféricos. Originam-se da queima de plantações agrícolas, da indústria metalúrgica, da combustão do carvão mineral e de derivados de petróleo, da fumaça de cigarro e da produção de plásticos, pesticidas e tintas. Podem ser encontrados em alimentos defumados, frutas, grãos e vegetais devido à deposição atmosférica sobre estes últimos^{11,20,69,94}.

Os HPAs são moléculas orgânicas formadas por átomos de hidrogênio e carbono encontradas como subprodutos da combustão incompleta de matéria orgânica. Estes compostos não são ativos na forma em que são ingeridos ou inalados, tornando-se reativos apenas após serem enzimaticamente convertidos por meio de reações específicas do metabolismo⁶⁹. São ativados pelo citocromo P450 e pelas hidrolases, produzindo epóxidos capazes de se ligar ao DNA e iniciar o processo de carcinogênese¹¹.

O 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) é o carcinógeno mais potente dentre os HPAs e é considerado um carcinógeno completo, pois possui atividades iniciadora e promotora simultâneas⁵².

2.3 Modelos animais

As exposições controladas de seres humanos às substâncias perigosas ou potencialmente perigosas são restringidas por considerações éticas. Deste modo, recorrem-se aos estudos em animais, como modelos experimentais para que se possa analisar de maneira comparativa os efeitos que estas substâncias provocariam em humanos⁶.

A carcinogênese química induzida em animais de laboratório data de 1915, quando Yamagiwa e Ichikawa¹²³, de acordo com Boffeta et al.¹⁵, desenvolveram carcinomas de pele em coelhos, após aplicações de carvão mineral. Em 1925, de acordo com citação de Eveson⁴¹, Bonne¹⁸ descreveu o desenvolvimento de papilomas na mucosa bucal e no estômago de ratos que tiveram sua pele pincelada também com carvão mineral. Os animais lambiam-se e provocavam lesões nestes locais.

A combinação essencial entre um tecido suscetível e um carcinógeno potente foi descoberta por Salley¹⁰³, de acordo com a citação de HELLER et al.⁵⁴, quando ele demonstrou que aplicações de HPAs produziam CEC em bolsa jugal de hamsters. Desde então, diversos estudos têm utilizado o DMBA para a indução da carcinogênese em diferentes órgãos, tecidos e sítios anatômicos^{16,26,43,60,71-2,77}.

A pele tem sido muito utilizada no estudo da carcinogênese química experimental, devido às facilidades de manipulação e de observação das lesões^{20,52}.

Estudos têm mostrado grande sucesso na utilização dos camundongos *hairless* na indução da carcinogênese cutânea, sendo que as principais vantagens são a facilidade de aplicação do carcinógeno, o aparecimento de lesões em um menor período de latência e a avaliação dos resultados^{26,61,89,93,112}.

Em 1924, a mutação *hairless* (Hr^{hr}) foi encontrada em um camundongo encontrado em um aviário em Londres, o qual foi levado ao The Jackson Laboratory em 1956, onde o Dr. Green cruzou este animal com uma fêmea BALB/c. Posteriormente, os descendentes foram cruzados entre si e em 1964, na geração F24, a espécie foi nomeada HRS/J¹¹⁷.

A acetona é o veículo mais utilizado na diluição do pó de DMBA, pois desde o trabalho de Salley¹⁰³, citado por Heller et al.⁵⁴, estabeleceu-se que a acetona era menos tóxica, provocava menor índice de mortalidade e exigia menor período de latência para o desenvolvimento do CEC.

A concentração da solução de DMBA varia nos diversos estudos, contudo a concentração de 0,25 a 0,5% são as mais utilizadas na iniciação e na promoção da carcinogênese. As aplicações tópicas variam de doze a cinquenta semanas, de acordo com o tipo histológico da lesão a ser desenvolvida^{16,26,43,61,125}.

2.4 Carcinoma de pele não-melanoma

O processo de reorganização global, ou seja, a alteração na demografia mundial, devido à redução nas taxas de mortalidade e natalidade com aumento da expectativa de vida e envelhecimento, determinou grande modificação nos padrões de saúde-doença no mundo. Tal modificação, conhecida como transição epidemiológica, foi caracterizada pela mudança no perfil de mortalidade com diminuição da taxa de doenças infecciosas e aumento da taxa de doenças crônico-degenerativas, especialmente as doenças cardiovasculares e o câncer⁴⁹.

Alguns tipos de cânceres têm se tornado mais freqüente em países onde existem fatores de risco como fumo, hábitos alimentares

pouco saudáveis e exposição a produtos químicos e a agentes físicos carcinogênicos no trabalho ou no meio ambiente¹²⁸.

Nos Estados Unidos são diagnosticados mais de um milhão de novos casos de câncer de pele anualmente, representando aproximadamente 40% de todos os novos casos de câncer diagnosticados. Aproximadamente 80% dos cânceres cutâneos são representados pelo carcinoma basocelular, 16% pelo carcinoma espinocelular e 4% pelo melanoma³⁸.

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCa), órgão vinculado ao Ministério da Saúde, a neoplasia maligna mais freqüente na população brasileira é o CPNM. Foi estimado para o ano de 2006, um total de 116.640 novos casos, sendo 55.480 em homens e de 61.160 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 61 casos novos a cada 100 mil homens e 65 para cada 100 mil mulheres¹⁹.

O CPNM origina-se dos queratinócitos da epiderme, sendo que o CB pode causar grande morbidade, apesar de apresentar crescimento lento e raramente provocar metástase, ao contrário do CEC que metastatiza com freqüência³⁸.

O crescente aumento do número de casos de CPNM deve-se a uma maior exposição dos indivíduos à radiação ultravioleta (UV) do Sol, que é considerado o principal fator etiológico do CPNM^{8,118}. Contudo, a exposição aos agentes químicos como os HPAs, compostos orgânicos voláteis e metais pesados também levam ao desenvolvimento desta neoplasia¹¹.

A pele é um dos trajetos de entrada de agentes químicos no corpo, sendo considerada como porta de entrada, pois quando os poluentes penetram na pele, atingindo camadas abaixo da derme, e alcançam a circulação sanguínea, podem causar danos a outros órgãos¹¹.

2.5 Quimioprevenção

Apesar da alta incidência e dos inúmeros fatores de risco, o CPNM apresenta altas taxas de cura quando diagnosticado precocemente, além de ser passível de prevenção³⁷.

A prevenção primária é uma das principais abordagens para o controle do câncer de pele e o seu objetivo é reduzir a incidência destas lesões. Para tal, preconiza-se evitar a exposição aos agentes carcinógenos; aumentar os mecanismos de defesa do hospedeiro, através da correção de deficiências nutricionais e estimular o consumo de dietas diversificadas⁵⁸.

O aumento da incidência de câncer em todo o mundo tem estimulado os estudos em prevenção, sendo a quimioprevenção uma promissora estratégia para se evitar a ocorrência de vários tipos de cânceres, inclusive o carcinoma de pele¹¹⁸.

O termo quimioprevenção foi descrito pela primeira vez por Sporn¹⁰⁹ em 1976, quando este se referiu à prevenção do desenvolvimento do câncer através do uso de formas naturais da vitamina A e de seus análogos sintéticos, denominados retinóides.

Atualmente, a quimioprevenção é definida como uma estratégia intervencionista que consiste na administração de um ou mais agentes naturais ou sintéticos que previnem ou detêm a carcinogênese^{48,50,58}.

A quimioprevenção, além de atuar na prevenção primária, quando se quer evitar que indivíduos saudáveis venham a ter câncer, pode atuar na prevenção secundária, quando a finalidade é bloquear a evolução de lesões pré-malignas para câncer, e finalmente na prevenção terciária, quando se quer evitar ou impedir o aparecimento de segundos tumores primários⁷⁶.

Desta maneira, existem três grupos de indivíduos candidatos a quimioprevenção: indivíduos da população em geral, indivíduos que sabidamente têm risco aumentado para o desenvolvimento do câncer e indivíduos que já tiveram câncer, com a finalidade de impedir um segundo tumor^{76,118}.

Os agentes quimiopreventivos, naturais ou sintéticos, podem ser divididos em duas categorias: agentes bloqueadores e agentes supressores. Os agentes bloqueadores são compostos que impedem os carcinógenos de alcançarem ou interagirem com o tecido alvo, atuando como uma barreira. Deste modo, agem prevenindo a ativação de carcinógenos ou de promotores da neoplasia, inativando-os antes que atinjam o tecido alvo. Já os agentes supressores impedem a evolução do processo neoplásico em células que, de outra forma, se tornariam malignas⁷⁶.

Os estudos em quimioprevenção ganharam força quando se observou que o uso de inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2) agia na prevenção do câncer colo-retal. Verificou-se que pacientes que usavam continuamente a Aspirina® para problemas cardiovasculares e cerebrais, apresentavam menor incidência de câncer colo-retal, e em menor proporção, outros tipos de cânceres¹²⁴.

Atualmente, o mais importante nos estudos em quimioprevenção é a padronização e o teste de novos agentes que agem em alvos moleculares e celulares específicos. Além disso, é essencial que a eficácia e a segurança destes novos agentes sejam validadas em modelos experimentais em animais e em cultura de células antes de serem realizados os testes clínicos¹¹⁰.

2.5.1 Plantas e seus derivados utilizados na quimioprevenção do câncer

A utilização de plantas com fins medicinais para prevenção e tratamento de doenças é uma das mais antigas formas de prática médica da humanidade¹²⁰.

Foi através da observação e da experimentação pelos povos primitivos que as propriedades terapêuticas de determinadas plantas foram sendo descobertas e propagadas de geração em geração, fazendo parte da cultura popular¹¹⁹. A informação, no início, foi transmitida verbalmente, contudo após o aparecimento da escrita, passou a ser compilada e guardada como um tesouro precioso³⁴.

Atualmente, observa-se que a cada dia aumenta o interesse e o consumo de plantas medicinais. Este fato é promovido pela insatisfação com a medicina convencional; pelo desenvolvimento de novas doenças com complicações severas e para as quais ainda não há tratamento adequado; pela crença de que ervas medicinais são inócuas e superiores às substâncias sintéticas; pela idéia de que aquilo que é natural só pode ser bom e pela atenção que movimentos ecológicos têm dado aos remédios naturais^{24,25,113}.

Na prevenção e tratamento do câncer, as plantas também exercem um importante papel⁷³, pois muitos agentes quimiopreventivos e quimioterápicos utilizados atualmente são derivados de plantas. Estima-se que 2/3 dos medicamentos antineoplásicos aprovados em todo o mundo sejam derivados de plantas¹²¹.

Uma ampla variedade de fitoquímicos, compostos químicos derivados de plantas, é considerada como a maior fonte de medicamentos antineoplásicos. Os fitoquímicos com potencial para quimioprevenção têm sido classificados em grupos como: carotenóides, isotiocianatos, glucosinolatos, sulfidos, saponinas, polifenóis e flavanóides^{27,55,59,124}.

O paclitaxel e o docetaxel são agentes quimioterápicos oriundos da planta *Taxus brevifolia* e utilizados no combate ao câncer de mama, pulmão e ovário. As substâncias irinotecano, topotecano, 9-aminocamptotecina e 9-nitrocamptotecina obtidas da planta *Camptotheca acuminata* são utilizadas no tratamento do câncer de mama, ovário, pulmão e colo-retal⁷³.

Experimentos avaliando agentes quimiopreventivos naturais, plantas medicinais e seus derivados em modelos animais e em cultura de células têm mostrado a ação anticarcinogênica e não-tóxica destas substâncias, através de efeitos inibitórios em vários estágios da carcinogênese. Os mecanismos pelos quais tais compostos exercem sua ação inibitória, ainda não estão totalmente elucidados. Porém, acredita-se que na iniciação, estimulam a resposta imunológica, alteram o metabolismo, aumentam a detoxificação do carcinógeno e aumentam a reparação do DNA. Na promoção e progressão, induzem a supressão de genes, suprimem a proliferação celular, bloqueiam danos oxidativos ao DNA, estimulam a apoptose e inibem a angiogênese^{44,126}.

A oxidação apresenta um papel relevante em muitas doenças crônicas da pele, e também na iniciação e promoção da carcinogênese. Estudos têm mostrado que carcinógenos ambientais, incluindo a luz UV do Sol, à qual a população está constantemente exposta, exercem seus efeitos biológicos em parte pela geração de espécies de oxigênio reativo (ERO) e radicais livres. A geração de ERO e de radicais livres apresenta papel importante na indução do câncer de pele, especialmente na fase de promoção da carcinogênese. Assim, os efeitos dos compostos antioxidantes presentes nas frutas e vegetais têm recebido atenção especial com intuito de utilizá-los como agentes quimiopreventivos do carcinoma cutâneo⁵⁰.

2.6 *Pfaffia glomerata*

Dentre as plantas medicinais nativas brasileiras mais utilizadas nos últimos anos, destacam-se as espécies do gênero *Pfaffia*, conhecidas popularmente como ginseng brasileiro, para-tudo e fáfia^{92,97}. A espécie tem sido indicada para o tratamento de anemia, distúrbios gástricos, doenças reumáticas, diabetes mellitus, fadiga crônica, estresse e como coadjuvante no tratamento do câncer^{45,74,87,88,92,116}.

São conhecidas cerca de 90 espécies de *Pfaffia*, distribuídas na América Central e na América do Sul. No Brasil, foram descritas 27 espécies, sendo que as mais conhecidas são a *Pfaffia paniculata*, a *glomerata* e a *iresinoides*, encontradas principalmente nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Mato Grosso e Amazonas^{74,81,116}.



Figura 1 – *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. Disponível em: <http://fm2.fieldmuseum.org/plantguides/jpgs/AMRA.pfaf-gl-bra-6282.jpg>.

A planta apresenta como característica ramos moles e nodosos nas articulações, sendo que a parte subterrânea é tuberosa,

apresentando uma parte de caule e a outra de raiz, que atinge porte elevado. As folhas são opostas, membranáceas, simples e inteiras e as flores pequenas surgem nos ramos terminais⁹².

São encontradas algumas diferenças interespecíficas na composição química das espécies de *Pfaffia*, que podem definir perfis farmacológicos e toxicológicos distintos, além de auxiliar na diferenciação das espécies⁹⁹.

A *P. glomerata* apresenta os ácidos glomérico, famérico e oleanólico, além de ecdisterona e rubrosterona¹⁰⁵. Na *P. iresinoides* são encontrados a 25-0- β -D-glicopiranosil ecdisterona, 24-0- β -D-glicopiranosil pterosterona, B-25-0- β -D-glicopiranosil-podecdisona, iresinosídeo A e B e chikusetsusaponina⁸⁴. A *P. paniculata* contém em sua composição química dois fitoesteróis: sitosterol e estigmasterol que inibem a absorção do colesterol, além de outros componentes, tais como β -ecdisona, saponinas, alantoína, nortriterpenos, fafosídeos A, B, C, D, E, F e ácido fático^{79,84,90,115}.

Estudos têm mostrado a ação analgésica e antiinflamatória da *Pfaffia* em modelos animais^{75,82,116}. Em adição, de acordo com Neto et al.⁸¹, a *P. glomerata* é usada popularmente como “novalgina”.

Mazzanti e Braghioli⁷⁵ avaliaram a atividade analgésica e antiinflamatória do extrato alcoólico de *P. paniculata* nas doses de 2,5; 5 e 10 g/kg em testes de placa quente e de indução de edema em patas de ratos. Observaram que o extrato apresenta atividade antiinflamatória neste modelo de inflamação aguda, pois houve a inibição do edema. Verificaram ainda que é efetivo em dores inflamatórias, contudo não apresenta resultado positivo em dores não-inflamatórias, pois foi ineficaz no teste da placa quente. Concluíram que o extrato de *P. paniculata* tem ação analgésica e antiinflamatória e apresenta baixa toxicidade, pois não foi observado exsudato inflamatório no peritônio dos animais tratados.

O extrato aquoso de *P. iresinoides* em dose única de 25 e 50mg/Kg, apresentou efeito antiinflamatório em modelo de indução de

inflamação em ratos. Os resultados mostraram que o pó das raízes de *P. iresinoides* é efetivo em doenças reumáticas, quando administrado repetidas vezes por algumas semanas¹¹⁶.

Freitas et al.⁴⁵ examinaram os efeitos do extrato aquoso de *P. glomerata* no trato gastrintestinal. Foram utilizados ratos Wistar pré-tratados com a administração oral de 125, 250, 500 e 1000mg/Kg de *P. glomerata* e com indometacina (20mg/Kg, via subcutânea), antes da indução de úlceras pelos métodos de estresse restrito a hipotermia (3 horas a 4º C), etanol (administração oral de 0,5 ml de etanol a 70%). Os resultados mostraram que a administração oral de *P. glomerata*, uma hora antes da indução de lesões gástricas por estresse e pelo etanol diminuiu o número total de lesões gástricas, o que não foi observado com a indometacina. Concluíram que a *P. glomerata* é capaz de proteger a mucosa gástrica e inibir a secreção de ácido gástrico.

Neto et al.⁸² avaliaram os efeitos antiinflamatório e analgésico do extrato hidroalcoólico de *P. glomerata* nas doses de 100, 200 e 300 mg/Kg. Para a avaliação da ação antiinflamatória foi induzido edema em uma das patas do rato e para avaliar o efeito analgésico foi usado o teste da placa quente, sendo que a resposta foi determinada a cada 30 minutos, durante 120 minutos. O extrato de *P. glomerata* foi administrado 30 minutos antes da indução de edema e do teste da placa quente. Os resultados mostraram que tanto o efeito antiinflamatório quanto o analgésico foram similares aos observados com os antiinflamatórios não-esteroidais, como a indometacina, sugerindo que o mecanismo de ação da *P. glomerata* deve estar associado à inibição da síntese de prostaglandina.

Estudos *in vitro* têm demonstrado que o extrato da raiz de *P. glomerata* não apresenta efeito citotóxico sobre linhagens de células tumorais⁹⁹. Contudo, experimentos com animais têm mostrado a ação anticarcinogênica da *P. paniculata*^{74,106,107,127}.

Watanabe et al.¹²⁷, estudando o efeito da administração subcutânea e intraperitoneal de *P. paniculata* sobre a incidência de leucemia espontânea em ratos AKR/J, observaram que houve supressão da doença quando os animais tratados foram comparados com os controles.

Matsuzaki et al.⁷⁴ investigaram a ação da administração oral da *P. paniculata* no crescimento do tumor de Ehrlich em sua forma ascítica. Verificaram que o volume total dos tumores foi significativamente menor nos camundongos tratados, quando comparados com os animais do grupo controle. Os resultados sugerem que este efeito está relacionado à atividade antiinflamatória da *P. paniculata*.

Silva et al.¹⁰⁷ avaliaram os efeitos quimiopreventivos das raízes de *P. paniculata* em lesões pré-neoplásicas hepáticas em camundongos BALB/c. Os resultados do estudo mostraram que o tratamento reduziu a incidência, a área e o número de lesões, indicando a propriedade antineoplásica da *P. paniculata* e sua ação nas fases de promoção e progressão da hepatocarcinogênese.

Não há relato na literatura demonstrando a ação antineoplásica da *P. glomerata* em estudos *in vivo*, e aqueles que utilizam a *P. paniculata* são escassos e não comprovam, apenas sugerem, quais são os mecanismos de ação desta planta no processo de carcinogênese. Desta maneira, novos estudos que comprovem a eficácia farmacológica e o mecanismo de ação das plantas do gênero *Pfaffia* em modelos animais de carcinogênese são necessários.

2.7 Toxicidade das plantas medicinais

Nos países em desenvolvimento, bem como nos desenvolvidos, os apelos da mídia para o consumo de produtos à base de

fontes naturais aumentam a cada dia. Os ervanários prometem saúde e vida longa, com base no argumento de que as plantas são efetivas e seguras para o uso em um grande número de doenças¹²⁰.

Contudo, a idéia de que as plantas e seus derivados são seguros e estão livres de efeitos colaterais é falsa, pois estas podem conter centenas de constituintes em sua composição e alguns deles podem ser altamente tóxicos²⁴.

A toxicidade das plantas medicinais é conhecida desde a Antigüidade, quando o filósofo e botânico Teofrasto, escreveu a sua obra “História das Plantas”, em que deixou descrições botânicas preciosas sobre as propriedades curativas e os efeitos tóxicos das plantas³⁴.

Atualmente, entende-se que a toxicidade das plantas medicinais é um sério problema de saúde pública, pois podem provocar graves efeitos colaterais. Tais efeitos podem ser causados pela toxicidade natural dos constituintes da planta, pois esta pode apresentar substâncias potencialmente perigosas. Pesquisas têm mostrado que muitas plantas possuem substâncias potencialmente agressivas, devendo ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos^{25,120}.

Outros fatores também têm sido associados aos riscos de efeitos colaterais, como o uso concomitante de diferentes plantas; interações entre plantas medicinais e medicamentos alopáticos; automedicação; efeitos de superdosagens; presença de contaminantes como microrganismos, metais pesados e agrotóxicos; armazenagem inadequada do produto; adulteração durante o acondicionamento e forma de uso^{25,32,98,111,120}.

As plantas medicinais possuem atividade farmacológica significativa, e conseqüentemente, podem interagir com outras plantas e com os medicamentos alopáticos¹¹³, como corticosteróides, fármacos depressores do sistema nervoso central e analgésicos opióides, produzindo sérios efeitos colaterais⁶². Um exemplo clássico é o uso concomitante de antiinflamatórios não-esteroidais e ervas que apresentam

atividade antiplaquetária, levando a um aumento do risco de sangramento estomacal ou de qualquer outro órgão¹.

As interações medicamentosas podem ser sinergistas, quando a planta aumenta ou potencializa a ação do medicamento. Mas, podem ser também antagonistas, pois as interações entre a planta medicinal e o medicamento alopático envolvem mecanismos farmacodinâmicos e farmacocinéticos que podem resultar em efeitos benéficos ou colaterais¹.

A automedicação também é um grave problema, pois os pacientes nem sempre mencionam a utilização de plantas medicinais quando questionados sobre o uso de medicamentos²⁸. Estudos mostram que 70% dos pacientes não revelam ao seu médico ou a outro profissional de saúde que estão usando algum tipo de medicamento natural^{32,62}.

Outro grande risco para a população são os fitoterápicos contaminados com metais pesados, principalmente arsênio e mercúrio, que causam efeitos tóxicos graves, como neuropatia e dor abdominal aguda^{32,36}. O risco aumenta para aqueles fitoterápicos importados de países asiáticos, uma vez que suas formulações são bastante diferentes das preparadas pelos ocidentais, contendo altas concentrações de metais pesados, muitas vezes, ultrapassando os valores seguros para o consumo¹²⁰.

Com relação à adulteração, muitas preparações são usualmente compostas por uma mistura de diversas ervas, que podem conter um grande número de substâncias com propriedades desconhecidas, toxicidade pré-existente e efeitos incertos^{36,83}.

Existe também o risco da adulteração do medicamento natural com antiinflamatórios esteroidais e não-esteroidais, estimulantes do sistema nervoso central, diuréticos e antibióticos^{32,36,39,83}.

A possibilidade de contaminações com microrganismos deve ser atentamente observada, em especial quando se faz uso de plantas

medicinais vendidas em feiras e mercados populares, como ocorre comumente no Brasil¹²⁰.

Na Europa há mais controle no registro e na comercialização dos produtos obtidos de plantas, pois as normas para a certificação e o controle de qualidade de preparações vegetais são mais rígidas. No Brasil, as pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais. Desta maneira, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, e muitas vezes são empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados por silvícolas¹²⁰.

A crença de que medicamento natural não faz mal e o seu uso inadequado tem provocado diversos efeitos colaterais na população, podendo atingir diferentes órgãos e sistemas, como coração, fígado, pele, rins e sistema nervoso^{40,83,107}.

É importante ressaltar ainda que o risco de efeitos colaterais aumenta em crianças, idosos e, particularmente, em gestantes, pois as plantas medicinais nem sempre são testadas quanto aos seus efeitos abortivo e teratogênico^{1,32}.

O padrão dos efeitos colaterais desencadeados por plantas medicinais é similar ao observado com o uso de medicamentos alopáticos⁸³. Os efeitos colaterais mais observados em pacientes que fazem uso de plantas medicinais prescritas por um profissional ou por automedicação são as reações alérgicas, tóxicas, cefaléia, náusea, vômito, diarreia, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e convulsão²⁵.

As reações alérgicas podem variar de uma dermatite de contato, passando por erupções pruriginosas, urticária, fotosensibilização, chegando até a reação anafilática. Estudos têm mostrado que a erva de São João (*Hypericum perforatum*), babosa (*Aloe vera*), eucalipto (*Eucalyptus glóbulos*) e henna (*Lawsonia inermis*) podem causar sérios

efeitos colaterais na pele. Ervas medicinais que contêm arsênio e mercúrio em sua composição também podem desencadear lesões dérmicas^{13,39}. Os óleos essenciais usados topicamente para aromaterapia e em cremes podem causar fotosensibilização³⁹.

Ernst⁴⁰ relata que algumas plantas medicinais, como o ginseng (*Panax ginseng*), valeriana (*Valeriana officinalis*), ginkgo (*Ginkgo biloba*) e a erva de São João (*Hypericum perforatum*) têm sido associados a efeitos psiquiátricos e neurológicos adversos. Foram relatados efeitos como arterite cerebral, edema cerebral, delírio, coma, confusão, encefalopatia, alucinações, hemorragia intracerebral, distúrbios de humor, desordens de movimento, fraqueza muscular e parestesia. Estes efeitos estão relacionados aos constituintes das plantas, à sua contaminação e/ou adulteração, às interações com outros medicamentos e à superdosagem.

As plantas medicinais e/ou seus metabólitos podem provocar lesões celulares principalmente no fígado e nos rins, devido à intensa participação destes órgãos na degradação e excreção desses produtos⁵¹.

A atividade metabólica do fígado é bem conhecida por sua capacidade de detoxificar ou excretar na bile muitos medicamentos⁵¹. A lesão hepática provocada por medicamentos, resulta de toxicidade direta; da conversão hepática de um xenobiótico em uma toxina ativa; ou de mecanismos imunes, em geral por uma droga ou metabólito que atua como hapteno para converter uma proteína celular em um imunógeno³³.

Os medicamentos naturais são biotransformados no fígado pela ação de enzimas metabolizadoras, tais como as enzimas do sistema citocromo P450, monooxigenases, glutationa-S-transferase, sulfotransferases e UDP-glucuronosiltransferases^{111,113}.

As injúrias no fígado provocadas pelos remédios naturais incluem principalmente aumento dos níveis séricos das transaminases, necrose focal, esteatose, injúria ducto-biliar, injúria vascular,

especialmente doença veno-oclusiva, hepatite aguda e crônica, colestase e cirrose^{28,111,113}.

Tais injúrias são freqüentemente causadas por alcalóides pirrolizidínicos encontrados em grande número de plantas medicinais, como por exemplo, no confrei (*Symphytum officinalis*) que possui potencial hepatotóxico^{28,111,113}. Há alguns anos, o confrei levou à ocorrência de óbitos, decorrentes de cirrose resultante de doença hepática veno-oclusiva, e desta forma, teve seu uso condenado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e foi legalmente proibido no Brasil para o uso interno (Portaria 10/SVS, 10.03.1992)^{98,120}.

A avaliação da toxicidade hepática pode ser realizada por meio da análise histológica do fígado e também por análises bioquímicas em que pode ser investigada a dosagem de fosfatase alcalina (ALP) e aspartato aminotransferase (AST); enzimas cuja elevação sérica constitui-se em indicativo de hepatotoxicidade⁹⁶.

A AST também conhecida como transaminase glutâmico-oxalacética (GOT ou TGO) é uma enzima encontrada em concentração muita alta no músculo cardíaco, fígado, músculos esqueléticos e em menor concentração nos rins e pâncreas⁶⁶.

Nas células hepáticas, a AST localiza-se no citoplasma e na mitocôndria. Lesões ou doenças hepatocelulares de qualquer etiologia (hepatite aguda e crônica, disfunção hepática induzida por medicamentos, tumor hepático metastático, cirrose, etc) afetando o parênquima hepático libera uma maior quantidade da enzima para a corrente sanguínea, elevando os níveis séricos da AST⁶⁶.

A fosfatase alcalina compreende um grupo de enzimas fosfohidrolase encontrada em vários tecidos, com maiores concentrações no fígado, epitélio do trato biliar e tecido ósseo. No fígado, a fosfatase alcalina é secretada pelos hepatócitos e pelas células do trato biliar. Patologias como cirrose, obstrução biliar intra e extra-hepática, tumor primário ou metastático do fígado e disfunção hepática induzida por

medicamentos podem aumentar os níveis de fosfatase alcalina na circulação sanguínea⁶⁶.

Os rins também são bastante afetados pela eliminação de substâncias tóxicas, pois constituem o principal mecanismo de excreção dos metabólitos, dos quais o organismo já não necessita. Entre estas substâncias incluem-se a uréia, creatinina, ácido úrico, os produtos finais da degradação da hemoglobina, como a bilirrubina e os metabólitos de diversos hormônios. Estas substâncias têm que ser eliminadas do corpo tão rapidamente quanto são produzidas. Os rins também eliminam toxinas e outras substâncias ingeridas, como pesticidas, medicamentos e aditivos alimentares⁵¹.

A uréia, a creatinina e o ácido úrico são compostos nitrogenados não-protéicos (NNP) formados no organismo a partir do catabolismo das proteínas, ácidos nucleicos e aminoácidos. Como os rins exercem uma função importante na excreção dos metabólitos citados, a determinação laboratorial destes é muito empregada para o diagnóstico, prognóstico e acompanhamento de diversas patologias renais⁶⁶.

A uréia é o principal composto NNP do sangue, sendo formada no fígado a partir da amônia e do gás carbônico, através do ciclo da uréia. Mais de 90% da uréia formada no fígado é eliminada pelos rins, pele e trato gastrointestinal. Nos rins, a uréia é filtrada livremente e cerca de 40 a 70% sofre reabsorção passiva nos túbulos renais⁶⁶.

Desta maneira, é essencial que as plantas medicinais sejam avaliadas em modelos experimentais quanto a seu possível potencial tóxico e que demonstrem eficácia farmacológica antes de serem comercializadas.

2.8 Marcadores imunoistoquímicos associados à proliferação, apoptose e angiogênese

Os métodos imunoistoquímicos baseiam-se na utilização de anticorpos que reconhecem antígenos específicos e, portanto, realçam os constituintes específicos das células²¹.

A imunoistoquímica é uma técnica essencialmente qualitativa. Embora métodos quantitativos sejam muito utilizados para determinar o número de elementos presentes ou a intensidade da reação, seu objetivo fundamental é o encontro e a localização topográfica de antígenos nos tecidos²⁰.

Desta maneira, têm-se utilizado com grande frequência, marcadores imunoistoquímicos que auxiliam no diagnóstico, prognóstico e tratamento das neoplasias. A imunoistoquímica permite conhecer a origem das células neoplásicas com base em marcadores moleculares, e não somente em relação aos aspectos morfológicos das lesões. Além disso, permite conhecer o comportamento biológico e o prognóstico da lesão²¹.

Através desta técnica também é possível avaliar os mecanismos de ação molecular e celular dos agentes quimiopreventivos¹¹⁰. Múltiplos mecanismos podem estar envolvidos na quimioprevenção do câncer, tais como inibição da inflamação e da proliferação celular, supressão da angiogênese, modulação da diferenciação celular e apoptose¹²⁶.

O PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) é um dos antígenos mais utilizados para detecção e quantificação das taxas de crescimento tecidual normal e/ou neoplásico. É uma proteína nuclear não-histona de 36 Kda, com papel crítico na fase inicial da proliferação celular, atuando como cofator da enzima DNA polimerase- α . Aparece no núcleo

celular durante a fase G1, atinge seu máximo na fase S, declina durante a fase G2 e apresenta níveis não-detectáveis na fase M do ciclo celular^{42,46}.

Nos tecidos normais, os estímulos anti-proliferativos mantêm as células no estado G0, garantindo desta forma a homeostase tecidual, enquanto que, em neoplasias, as células proliferam independentemente da necessidade de renovação celular. O índice de proliferação celular é um fator tradicionalmente associado com o comportamento da neoplasia⁶⁸.

Além da proliferação, também é possível o estudo da apoptose e de suas proteínas reguladoras, estabelecendo-se um balanço entre proliferação e morte celular²¹.

A apoptose, também denominada de morte celular programada, é um processo fisiológico de morte celular pelo qual as células que perderam suas funções ou apresentam defeitos são eliminadas do organismo. Desta forma, está implicada em muitas doenças, incluindo-se o câncer, doenças auto-imunes, cardiovasculares e neurovegetativas⁴⁷.

Na apoptose um programa de "suicídio" é ativado dentro da célula, levando à fragmentação do DNA, vacuolização do citoplasma, alterações da membrana e morte da célula sem lise ou dano às células vizinhas³.

A indução da apoptose é atualmente reconhecida como uma promissora estratégia no tratamento e na prevenção do câncer¹⁴. A resistência a apoptose é uma característica provavelmente inerente a todos os cânceres, onde a célula cancerosa deve ser capaz de evadir-se ao controle dos sensores pró-apoptóticos para que obtenha sucesso⁶⁸.

Os marcadores relacionados a apoptose como o bcl-2 e bax têm sido amplamente estudados nas diferentes fases da carcinogênese e em diversos tipos de câncer^{7,13,23,35,56,85,100,101}.

O gene bcl-2 foi associado pela primeira vez à inibição da apoptose em 1988⁶⁸. Este gene está localizado no braço longo do

cromossomo 18q21 que codifica uma proteína de mesmo nome, membro de uma grande família de proteínas, que contêm membros pró-apoptóticos (bax, bak, bad, bid) e anti-apoptóticos (bcl-2, bcl-xl, bcl-w)^{23,33,35,68}.

A proteína bax é expressa em órgãos como rins, fígado e pâncreas que contêm pouca ou nenhuma expressão de bcl-2. Em linfonodos, há uma superexpressão de bax nos centros germinativos, pois estes apresentam uma alta taxa de apoptose¹⁰⁸.

A proteína bcl-2 suprime a apoptose de dois modos: por ação direta sobre as mitocôndrias, liberando o citocromo-C que é o mais potente catalisador de morte celular e por efeitos mediados por interações com outras proteínas^{33,68}.

As moléculas da proteína bcl-2 parecem agrupar-se na membrana externa das mitocôndrias. Estudos recentes indicaram que a expressão aumentada de bcl-2 nesta região impede que a mitocôndria perca seu gradiente de potencial, o que inibe a resposta aos sinais apoptóticos⁶⁹. Assim, é possível observar uma forte expressão da família bcl-2 em cânceres¹⁰⁸, inclusive em carcinomas de pele não-melanoma³⁵.

Estudos têm mostrado que a superexpressão das proteínas bcl-2 e bcl-xl, ao mesmo tempo, aumentam a resistência a múltiplos quimioterápicos e à radioterapia⁶⁹. Por outro lado, algumas drogas quimioterápicas usadas atualmente, como a cisplatina e o 5-fluoracil, induzem a apoptose. Contudo não o fazem somente em células neoplásicas, ou seja, atuam também em células normais, sugerindo que este processo pode contribuir para a toxicidade associada à quimioterapia^{55,70}.

Desta maneira, o desenvolvimento de agentes antineoplásicos mais seletivos, ou seja, com melhor distinção entre as células neoplásicas e normais, é possivelmente o maior objetivo das recentes pesquisas em câncer^{5,70}.

A angiogênese constitui um outro importante pré-requisito para o desenvolvimento do câncer⁵⁷, visto que as neoplasias não podem ultrapassar um a dois milímetros de diâmetro ou de espessura, sem serem vascularizadas. Além disso, as células neoplásicas são incapazes de promover metástases sem acesso à vasculatura³³.

A regulação de crescimento de vasos sanguíneos para corresponder às necessidades do tecido normal depende de fatores indutores e inibidores da angiogênese, sendo que, dentre os indutores, os mais importantes são o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e, entre os inibidores, a trombospondina e os interferons^{21,33,68}.

Os cânceres promovem a angiogênese através da quebra do equilíbrio entre os indutores e inibidores, podendo ser observado o aumento da expressão de indutores ou a diminuição da expressão de inibidores ou ambos os processos simultaneamente^{68,108}. Os mecanismos regulatórios são complexos, contudo, parece que oncogenes e genes supressores de tumor, como o Ras e o p53, são capazes de modificar este equilíbrio^{17,68}.

Nos cânceres, os fatores angiogênicos podem ser produzidos pelas próprias células neoplásicas ou por células inflamatórias que infiltram as neoplasias³³. O VEGF é o principal promotor da angiogênese em tumores sólidos, portanto está comumente expresso numa ampla variedade de células neoplásicas^{5,33,63,114}.

O controle de produção de VEGF é feito por meio de mudanças na estabilidade de seu RNA mensageiro e de sua taxa de transcrição. Por exemplo, a hipóxia causa um aumento na concentração intracelular da forma ativa da proteína reguladora fator I induzido por hipóxia (HIF-1), que estimula a transcrição do gene VEGF. Desta forma, a proteína VEGF é secretada, difunde-se através do tecido e atua sobre as células endoteliais³.

Nos cânceres, o VEGF atua no endotélio, induzindo sua proliferação, migração e diferenciação em novos capilares²⁰. A invasão de células endoteliais é um evento essencial durante a angiogênese. As células endoteliais são ativadas, degradam a matriz extracelular, migram através dela e proliferam, formando novos vasos sanguíneos³⁰. A produção de enzimas líticas capazes de digerirem componentes específicos da matriz extracelular é que favorecem a invasão celular^{15,21}.

Como a angiogênese é crítica para o crescimento e a disseminação dos cânceres, têm sido realizados inúmeros estudos, utilizando-se inibidores da angiogênese como adjuvantes na terapia do câncer^{15,33}.

As células endoteliais que estão no processo de formação de novos vasos expressam distintos marcadores de superfície, possibilitando uma maneira promissora pela qual elas podem ser atacadas sem colocar em risco os vasos sanguíneos, já existentes nos tecidos não-cancerosos³.

Em geral, o VEGF é superexpresso em tumores sólidos e neoplasias malignas hematológicas, sendo um indicador de prognóstico ruim e curta sobrevida¹⁴. O papel do VEGF na angiogênese, progressão e prognóstico da doença tem sido extensivamente estudado em displasia e em CEC de boca⁵⁷. Em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço tem sido observado um aumento na expressão de VEGF nos casos mais avançados que apresentam curta sobrevida dos pacientes⁶³.

Estudos recentes demonstram que a expressão de VEGF é detectável em metade dos cânceres humanos, tais como o colo-retal, tireóide, próstata, estômago, pulmão e esôfago. Os estudos também apontam a correlação entre a expressão de VEGF, o crescimento do tumor primário e o desenvolvimento de metástases^{21,63}.

Em neoplasias cutâneas é observado um aumento na produção de VEGF, sugerindo que seus altos níveis estão relacionados com o comportamento biológico agressivo destes tipos de câncer⁶⁵.

Novas drogas anti-VEGF, já estão sendo avaliadas nestas neoplasias em testes clínicos³⁰.

Estudos têm mostrado que drogas como os antiinflamatórios não-esteroidais, principalmente os inibidores da COX-2, levam à inibição da angiogênese, proporcionando novas possibilidades do uso de agentes naturais e sintéticos com propriedades antiinflamatórias na prevenção e cura do câncer^{4,122}.

Desta maneira, nota-se que os processos de proliferação celular, apoptose e angiogênese são importantes no desenvolvimento do CEC, e o que se busca são novos agentes quimiopreventivos, naturais ou sintéticos, que interfiram bloqueando estes processos.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito da administração sistêmica da *Pfaffia glomerata* na carcinogênese química experimental em pele de camundongos *hairless*, bem como investigar a toxicidade hepática e renal das doses administradas.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Foram utilizados 32 camundongos *Hairless* (HRS/J - Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), fêmeas, adultos, com cinco semanas de vida e peso em torno de 25g.

Os animais foram alojados no Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, sendo distribuídos oito animais em quatro gaiolas de policarbonato e alimentados com ração (Guabi – Nutrilabor) durante todo o experimento.

Este trabalho experimental seguiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a aprovação fornecida pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, sob o Protocolo nº 016/2005-PA/CEP de 09/08/2005 (Anexo A).

4.2 Obtenção de Extrato de Raízes de *Pfaffia glomerata*

O extrato de *P. glomerata* tem sua origem no campo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) – UNICAMP e nos foi cedido pela Profa. Dra. Carmen Lucia Queiroga da Divisão de Fitoquímica. As raízes de *P.*

glomerata secas foram moídas com gelo seco em moinho de facas, e em seguida, extraídas com etanol 70% por três vezes sob agitação mecânica.

O extrato permaneceu sob refrigeração a 8° C (geladeira) devido a limitação da evaporação do solvente. Em média evaporou-se 1,5 litros de extrato por dia.

Após a filtração, parte do extrato foi concentrado em evaporador rotativo e liofilizado fornecendo uma goma. A outra parte do extrato foi centrifugada a 3200 rpm por 40 minutos.

O extrato (50g) foi concentrado em evaporador rotativo e liofilizado, obtendo-se um sólido higroscópico.

4.3 Administração sistêmica da *P. glomerata*

Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais (E1, E2 e E3) e um grupo controle (C), sendo oito animais em cada grupo (Figura 1).

Para os animais do grupo E1 foram administrados 200mg/Kg/dia do extrato liofilizado de *Pfaffia glomerata* dissolvido em 160ml de água filtrada (Figura 1a). A solução foi oferecida *ad libitum* aos animais, em substituição à água de beber, a partir da primeira até a décima quinta semana do experimento.

Para o grupo E2 foram administrados 400mg/Kg/dia (Figura 1b) e para o grupo E3 1000mg/Kg/dia (Figura 1c). Aos animais do grupo C foi administrada somente água filtrada *ad libitum*, como descrita para os grupos experimentais (Figura 1d).

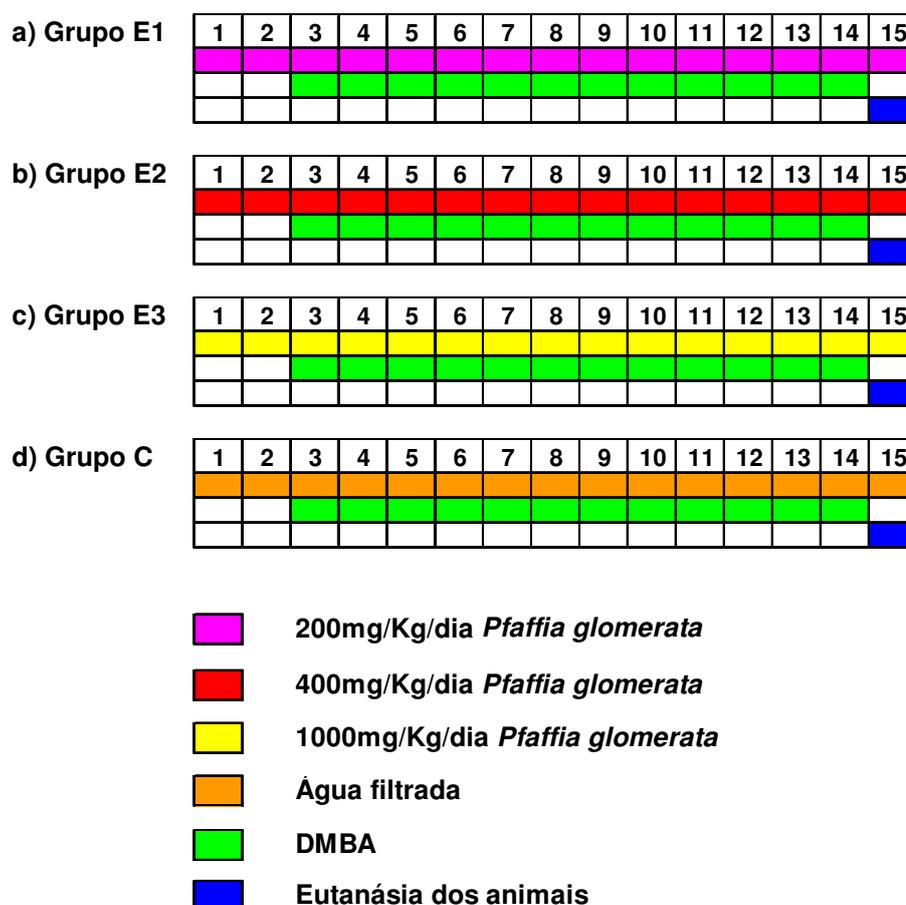


FIGURA 2 – Cronograma do experimento e distribuição dos grupos experimentais e controle: a) grupo E1 200mg/Kg/dia; b) grupo E2 400mg/Kg/dia; c) grupo E3 1000mg/Kg/dia; d) grupo C água filtrada.

4.4 Carcinogênese

Nos animais dos grupos experimentais (E1, E2 e E3) e controle (C), foi aplicada a solução de DMBA (Sigma Chemical, St. Louis, MI, USA) a 0,5% diluída em acetona, previamente preparada em capela e estocada a 4°C.

A aplicação da solução de DMBA foi realizada uma vez por semana até a décima quarta semana, sendo que a primeira aplicação ocorreu somente a partir da terceira semana do experimento (Figura 1).

Cada aplicação consistiu de três pinceladas da solução, com pincel de pêlo de camelo número zero (Tigre®), na região da crista ilíaca no dorso dos animais, dos lados direito e esquerdo. Antes de cada aplicação, o operador teve o cuidado de realizar a remoção do excesso de solução. Para isso o pincel foi pressionado contra as paredes do frasco que continha a solução de DMBA.

Durante a aplicação da solução de DMBA, os animais foram submetidos à contenção física, sem a necessidade de sedação. Para realização dos procedimentos, ou seja, durante toda a etapa de aplicação e manipulação da solução de DMBA, foram necessários dois operadores, que utilizaram paramentação adequada de proteção individual, consistindo de avental cirúrgico, luvas de nitrilo, máscara para proteção respiratória com filtro e máscara de proteção facial.

4.5 Avaliação clínica

Na 15^a semana do experimento, todos os animais (C, E1, E2 e E3) foram submetidos à avaliação das lesões cutâneas clinicamente visíveis na região de aplicação da solução de DMBA.

Para realização deste procedimento, os animais foram anestesiados com a solução de cloridrato de xilazina (Anasedan®) e cloridrato de cetamina (Dopalen®), na proporção de 0,8:0,5 administrando-se 0,1ml/100g de peso, por via intramuscular.

Em seguida, os animais foram fotografados e as lesões presentes avaliadas quanto ao tamanho e aspecto (elevada, plana, ulcerada). Todos estes dados foram anotados em uma ficha pré-confeccionada (Apêndice A).

4.6 Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram mantidos anestesiados para a realização de todos os procedimentos cirúrgicos. Somente após a coleta do material a ser examinado foi realizada a eutanásia dos animais utilizando-se uma dose excessiva da solução anestésica, por via intramuscular.

4.6.1 Biópsia das lesões de pele

Os animais foram mantidos anestesiados para a realização da biópsia excisional, no qual foi removida a maior lesão encontrada no dorso do animal.

Imediatamente após a biópsia, o material foi identificado e armazenado em formol tamponado a 10%.

4.6.2 Coleta de sangue

Foi feita uma incisão na região abdominal do animal para exposição da artéria aorta. Em seguida, com o auxílio de uma seringa de vidro (volume 5 ml) heparinizada foi coletada uma amostra de aproximadamente 2 ml de sangue.

O material coletado foi imediatamente transportado para tubos de ensaio acondicionados em gelo, e em seguida, armazenados a -20°C.

4.6.3 Remoção de fígado e rins

Foram removidos o fígado e os rins dos animais para avaliação macroscópica e histológica. O material coletado foi identificado e armazenado em formol tamponado a 10%.

4.7 Avaliação histológica de pele

As lâminas coradas pela HE e PAS, foram analisadas qualitativamente por meio de microscopia de luz (Axiophot – Axioplan – Carl Zeiss, Oberküchen, Germany).

Dois observadores calibrados, utilizando as lâminas coradas pela HE, realizaram primeiramente a análise histológica por meio da graduação de malignidade proposta por Bánóczy e Csiba¹⁰. Posteriormente, foi avaliada a integridade da membrana basal nas amostras coradas pelo PAS.

Desta maneira, quando a membrana basal mostrou-se íntegra, as lesões foram classificadas em não-infiltrativas (NI), e quando observado o rompimento da membrana basal em infiltrativas (I). Para avaliação das lesões infiltrativas foi utilizada a graduação histológica de Broders²².

Para facilitar a inclusão dos dados relacionados à graduação de malignidade e de Broders²² foi previamente confeccionada uma ficha para anotação dos dados (Apêndice B).

A listagem apresentada a seguir inclui os critérios de Bánóczy e Csiba¹¹:

a) queratinização:

- ausente: ausência das camadas de paraqueratina e ortoqueratina;
- paraqueratina: camada de queratina, nas quais núcleos epiteliais ficam retidos;
- hiperparaqueratina: aumento da espessura da camada de paraqueratina;
- ortoqueratina: camada de queratina, nas quais há perda dos núcleos epiteliais;
- hiperortoqueratina: aumento da espessura da camada de ortoqueratina.

b) camada granulosa:

- ausente;
- presente.

c) epitélio:

- sem projeções papilíferas;
- com projeções papilíferas exofíticas;
- atrofia: redução do número de camadas do epitélio;
- hiperplasia: aumento do número de camadas de células do epitélio, alongamento dos cones epiteliais;
- acantose: espessamento do epitélio às custas de um aumento de células da camada espinhosa;
- espongirose: edema intercelular;
- exocitose: presença de células inflamatórias no epitélio.

d) atipias celulares:

- pleomorfismo celular e nuclear: variações da forma e do tamanho da célula e do núcleo;
- perda de estratificação epitelial: maturação epitelial alterada com desorganização do arranjo em camadas, que pode se estender por toda a espessura do epitélio;

- hiperchromatismo nuclear: os núcleos apresentam-se mais basofílicos que o normalmente observado;
- aumento do tamanho do núcleo: relação núcleo/citoplasma alterada;
- núcleolos aumentados: tanto em tamanho quanto em número;
- duplicação da camada basal: camada basal ou germinativa com duas ou mais camadas de células;
- queratinização individual ou de grupos de células na camada espinhosa ou em camadas mais profundas;
- projeção dos cones epiteliais em gota: projeções epiteliais, nas quais a porção terminal da projeção é mais ampla do que sua base;
- figuras mitóticas na porção mediana do epitélio: podem ser encontradas em quantidade variável;
- mitoses atípicas: ocorrência de divisões celulares aberrantes ou bizarras;
- aumento de figuras mitóticas: aumento do número de divisões celulares;
- perda de coesão celular: perda da união ou união reduzida entre as células por alteração de suas junções;
- perda de polaridade das células basais: perda da disposição em paliçada e colunar assumida pelas células da camada basal.

A graduação de malignidade, segundo a proposta de Bánóczy e Csiba ¹⁰, é assim definida:

- a) atipia leve: até dois critérios presentes
- b) atipia moderada: de três a quatro critérios presentes
- c) atipia intensa: 5 ou mais critérios presentes

A graduação histológica de lesões neoplásicas proposta por Broders²² leva em consideração a diferenciação celular, sendo classificada da seguinte maneira:

- a) grau 1: bem diferenciado
- b) grau 2: moderadamente diferenciado
- c) grau 3: pobremente diferenciado
- d) grau 4: indiferenciado

4.8 Avaliação imunoistoquímica

A expressão do bcl-2, bax, VEGF e PCNA foi avaliada por meio da técnica de imunoistoquímica da Estreptoavidina-Biotina. Do material emblocado em parafina, foram obtidos cortes de 3µm que foram estendidos em lâminas de vidro previamente lavadas em álcool absoluto, secas e silanizadas com a solução de 3-aminopropiltriethoxi-silano (Sigma Chemical CO., St Louis, MO/USA) a 10% em álcool absoluto.

Os cortes foram desparafinizados com xilol I por 30 minutos a 60°C, e em seguida com xilol II por 20 minutos à temperatura ambiente. Foi feita a secagem das lâminas com papel filtro e a colocação destas em cubeta limpa. Em seguida, os cortes foram rehidratados em série descendente de etanol absoluto I, II, III, 95º e 85º por 5 minutos cada.

Posteriormente, foi feita a remoção dos pigmentos formólicos com hidróxido de amônia 10% em etanol 95º durante 10 minutos. Em seguida, foi feita a lavagem dos cortes em água corrente por 10 minutos e duas passagens em água destilada.

As lâminas receberam o tratamento de recuperação antigênica. Foram tratadas em microondas com ácido cítrico 10 mM (pH 6,0), durante 15 minutos a 700 W.

Após o tratamento, as lâminas foram novamente lavadas em água corrente, seguidas de duas passagens em água destilada. Os cortes foram mergulhados em dois banhos de 15 minutos cada, em solução de peróxido de hidrogênio (20 volumes) em metanol 1:1, com o objetivo de bloquear a peroxidase endógena existente no tecido.

Em seguida, foi feita a passagem das lâminas em água corrente, duas passagens em água destilada e imersão por três vezes na solução tampão de TRIS (pH 7,4), durante 5 minutos cada.

Posteriormente, os cortes histológicos foram secos com papel filtro e incubados com soroalbumina bovina (BSA) (Sigma Chemical CO., St Louis, MO/USA) a 5% durante uma hora, em câmara úmida a temperatura ambiente, para remoção dos anticorpos inespecíficos.

O excesso de BSA foi removido com papel filtro e os cortes foram incubados com o anticorpo primário diluído em solução de TRIS (pH 7,4), acrescido de BSA a 1%, de acordo com o descrito na tabela 1.

Posteriormente, os cortes foram lavados com a solução de TRIS (pH 7,4), realizando-se duas trocas de 5 minutos cada. Em seguida, foi feita a secagem dos cortes histológicos e seguiram para a incubação com o anticorpo secundário biotilado (LSAB Peroxidase Biotinylated Link Universal Streptavidin – HRP, Dako North América, Inc Carpinteria, CA, USA) durante 30 minutos, a temperatura ambiente em cuba umidificadora. Lavagem com a solução de TRIS (pH 7,4), sendo duas trocas de 5 minutos cada e secagem das lâminas.

Em seguida, os cortes foram expostos ao complexo Estreptoavidina-Biotina-Peroxidase (LSAB Peroxidase - LSAB Peroxidase Biotinylated Link Universal Streptavidin – HRP, Dako North América, Inc Carpinteria, CA, USA), durante 30 minutos, a temperatura ambiente em cuba umidificadora.

Foi feita nova lavagem com a solução de TRIS (pH 7,4), sendo duas trocas de 5 minutos cada, e em seguida foi realizada a

impregnação do cromógeno diaminobenzidina (Dako Cytomation Liquid DAB + Substrate Chromogen System, Dako North América, Inc Carpinteria, CA, USA). Aplicou-se a solução cromógena, sendo duas gotas em cada corte, em cuba umidificadora por 6 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida, foi realizada a lavagem com a solução de TRIS (pH 7,4), sendo duas trocas de 5 minutos cada, lavagem em água corrente e duas passagens em água destilada.

A contra-coloração dos cortes foi feita com a hematoxilina de Mayer por 6 minutos. Nova lavagem em água corrente, passagem em água amoniacal rapidamente, lavagem em água corrente por 10 minutos e duas passagens em água destilada.

Para finalizar, desidratação com série ascendente de etanol 70º, 75º, 80º, 85º, 90º e 95º, sendo realizadas passagens rápidas, e em seguida, imersão dos cortes em álcool absoluto I, II e III durante 2 minutos cada. Imersão em solução de álcool-xilol 1:1 durante 2 minutos. Diafanização em xilol I por 2 minutos e em xilol II por 5 minutos e montagem das lâminas em resina Permount.

Como controle positivo foi utilizado os centros germinativos de linfonodos cervicais dos animais e como controle negativo, cortes deste tecido com omissão dos anticorpos primários específicos nos procedimentos imunoistoquímicos.

Tabela 1 – Detalhes dos anticorpos utilizados nas reações de imunoistoquímica.

Anticorpos	Clone	Hospedeiro	Diluição	Incubação
Bax	P-19*	Coelho	1:100	18 h/ 4º C
Bcl-2	N-19*	Coelho	1:400	18 h/ 4º C
VEGF	A-20*	Coelho	1:100	18 h/ 4º C
PCNA	PC-10**	Camundongo	1:50	18 h/ 4º C

*Santa Cruz Biotechnology, CA, USA.

**Dako North América, Inc Carpinteria, CA, USA.

4.8.1 Análise quantitativa da expressão de PCNA, VEGF, bax e bcl-2

Foi realizada a análise quantitativa da expressão das proteínas PCNA, VEGF, bax e bcl-2, sendo que para o VEGF, bax e bcl-2 foram consideradas como positivas somente as células que apresentaram marcação de cor acastanhada, independente da intensidade da coloração, restrita ao citoplasma e para o PCNA restrita ao núcleo.

As lâminas foram observadas em microscópio de luz (Axiophot 2 – Carl Zeiss, Oberküchen, Germany). As imagens obtidas em microscópio foram transferidas para um monitor de TV acoplado a um sistema de câmera fotográfica e computador. Em seguida, foram fotografados 10 campos de cada lâmina em aumento final de 400X.

As imagens foram transferidas para o computador onde foi realizada a contagem de células positivas em aproximadamente 1.000 selecionadas aleatoriamente, em cada caso, com o auxílio do programa *Image J*®. (software de domínio público, NIH, Wayne Husband, Bethesda, USA)

Seguindo o proposto por Novellino et al.⁸⁶, após a contagem das células foi obtido um índice de positividade (IP) para cada proteína investigada através da fórmula abaixo descrita:

$$IP = \frac{\text{número de células positivas}}{1.000 \text{ células aleatoriamente}} \times 100$$

Para determinar o índice apoptótico, a proporção da expressão de bcl-2/bax foi calculada usando as porcentagens individuais previamente obtidas, de acordo com Ribeiro et al¹⁰¹.

4.9 Avaliação toxicológica

4.9.1 Avaliação macroscópica de fígado e rins

Após 24 horas de fixação do material em formol tamponado a 10%, o fígado e os rins dos animais foram fotografados e avaliados quanto à coloração, presença de necrose, fibrose e hemorragia. Para facilitar a avaliação foi pré-confeccionada uma tabela para anotação dos dados (Apêndice C).

4.9.2 Avaliação histológica de fígado e rins

Após a fixação, o material foi processado e incluído em blocos de parafina. Foram realizados cortes seriados com espessura de 5µm, os quais foram estendidos em lâminas de vidro, previamente limpas e desengorduradas com álcool absoluto.

Em seguida, os cortes foram corados pela HE e pelo PAS, e analisados qualitativamente por dois observadores calibrados, por meio da microscopia de luz (Axiophot – Axioplan – Carl Zeiss, Oberküchen, Germany).

Foi investigada a ocorrência de degeneração hidrópica e gordurosa, necrose de coagulação e liquefação, fibrose, infiltrado inflamatório e lesões vasculares. Para facilitar a observação foi pré-confeccionada uma ficha para anotação dos dados (Apêndice D).

4.9.3 Análises bioquímicas

A avaliação do potencial tóxico das doses administradas de *P. glomerata* foi feita por meio de análises bioquímicas específicas para fígado e rins. Para avaliação do fígado foram realizadas as análises de fosfatase alcalina (ALP) e de aspartato aminotransferase (AST) e para rins a análise da concentração de uréia.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos para obtenção do soro. Estas amostras foram pipetadas, armazenadas em microtubos e mantidas sob refrigeração a -20° C e posteriormente, submetidas às análises espectrofotométricas.

4.9.3.1 Determinação da atividade enzimática de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade enzimática da ALP nas amostras séricas, em U/l, foram avaliadas pelo método descrito por Roy¹⁰², utilizando-se a timolftaleína monofosfato como substrato, que após hidrólise libera a timolftaléina, que apresenta cor azul em meio básico. A cor formada, diretamente proporcional à atividade enzimática, foi registrada no espectrofotômetro SHIMADZU – UV-1200 séries a 590 nm.

Para o cálculo da atividade enzimática (AE) em U/l foram utilizadas, como referência padrão, soluções de timolftaleína correspondente à atividade enzimática de 45, 22,5 e 12,25U/l. As absorbâncias destes padrões foram medidas e utilizadas no levantamento da curva padrão com a finalidade de se obter o fator de calibração (Fc), cujo valor encontrado foi usado no cálculo das atividades enzimáticas das amostras de sangue.

Durante as medidas da atividade enzimática foram utilizadas alíquotas de 50µl de soro e os ensaios foram realizados em duplicata.

4.9.3.2 Determinação da atividade de aspartato aminotransferase (AST)

A atividade enzimática da AST foi avaliada pelo método de Reitman Frankel, descrito em Moura et al.⁷⁸, no qual a enzima catalisa a transferência do grupo amino do aspartato para o α -cetoglutarato, formando o glutamato e o oxaloacetato. O oxaloacetato formado reage com a 2,4-dinitrofenilhidrazina, produzindo a hidrazona correspondente, cuja intensidade da cor alaranjada, em meio alcalino, foi medida no espectrofotômetro SHIMADZU – UV-1200 séries a 505 nm.

Para o cálculo da atividade enzimática da enzima nas amostras de sangue foram utilizadas como padrões de referências, soluções de substrato de piruvato de sódio nas concentrações correspondentes à atividade enzimática de 91,6; 54,9; 29,4 e 11,6 U/l. As absorbâncias destes padrões foram utilizadas para o levantamento da curva padrão com a finalidade de se obter o Fc, cujo valor foi usado no cálculo das concentrações das amostras de sangue.

Durante os ensaios, em duplicata, foram utilizadas alíquotas de 0,1ml de soro.

4.9.3.3 Determinação da concentração de uréia

A concentração de uréia nas amostras de soro foi avaliada pelo método da diacetilmonoxima, descrito por Moura et al.⁷⁸,

que se baseia na reação direta entre a uréia e a diacetilmonoxima (2,3-butadiona monoxima) na presença da tiossemicarbazida e íons cádmio em meio ácido.

Durante os ensaios, em duplicata, foram utilizadas alíquotas de 0,1ml de soro. Estas amostras foram imersas em água fervente durante 10 minutos para que ocorresse a reação entre a uréia e a diacetilmonoxima. Ao final da reação, as amostras apresentaram uma cor rosa-púrpura, cuja resultante é proporcional à concentração de uréia. Em seguida, foi adicionado 2 ml da amostra na cubeta de vidro do espectrofotômetro SHIMADZU – UV-1200 séries e foi medida a absorvância a 540 nm.

Para o cálculo da concentração de uréia nas amostras de soro, foram utilizadas como padrões de referências, soluções do substrato de piruvato de sódio correspondentes à atividade de 20, 40, 60, 80 e 100 U/l. As absorvâncias dos padrões foram medidas no espectrofotômetro e utilizadas para o levantamento da curva padrão para obtenção do F_c , cujo valor foi utilizado no cálculo da concentração das amostras.

4.10 Análise estatística

Terminada a análise qualitativa e quantitativa, todos os dados foram tabulados e transferidos para a planilha eletrônica do Excel® (Microsoft – USA).

Para as variáveis quantitativas foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. A relação entre as variáveis qualitativas foi feita através do uso da correlação de Spearman e do teste χ^2 de independência. Para todos os testes estatísticos o nível de significância foi estabelecido em 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Análise clínica

Todos os animais foram avaliados na 15^a semana do experimento e apresentaram lesões localizadas na pele da região dorsal. Em relação ao tipo foram observadas lesões elevadas com ou sem ulceração (Figuras 3a e 3b). O teste qui-quadrado revelou diferença estatística significativa entre os grupos controle e experimentais ($p=0,0051$). A distribuição percentual de lesões ulceradas e não-ulceradas nos grupos controle (C) e experimentais (E1, E2 e E3) pode ser observada na figura 4.

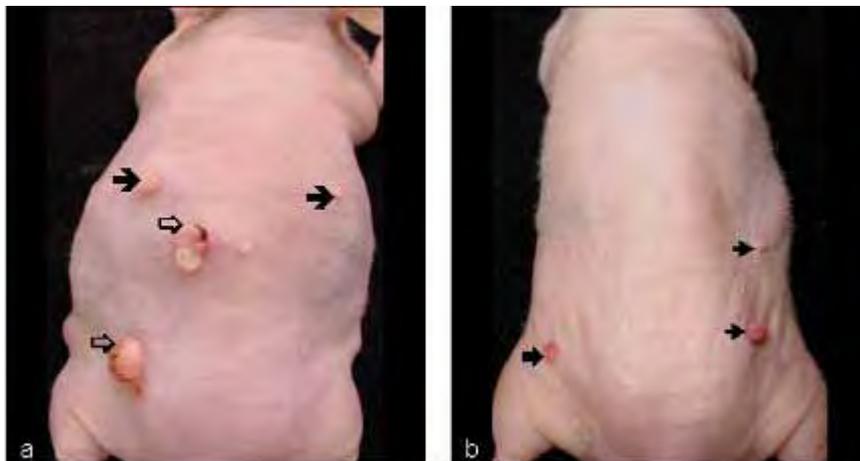


FIGURA 3 – Características clínicas das lesões: a) lesão elevada com (⇔) e sem ulceração (→) em animal do grupo C; b) lesão elevada sem ulceração (→) e com ulceração (➡) em animal do grupo E1.

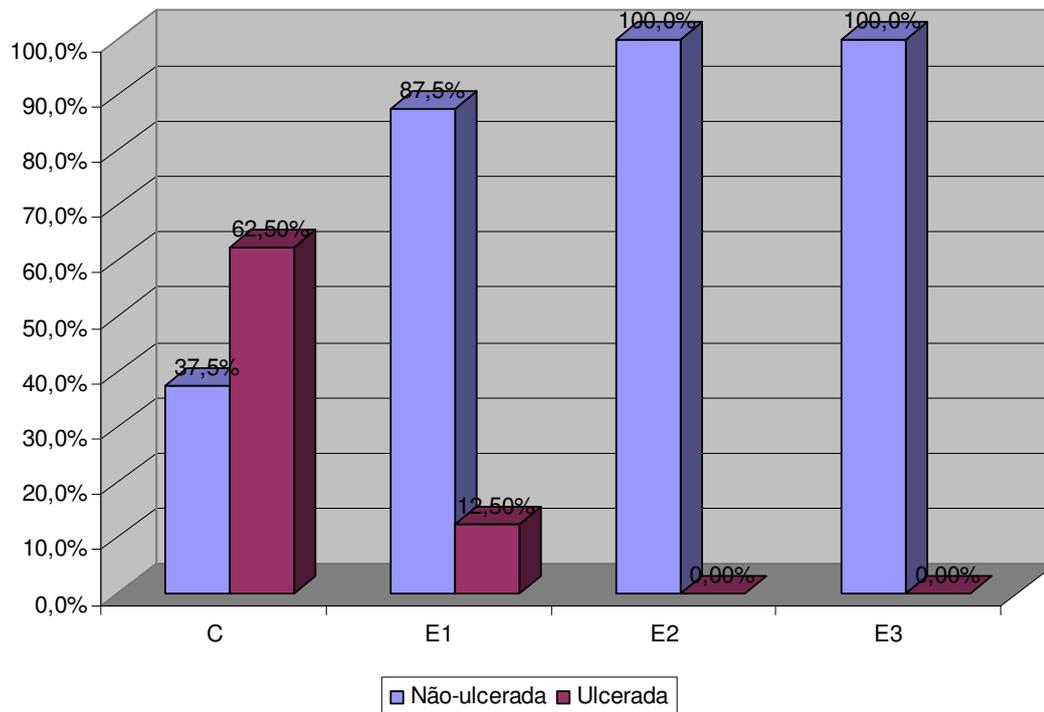


FIGURA 4 – Distribuição percentual de lesões não-ulceradas e ulceradas nos grupos controle (C) e experimentais (E1, E2 e E3). (p=0,0051).

O tamanho das lesões em mm foi calculado pelo seu maior diâmetro, sendo que variou nos grupos C (média=3,88±2,23) e E2 (média=3,29±1,60) de 1 a 6 mm e nos grupos E1 (média=2,75±1,04) e E3 (média=2,43±1,27) de 1 a 4 mm (Figura 5). Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos controle e experimentais (p=0,4976).

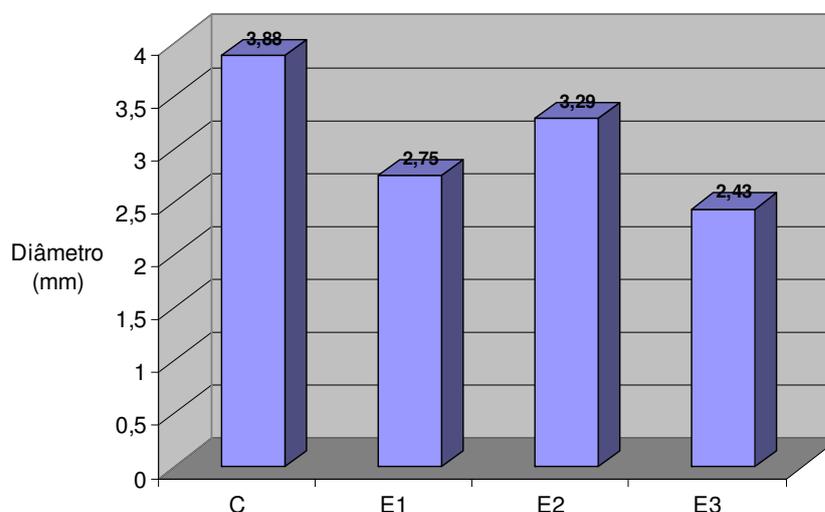


FIGURA 5 – Valores médios do tamanho das lesões (mm) nos grupos controle (C) e experimentais (E1, E2 e E3). ($p=0,4976$).

5.2 Análise histológica

Utilizando-se os critérios de malignidade, propostos por Bánóczy e Csiba¹¹ e a avaliação da integridade da membrana basal as lesões encontradas foram classificadas em não-infiltrativas (Figura 6) e infiltrativas (Figuras 7, 8 e 9).

O teste qui-quadrado não revelou diferença estatística significativa entre os grupos controle e experimentais ($p=0,1129$). A distribuição percentual de lesões não-infiltrativas e infiltrativas nos grupos controle (C) e experimentais (E1, E2 e E3) pode ser observada na figura 10.

Para avaliação das lesões infiltrativas foi utilizada a graduação histológica de Broders²³. Verificou-se que todos os casos de todos os grupos (C, E1, E2 e E3) apresentaram somente a classificação grau 1, ou seja,

carcinoma espinocelular (CEC) bem-diferenciado (Figuras 7, 8 e 9). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos controle e experimentais ($p=0,8598$) em relação aos critérios de malignidade.

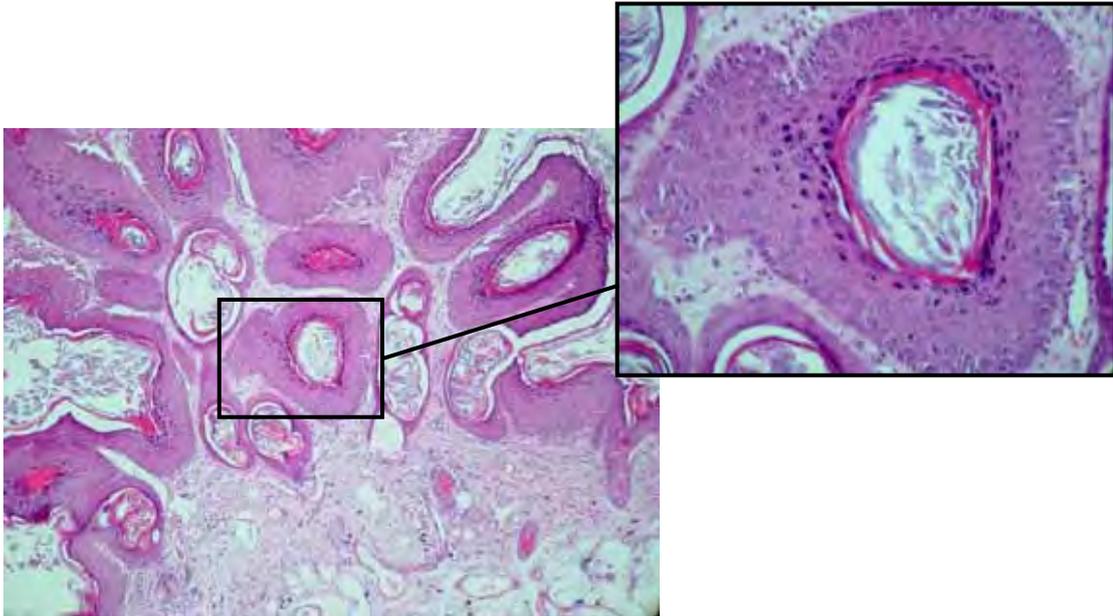


FIGURA 6 – Lesão não-infiltrativa de aspecto exófito papilomatoso mostrando grande quantidade de queratina na superfície, acumulada entre as projeções e formando cistos intra-epiteliais. No detalhe observa-se cisto de queratina. (HE, aumento original 100x).

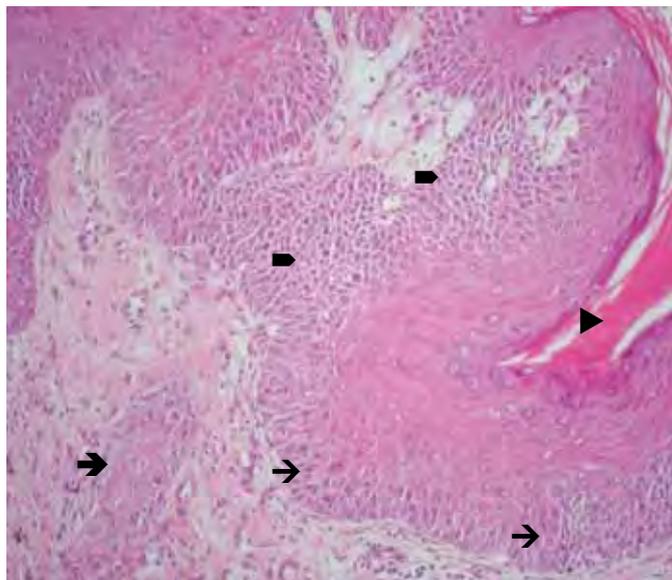


FIGURA 7 – Lesão infiltrativa: CEC bem-diferenciado; hiperortoqueratinização (▴); duplicação da camada basal (→); perda de coesão celular (■); ilhota tumoral infiltrando a lâmina própria (➤). (HE, aumento original 200x).

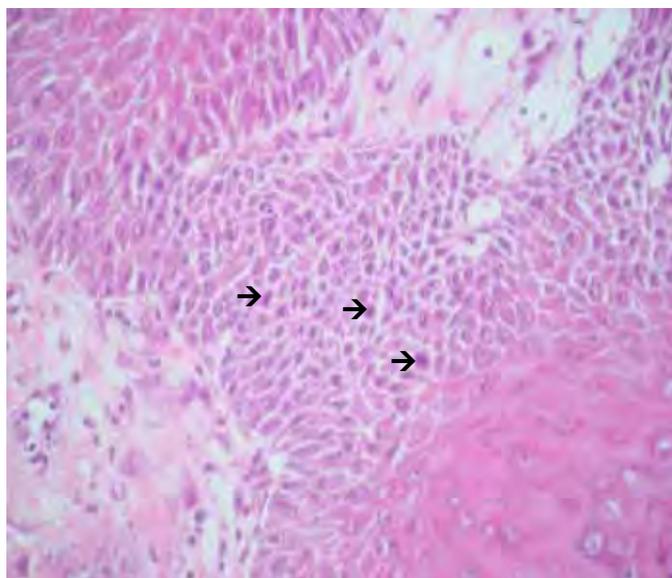


FIGURA 8 – Detalhe da figura 7: notar presença de pleomorfismo celular e nuclear e presença de algumas mitoses atípicas (→). (HE, aumento original 200x).

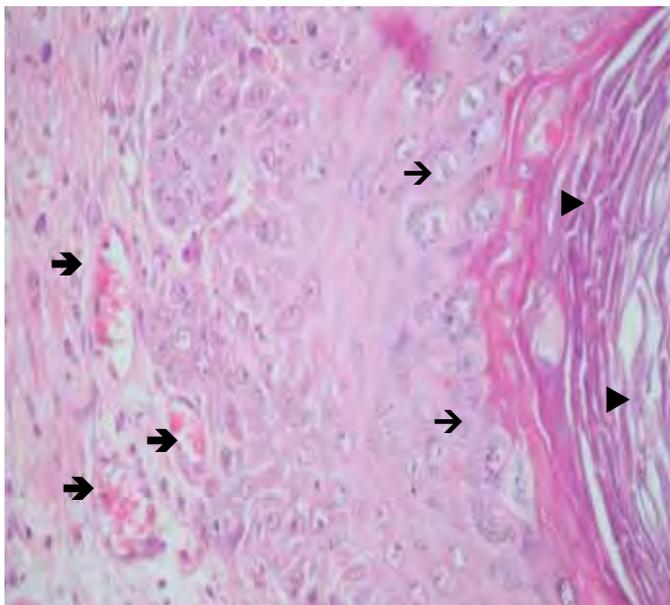


FIGURA 9 – Detalhe da figura 7: hiperortoqueratinização (▶); camada granulosa evidente (→); células neoplásicas adjacentes a vasos sanguíneos (↔). (HE, aumento original 400x).

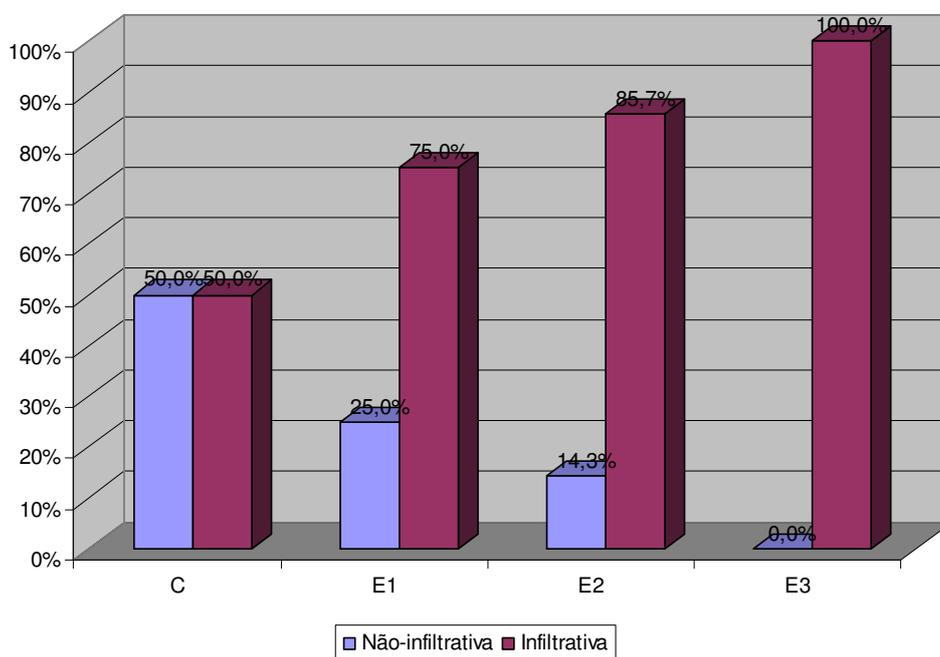


FIGURA 10 – Distribuição percentual de lesões não-infiltrativas e infiltrativas nos grupos controle (C) e experimentais (E1, E2 e E3). ($p=0,1129$).

5.3 Análise imunoistoquímica

Após a marcação imunoistoquímica foi realizada a análise quantitativa da expressão das proteínas, sendo que para o VEGF, bax e bcl-2 foram consideradas como positivas somente as células que apresentaram marcação de coloração acastanhada restrita ao citoplasma e para o PCNA restrita ao núcleo, independente da intensidade da coloração. A expressão foi considerada negativa quando o citoplasma e o núcleo das células apresentaram coloração azulada, contra-corados com a hematoxilina de Mayer.

A expressão da proteína VEGF nas lesões não-infiltrativas e infiltrativas restringiu-se às camadas espinhosa e granulosa do epitélio, notando-se maior intensidade na camada granulosa (Figura 11). Nas lesões infiltrativas foi observada ainda a expressão nas ilhotas tumorais.

A marcação pela proteína bax foi observada nas camadas espinhosa e granulosa do epitélio, tanto nas lesões não-infiltrativas quanto nas infiltrativas (Figura 12).

A expressão da bcl-2 foi observada nas camadas espinhosa e granulosa do epitélio nas lesões não-infiltrativas e infiltrativas (Figura 13), e nesta última também nas ilhotas tumorais.

Marcação PCNA-positiva foi observada na camada basal do epitélio em lesões não-infiltrativas (Figura 14) e nas camadas basal e espinhosa nas infiltrativas (Figura 15).

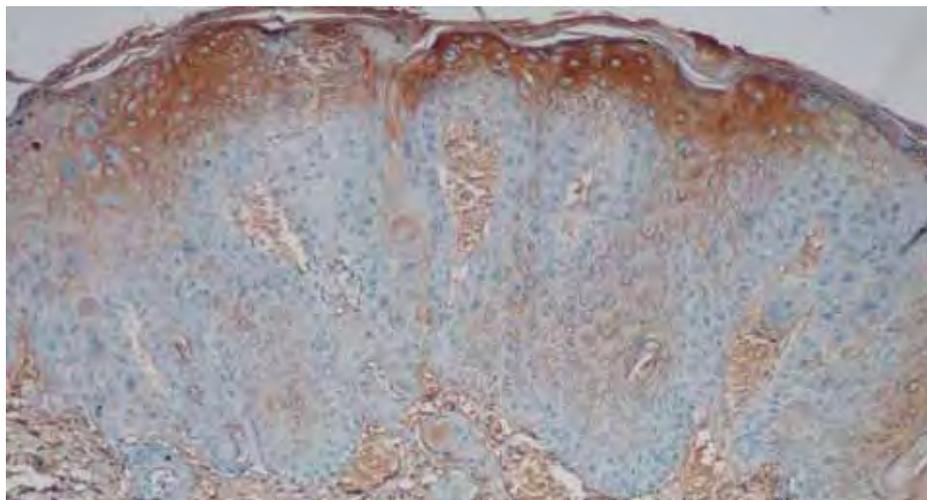


FIGURA 11 – Imunoistoquímica para VEGF: células positivas observadas nas camadas granulosa e espinhosa do epitélio em lesão não-infiltrativa. Aumento original 100x.

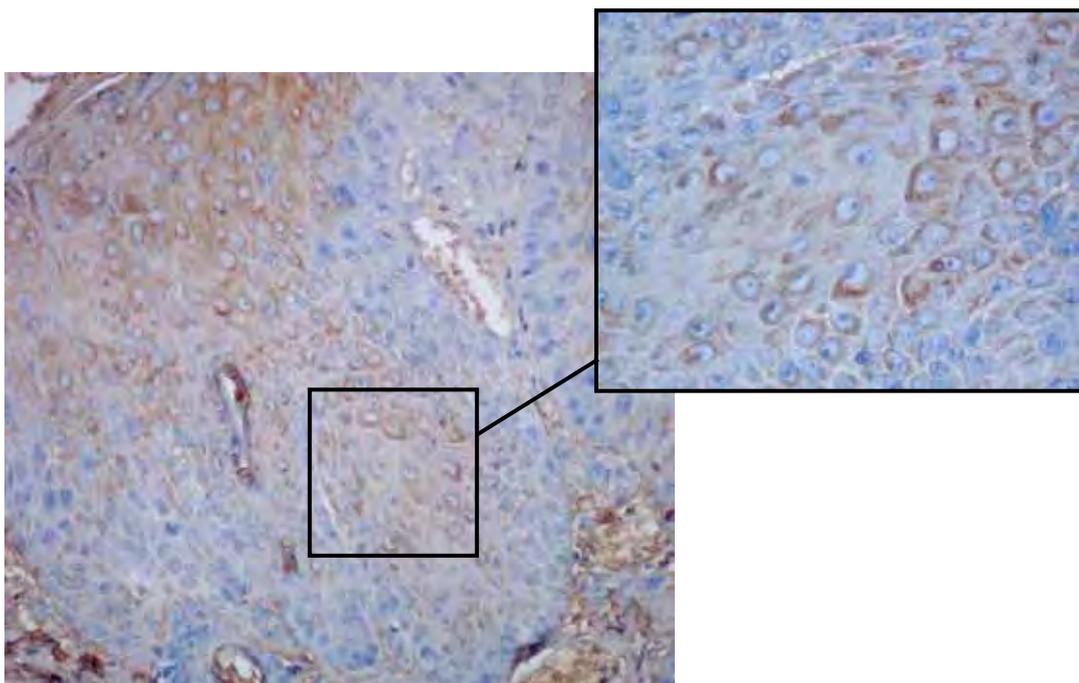


FIGURA 12 – Imunoistoquímica para bax: células positivas observadas nas camadas granulosa e espinhosa do epitélio em lesão infiltrativa. No detalhe notar a marcação citoplasmática das células. Aumento original 200x.



FIGURA 13 – Imunoistoquímica para bcl-2: Células positivas observadas nas camadas granulosa e espinhosa do epitélio em lesão infiltrativa. Aumento original 100X.

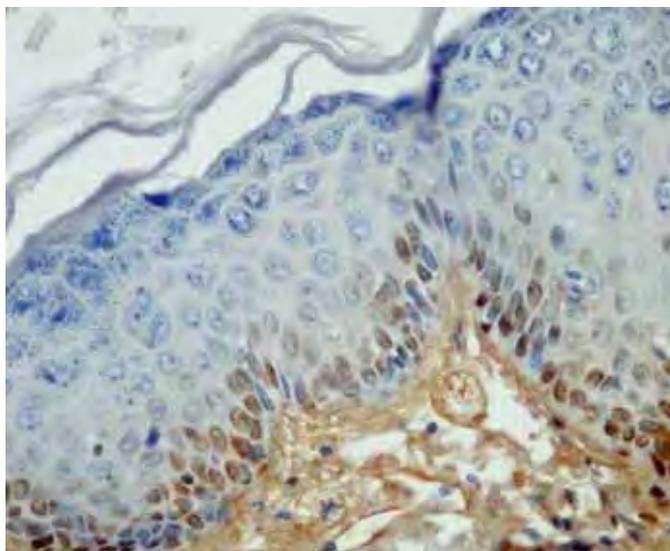


FIGURA 14 – Imunoistoquímica para PCNA: células positivas observadas na camada basal do epitélio em lesão não-infiltrativa. Aumento original 400X.

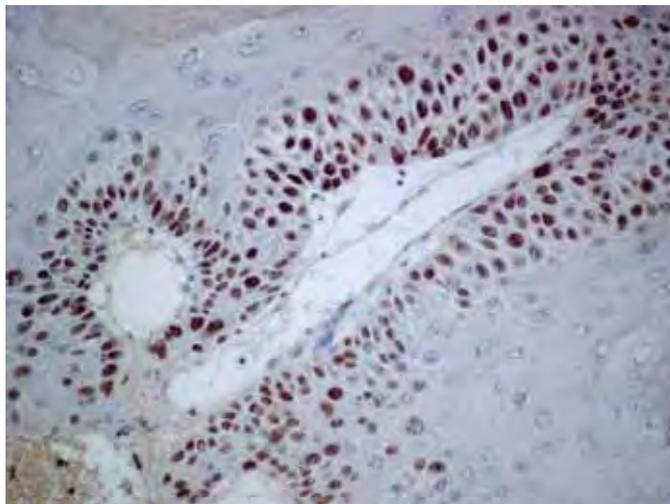


FIGURA 15 – Imunoistoquímica para PCNA: células positivas observadas nas camadas basal e espinhosa do epitélio em lesão infiltrativa. Aumento original 200X.

Para cada proteína avaliada, contou-se o número de células positivas em aproximadamente 1000 células selecionadas aleatoriamente em cada caso, obtendo-se ao final o índice de células positivas (IP). As figuras 16, 17, 18 e 19 mostram o IP para o PCNA, VEGF, bax e bcl-2, respectivamente.

A análise estatística das proteínas avaliadas não revelou diferença estatística significativa para o bax ($p=0,8970$), bcl-2 ($p=0,8414$) e PCNA ($p=0,2958$). Para o VEGF mostrou uma tendência à significância ($p=0,0808$).

O índice apoptótico obtido por meio do cálculo da proporção da expressão de bcl-2/bax, usando as porcentagens individuais previamente obtidas não mostrou diferença estatística significativa ($p=0,8432$) quando comparados os grupos controle e experimentais (Figura 20).

O teste de correlação de Spearman que avaliou o índice de positividade das proteínas e a presença de malignidade mostrou relação significativa para o VEGF ($p=0,0111$; $r_s = -0,4159$) e PCNA ($p=0,0296$;

$rs=0,3484$), e não significativa para *bax* ($p=0,1319$; $rs=0,2106$), *bcl-2* ($p=0,1454$; $rs=0,1993$) e índice apoptótico ($p=0,4764$; $rs=-0,0112$).

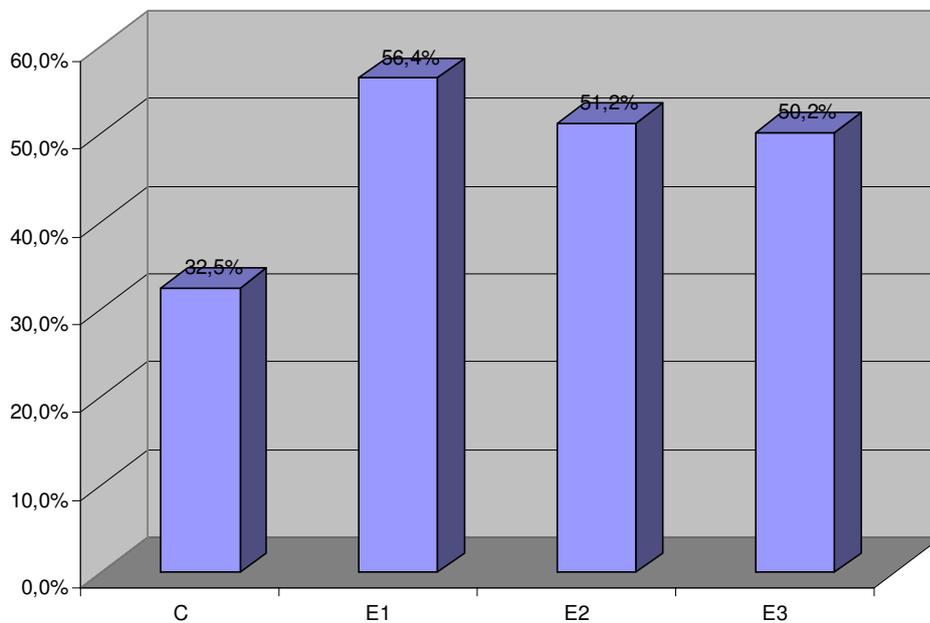


FIGURA 16 – Índice de positividade (%) para o PCNA nos grupos controle (C) e experimentais (E1, E2 e E3). ($p=0,2958$).

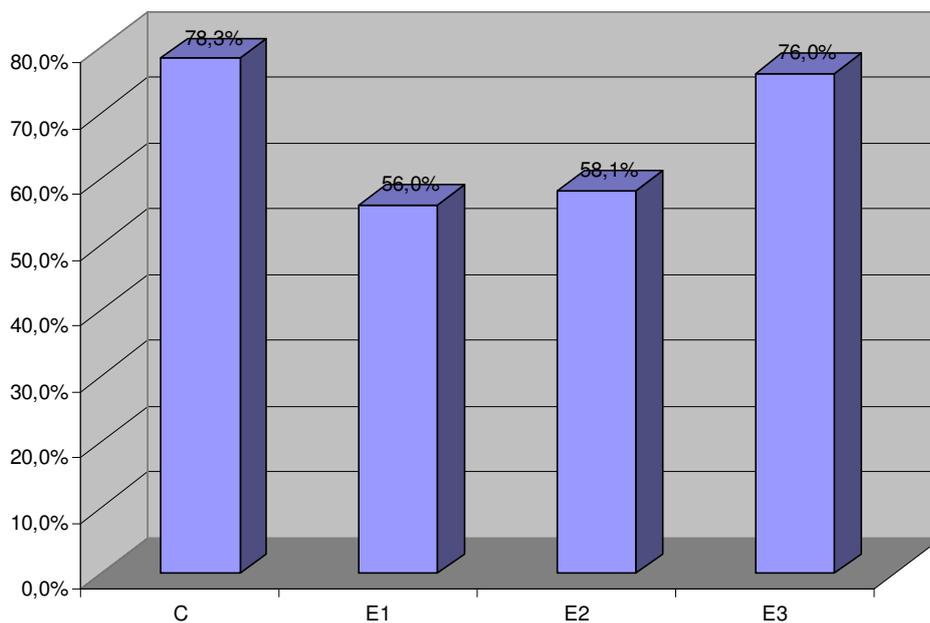


FIGURA 17 – Índice de positividade (%) para o VEGF nos grupos controle (C) e experimentais (E1, E2 e E3). ($p=0,0808$).

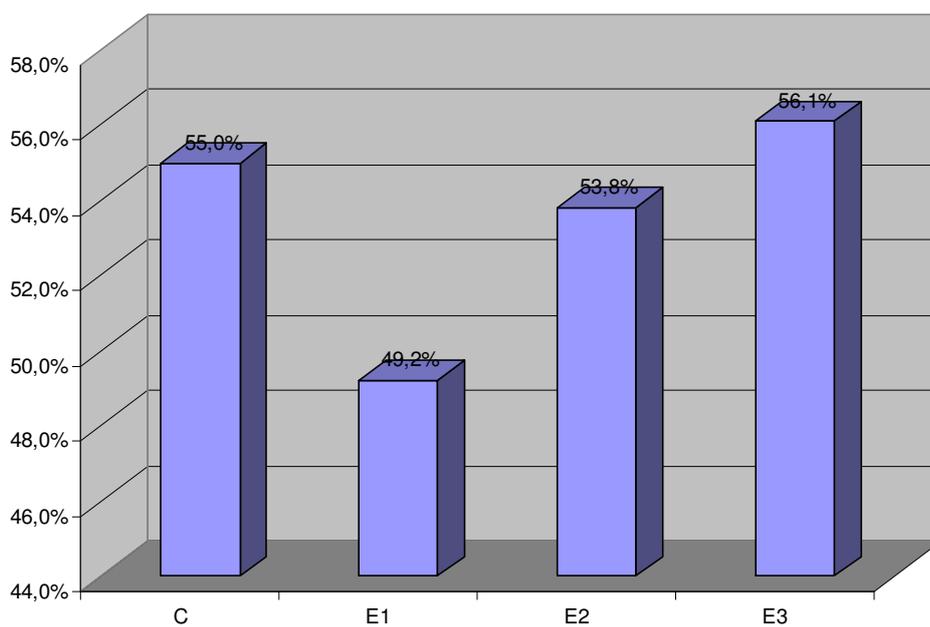


FIGURA 19 – Índice de positividade (%) para o bcl-2 nos grupos controle (C) e experimentais (E1, E2 e E3). ($p=0,8414$).

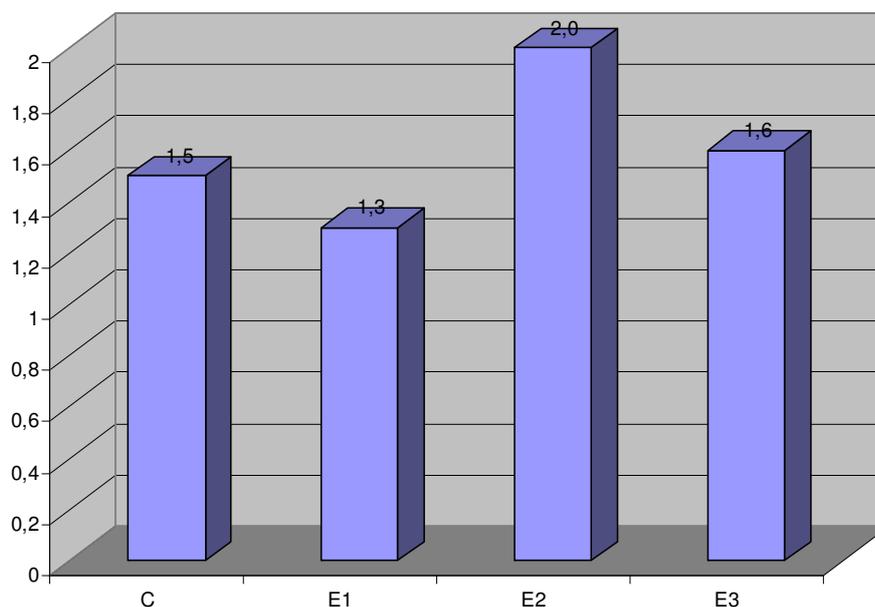


FIGURA 20 – Índice apoptótico nos grupos controle (C) e experimentais (E1, E2 e E3).
($p=0,8432$).

5.4 Análise toxicológica

5.4.1 Análise macroscópica de fígado e rins

O fígado e rins dos animais foram avaliados macroscopicamente quanto à coloração e a presença ou ausência de necrose, fibrose e hemorragia.

Quanto à coloração foram observadas tanto em fígado quanto em rins, nos grupos controle e experimentais, a presença de áreas esbranquiçadas, acastanhadas e enegrecidas (Figuras 21a e 21b).

Não foi observada em nenhum dos grupos a ocorrência de necrose e fibrose, tanto em fígado quanto em rins. Foi observado em fígado um caso (14,3%) de hemorragia no grupo E2 e dois casos (28,6%) no grupo E3. Em rins observou-se um caso no grupo C (12,5%) e dois (25,0%) no grupo E3.



FIGURA 21 – Macroscopia de fígado e rins: a) coloração enegrecida em fígado de animal do grupo E3 corresponde à área de hemorragia; b) coloração acastanhada em rim correspondente à hemorragia em animal do grupo E3.

5.4.2 Análise histológica de fígado e rins

Foi observada em fígado e em rins nos animais dos grupos controle e experimentais a presença de degeneração hidrópica, hiperemia, hemorragia e infiltrado inflamatório mononuclear (Figuras 22 e 23).

Quando comparados os grupos controle e experimentais, o teste qui-quadrado mostrou diferença estatística significativa somente para o infiltrado inflamatório, tanto em fígado ($p=0,0272$) quanto em rins ($p=0,0061$). A distribuição percentual da presença de infiltrado inflamatório em fígado e

em rins nos grupos controle e experimentais pode ser observada nas figuras 24 e 25.

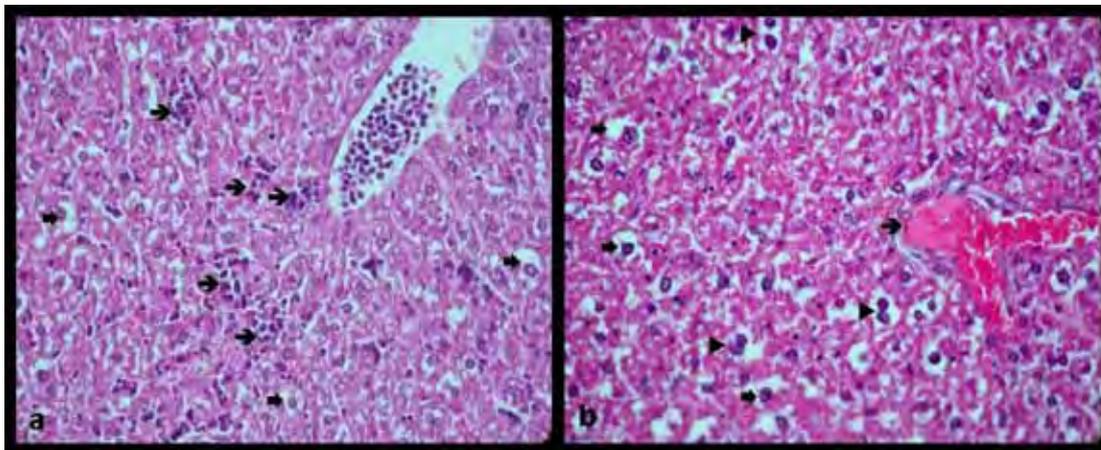


FIGURA 22 – Aspecto histopatológico em fígado de animal do grupo E3: a) degeneração hidrópica (➡); focos de infiltrado inflamatório mononuclear (➡). (HE, aumento original 200x). b) degeneração hidrópica (➡); hiperemia (➡); hepatócitos binucleados (▶) (HE, aumento original 400x).

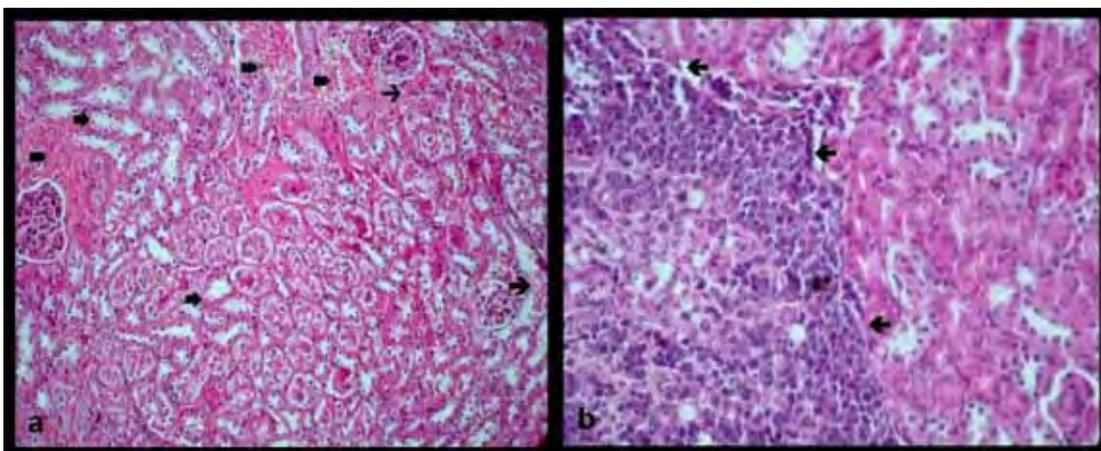


FIGURA 23 – Aspecto histopatológico em rim de animal do grupo E3: a) degeneração hidrópica (➡); células inflamatórias mononucleares (➡); hiperemia (➡); hemorragia (➡). (HE, aumento original 100x). b) intenso infiltrado inflamatório mononuclear (◀). (HE, aumento original 400X).

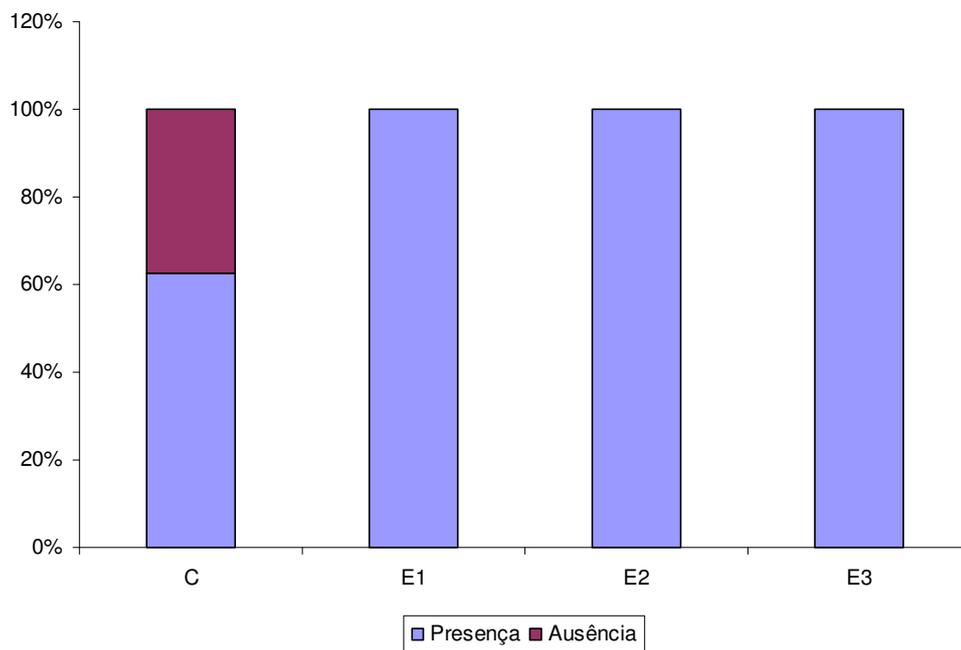


FIGURA 24 – Distribuição percentual de infiltrado inflamatório em fígado nos grupos controle (C) e experimentais (E1, E2 e E3). ($p=0,0272$).

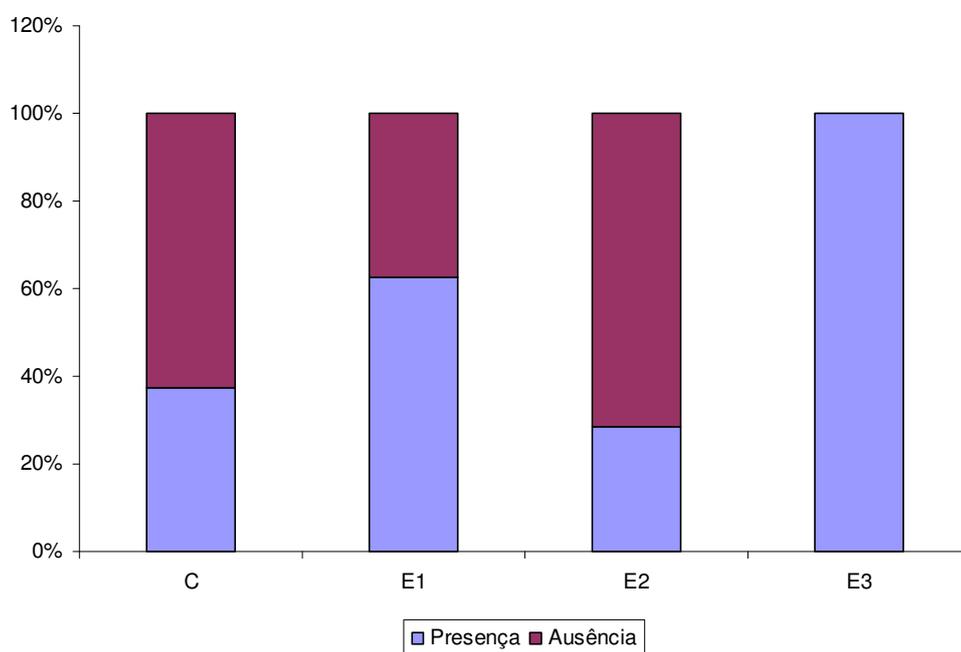


FIGURA 25 – Distribuição percentual de infiltrado inflamatório em rins nos grupos controle (C) e experimentais (E1, E2 e E3). ($p=0,0061$).

5.4.3 Análises bioquímicas

Os valores de médias e desvio padrão da determinação da atividade enzimática de fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST) e da concentração de uréia estão representados na tabela 3 e nas figuras 26, 27 e 28.

Não foi observada diferença estatística significativa em relação à ALP ($p=0,3421$) e à AST ($p=0,3601$) quando comparados os grupos controle e experimentais. A concentração de uréia mostrou uma tendência à significância ($p=0,0728$).

Tabela 3 – Valores de médias e desvio padrão da concentração de ALP, AST e uréia nos grupos controle e experimentais.

Grupo	ALP (U/L)	AST (U/L)	Uréia (U/L)
C	73,00±73,09	15,00±4,36	54,00±10,14
E1	98,00±60,72	19,00±24,63	40,00±12,25
E2	72,00±81,40	12,00±4,86	47,00±15,93
E3	52,00±50,90	16,00±4,17	50,00±9,19

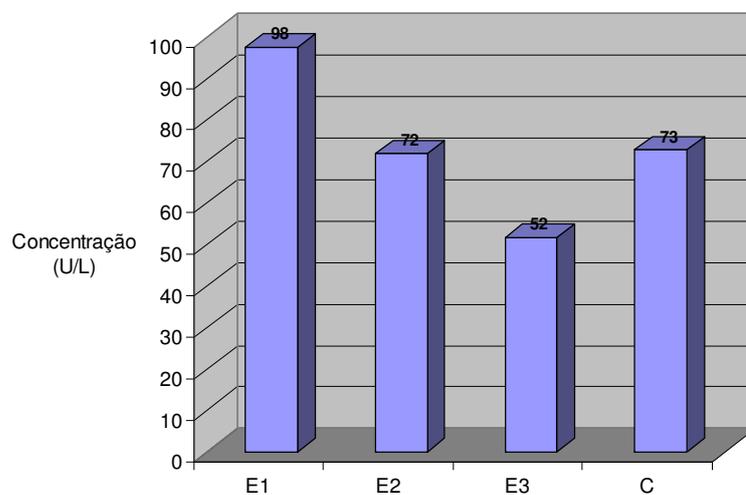


FIGURA 26 – Valores médios da concentração enzimática (U/L) de ALP nos grupos controle (C) e experimentais (E1, E2 e E3). ($p=0,3421$)

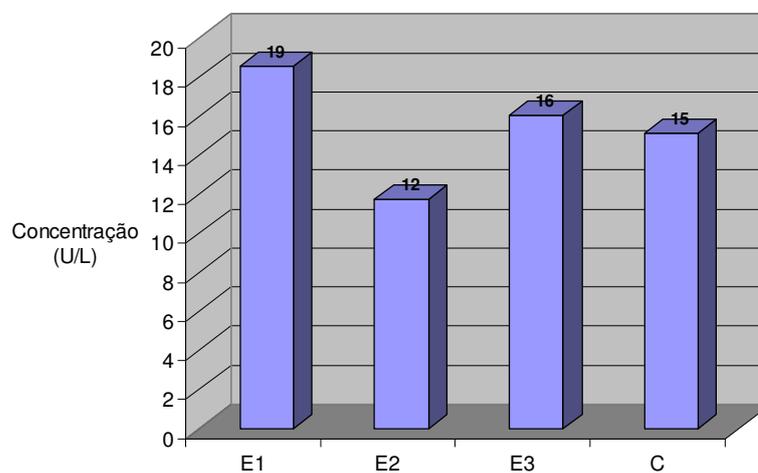


FIGURA 27 – Valores médios da concentração enzimática (U/L) de AST nos grupos controle (C) e experimentais (E1, E2 e E3). ($p=0,3601$)

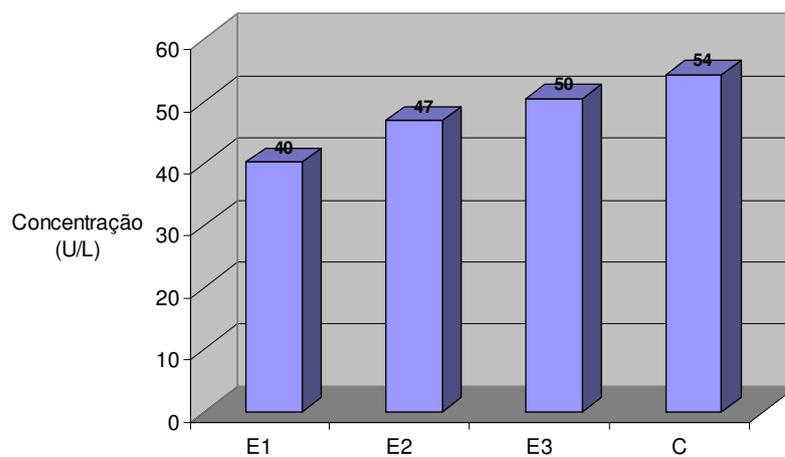


FIGURA 28 – Valores médios da concentração (U/L) de uréia nos grupos controle (C) e experimentais (E1, E2 e E3). ($p=0,0728$).

6 DISCUSSÃO

No Brasil são encontradas diversas espécies do gênero *Pfaffia*, sendo que a diferenciação entre elas não é simples, pois depende do conhecimento de sua composição química. Desta maneira, muitas vezes, ocorre no comércio a substituição da *P. paniculata* pela *P. glomerata* e vice-versa⁹⁹.

A substituição de uma espécie pela outra não deve ser feita, pois estudos^{79,84,105,115} têm mostrado que apesar de apresentarem alguns constituintes químicos em comum, existem outros específicos de cada espécie, e portanto podem apresentar propriedades biológicas distintas.

Os escassos estudos *in vivo* mostram que o gênero *Pfaffia* apresenta ação analgésica, antiinflamatória e antineoplásica^{45,74,75,81,82,107,116,127}, o que nos motivou a testar a ação quimiopreventiva da *P. glomerata*, uma planta brasileira nativa, em um modelo experimental de indução de carcinogênese já implantado em nosso laboratório²⁶.

Não há consenso na literatura quanto à dose, à forma, à via e ao período de administração dos vários extratos de plantas medicinais, pois este fato depende do extrato e do modelo experimentais a ser utilizado. As doses de 200, 400 e 1000mg/kg/dia, utilizadas neste experimento, foram baseadas em estudos semelhantes em modelos experimentais, que mostraram uma variação de 50 a 1000mg/kg/dia^{45,74,82,90,95,104}.

A nossa opção pela diluição do extrato liofilizado de *P. glomerata* em água baseou-se em estudos com modelos animais^{45,82,104}.

Em relação à via de administração a literatura mostra que a maioria dos modelos experimentais utiliza a gavagem para a administração oral do extrato de plantas medicinais^{13,74,82,95}. Entretanto, durante o projeto piloto deste experimento foram feitas inúmeras tentativas de administração pela gavagem e não obtivemos sucesso no acesso ao esôfago destes animais devido ao calibre muito fino e delicado do mesmo.

Diferentemente de outros autores, que utilizaram ratos^{97,105,117} como modelo experimentais, nosso trabalho avaliou camundongos, os quais apresentam um tamanho reduzido quando comparados aos ratos. Desta maneira, este fato dificultou a administração do medicamento via gavagem e o extrato de *P. glomerata* foi adicionado à água filtrada e a solução colocada em frascos de beber que foram acoplados às gaiolas dos animais, e oferecidos *ad libitum*, assim como realizado por outros autores^{44,50,64,90}.

Durante o projeto piloto realizamos um experimento durante quinze dias para estimar a quantidade de água ingerida por cada animal por dia e verificamos que eram consumidos em média 20ml de água. Desta maneira, como em cada gaiola foram alojados oito animais, o extrato de *P. glomerata* foi diluído em 160ml de água filtrada.

A escolha de camundongos *hairless* para este experimento baseou-se em nosso estudo anterior e de outros autores que mostraram grande sucesso na utilização destes animais nos modelos de indução da carcinogênese^{26,61,89,93,112}, mostrando-se perfeitamente adaptável ao estudo da quimioprevenção do câncer de pele.

O DMBA foi utilizado neste trabalho, pois é considerado um carcinógeno completo, ou seja, possui atividade iniciadora e promotora⁵², garantindo, desta forma, o desenvolvimento de todo o processo de carcinogênese sem a necessidade de utilização de outros carcinógenos¹⁶.

Existem controvérsias na literatura quanto à concentração de DMBA. Os estudos mostram uma variação de 0,25% a 0,5%^{43,61,80}. De

acordo com os trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório a concentração da solução de DMBA a 0,5% diluída em acetona é efetiva no processo de indução do CEC, produzindo o máximo de resposta em um curto período de latência^{16,26,60,71,77}.

Neste experimento a toxicidade gerada pelas diferentes doses de *P. glomerata* foi avaliada, pois julgamos que a análise de toxicidade é muito importante, pois há inúmeros relatos na literatura, mostrando que as plantas medicinais podem desencadear graves efeitos colaterais^{2,32,62,96,98}.

Como o principal órgão de metabolização e de excreção das substâncias e medicamentos ingeridos são o fígado e os rins, realizamos algumas análises que permitem avaliar suas funções. Para avaliação de fígado foram feitas as análises de fosfatase alcalina (ALP) e aspartato aminotransferase (AST), cuja elevação sérica indica hepatotoxicidade⁶² e para os rins a análise da concentração de uréia. Não foi observada diferença estatística entre os grupos controle e experimentais em relação à ALP, AST e uréia.

Os valores obtidos da concentração de ALP, AST e uréia não foram homogêneos dentro dos grupos avaliados, tanto no controle quanto nos experimentais. Acreditamos que este fato se deva a dificuldade que tivemos na coleta do sangue dos animais devido ao calibre muito pequeno da artéria aorta dos camundongos *hairless*. A dificuldade de coleta em seringa de vidro heparinizada fez com que ocorresse a hemólise do sangue de alguns animais, levando a alteração nos valores reais das enzimas e da uréia.

Apesar de não ter sido observada diferença estatística entre os grupos controle e experimentais na avaliação de toxicidade, foi possível notar que os animais dos grupos experimentais (E1, E2 e E3) apresentaram presença maior de infiltrado inflamatório mononuclear do que o grupo controle, tanto em fígado quanto em rins, com exceção do grupo E2 em rins.

Não há relato na literatura sobre a toxicidade da *P. glomerata* em modelos animais e poucos são os trabalhos^{74, 75, 90,106} que investigaram a toxicidade apresentada pela *P. paniculata*.

Comparando nosso estudo com os trabalhos que avaliaram a toxicidade da *P. paniculata*, observamos que o trabalho de Silva¹⁰⁶ está em desacordo com o nosso no que se refere à análise de AST, pois mostrou que camundongos tratados com 10% da raiz de *P. paniculata* apresentaram níveis significativamente superiores de AST, quando comparados com os tratados com 0,5 e 2%.

Por outro lado, o estudo de Silva¹⁰⁶ corrobora com o nosso no que se refere à análise histopatológica, pois mostrou presença de infiltrado inflamatório mononuclear no grupo tratado com maior dose de *P. paniculata*. Em contrapartida, Matsuzaki et al.⁷⁴ não encontraram alterações histopatológicas em fígado, rins e baço nos animais tratados com as dosagens de 200 e 400 mg/Kg de *P. paniculata*.

O estudo de Mazzanti e Braghiroli⁷⁵ mostrou que animais tratados com a dose de 10g/kg de *P. paniculata* apresentaram reações adversas, como sedação, perda de coordenação motora, perda de reflexos e hipotermia, enquanto que os animais que receberam dosagens de 2,5 e 5 g/kg não apresentaram nenhuma alteração.

Não há relato na literatura sobre a utilização da *P. glomerata* como agente quimiopreventivo do câncer e poucos são os trabalhos que mostram a ação antineoplásica da *P. paniculata*^{74,107,127}.

Estes estudos não elucidaram o mecanismo de ação da *P. paniculata*, o que nos levou a investigar a possibilidade da ação da *P. glomerata* sobre a angiogênese, a apoptose e a proliferação celular. Além disso, tais mecanismos têm sido pouco explorados em modelos experimentais de carcinogênese o que também nos motivou avaliá-los em nosso modelo de carcinogênese química por meio da análise imunoistoquímica.

O VEGF age induzindo a proliferação, migração e diferenciação de novos vasos sanguíneos. É promotor da angiogênese em muitos tipos de câncer, e assim, tem sido alvo de inúmeros estudos⁵⁷. A literatura mostra que na carcinogênese química induzida pelo DMBA em pele de camundongos, a marcação pelo VEGF é detectada em células da epiderme e em vasos sanguíneos presentes em hiperplasias, papilomas, displasias e carcinomas espinocelulares, indicando que estas células proliferam nas diferentes etapas do processo de carcinogênese^{17,30,80}.

Os nossos resultados mostraram que a avaliação da angiogênese pela marcação imunoistoquímica com o VEGF mostrou uma tendência à significância quando comparados os grupos controle e experimentais. Foi realizado então o teste de Spearman que se mostrou significativo. Houve correlação entre o índice de positividade de VEGF e a graduação de malignidade, ou seja, quanto maior o número de células VEGF-positivas, maior a graduação de malignidade.

Os relatos da literatura estão de acordo com nossos resultados, pois mostram o aumento da angiogênese e da expressão de VEGF durante o desenvolvimento tumoral, tanto em modelos animais^{30,80,81} quanto em tecidos humanos^{57,63,65,114}.

Os estudos revelam também a correlação entre o comportamento agressivo dos cânceres e o aumento da expressão de VEGF^{57,65,80,114}.

Os nossos resultados corroboram com o estudo de Nayaha et al.⁸⁰ que revelou em lesões não-infiltrativas a expressão de VEGF nas camadas mais superficiais do epitélio. Por outro lado, nosso trabalho difere do estudo acima referido, pois os autores verificaram que a expressão de VEGF em lesões infiltrativas ocorreu em todas as camadas do epitélio.

O bcl-2 e bax são genes importantes envolvidos no processo de apoptose. Estudos imunoistoquímicos têm mostrado o

aumento gradual no número de células bcl-2 e bax-positivas durante o desenvolvimento da carcinogênese experimental^{7,85,91,101}.

Em nosso estudo não foi observado diferença estatística significativa entre o grupo controle e os experimentais em relação ao índice de positividade de bax e bcl-2 e ao índice apoptótico. Também não foi observada correlação entre o número de células bax-positivas, bcl-2-positivas, índice apoptótico e a graduação de malignidade.

Contudo, estudos mostram um aumento das proteínas que suprimem a apoptose, como a bcl-2 e uma diminuição da expressão das proteínas pró-apoptóticas, como a bax em CEC cutâneo^{13,23,56,100}.

No presente estudo as células com marcação bax-positiva foram observadas nas camadas espinhosa e granulosa do epitélio, tanto em lesões não-infiltrativas quanto nas infiltrativas.

Os nossos resultados estão de acordo com relatos da literatura que mostraram que em epitélio normal e em lesões não-infiltrativas a marcação pela bax é notada nas camadas mais superficiais do epitélio^{35,91,101}. Delehedde et al.³⁶ relatam a expressão de bax nas camadas espinhosa e granulosa do epitélio. O nosso trabalho está em desacordo com o de Nishimura⁸⁵ que verificou que em derme sem alteração histológica, a marcação pela bax é observada nas camadas basal e espinhosa do epitélio.

Em relação às lesões infiltrativas nosso estudo está em desacordo com o de Nishimura⁸⁵ e Ribeiro et al¹⁰¹ que verificaram em lesões displásicas e em CECs a marcação pela bax em todas as camadas do epitélio. Por outro lado, corrobora com estes estudos, pois os autores observaram também a expressão nas células periféricas das ilhotas tumorais de CEC.

A expressão de bcl-2 também foi observada nas camadas espinhosa e granulosa nas lesões não-infiltrativas e nas infiltrativas, sendo que esta última também mostrou marcação nas ilhotas tumorais.

Os resultados de bcl-2 nas lesões não-infiltrativas mostrou-se diferente dos encontrados por Delehedde et al.³⁶, Nishimura⁸⁵ e Ribeiro et al.¹⁰¹. Os autores verificaram que nestas lesões a marcação pela bcl-2 é observada nas camadas basal e suprabasal do epitélio. Em relação às lesões infiltrativas, nosso trabalho difere do de Nishimura⁸⁵ e Ribeiro et al.¹⁰¹ que observaram a expressão pela bcl-2 em todas as camadas do epitélio e está de acordo quando estes autores se referem a expressão nas ilhotas tumorais em CECs.

A relação entre o potencial maligno das neoplasias e a atividade de proliferação celular pode ser avaliada usando-se o marcador PCNA, que permite verificar a verdadeira fração proliferativa da entidade estudada^{46,86}.

O presente estudo não mostrou diferença estatística significativa na análise de PCNA quando comparado os grupos controle e experimentais. Entretanto, foi observada correlação significativa entre a expressão de PCNA e os graus de malignidade.

Estes resultados estão de acordo com outros estudos^{46,86,91} que mostraram a correlação entre a graduação histológica de malignidade e o índice de células PCNA-positivas em carcinoma de boca e de colo de útero. Mostrando que os casos com maior graduação histológica apresentaram maior potencial proliferativo, o que contribui para um comportamento mais agressivo destas lesões.

No presente estudo a marcação PCNA-positiva foi observada na camada basal do epitélio em lesões não-neoplásicas e nas camadas basal e espinhosa em lesões neoplásicas.

Nossos achados corroboram com os estudos de Delehedde et al.³⁵, Fabbrocini et al.⁴² e Ouhtit et al.⁹¹ que mostraram que a expressão de PCNA em lesões não-infiltrativas restringe-se à camada basal, enquanto que em lesões displásicas e em CEC a marcação pode ser observada também na camada suprabasal do epitélio.

Embora não tenha sido observada diferença estatística significativa entre o grupo controle e os experimentais em relação à graduação de malignidade, acreditamos que este fato seja decorrente do número pequeno de animais por grupo, os nossos resultados mostraram que os grupos experimentais apresentaram maior número de lesões infiltrativas do que o grupo controle.

Desta maneira, o presente estudo mostrou que o extrato liofilizado de *P. glomerata* não apresentou a ação quimiopreventiva esperada. Fato que pode estar relacionado à metodologia empregada e à amostragem pequena de animais utilizada neste experimento.

Além disso, a presença de infiltrado inflamatório mononuclear em fígado e rins revelou que as doses de 200, 400 e 1000mg/kg/dia mostraram indícios de toxicidade hepática e renal.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que o tratamento com as doses de 200, 400 e 1000mg/kg/dia de extrato liofilizado de *P. glomerata* não apresentou ação quimiopreventiva e revelou indícios de toxicidade hepática e renal neste modelo experimental.

8 REFERÊNCIAS *

- 1 Abebe W. Herbal medication: potential for adverse interactions with analgesic drugs. *J Clin Pharm Therap.* 2002 Dec.; 27(6):391-401.
- 2 Aithal GP. When is a herb a drug? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005 Apr.;17(4):391-3.
- 3 Alberts J, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia molecular da célula.* Porto Alegre: Artmed; 2006.
- 4 Albini A, Tosetti F, Benelli R, Noonan DM. Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Res.* 2005 Dec.; 65(23):10637-41.
- 5 Alessi P, Ebbinghaus C, Neri D. Molecular targeting of angiogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Mar.;1654(1):39-49.
- 6 Amorim LCA. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Rev Bras Epidemiol.* 2003 jun.; 6(2):158-70.
- 7 Assis GF, Ceolin DS, Marques ME, Salvadori DM, Ribeiro DA. Cigarette smoke affects apoptosis in rat tongue mucosa: role of bcl-2 gene family. *J Mol Histol.* 2005 Oct.;36(8-9):483-9.

* Baseado em:

International Comitê of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscript submitted to biomedical journals: simple referents [homepage na Internet]. Bethesda: US National Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- 8 Backvall H, Wolf O, Hermelin H, Weitzberg E, Ponten F. The density of epidermal p53 clones is higher adjacent to squamous cell carcinoma in comparison with basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2004 Feb.;150(2):259-66.
- 9 Balasenthil S, Rao KS, Nagini S. Altered cytokeratin expression during chemoprevention of hamster buccal pouch carcinogenesis by S-allylcysteine. *J Oral Pathol Med*. 2002 Mar.;31(3):142-6.
- 10 Bánóczy J, Csiba Á. Occurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. Analysis and follow-up study of 12 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1976 Dec.;42(6):766-74.
- 11 Baudouin C, Charveron M, Tarroux R, Gall Y. Environmental pollutants and skin cancer. *Cell Biol Toxicol*. 2002;18(5):341-8.
- 12 Bedi MK, Shenefelt PD. Herbal therapy in dermatology. *Arch Dermatol*. 2002 Feb.;138 (2):232-42.
- 13 Bhuvaneswari V, Rao KS, Nagini S. Altered expression of anti and proapoptotic proteins during chemoprevention of hamster buccal pouch carcinogenesis by tomato and garlic combination. *Clin Chim Acta*. 2004 Dec.;350 (1-2):65-72.
- 14 Bisacchi D, Benelli R, Vanzetto C, Ferrari N, Tosetti F, Albin A. Anti-angiogenesis and angioprevention: mechanisms, problems and perspectives. *Cancer Detect Prev*. 2003;27(3):229-38.
- 15 Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control*. 1997 May; 8(3): 444-72.

- 16 Bolanho A, Carmo ED, Sousa FACG, Carvalho YR, Rosa LEB. Descrição da metodologia utilizada no estudo da carcinogênese induzida pelo DMBA em língua de hamster. Rev Odontol UNESP. 2005;34(3):129-33.
- 17 Bolontrade MF, Stern MC, Binder RL, Zenklusen JC, Gimenez-Conti IB, Conti CJ. Angiogenesis is an early event in the development of chemically induced skin tumors. Carcinogenesis. 1998 Dec.;19(12):2107-13.
- 18 Bonne C. Sur la présence de papillomes sur les muqueuses d' animaux badigeonnées au goudron. Comptes Rendus. Société de Biologie. 1925;93:907 apud Eveson JW. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: a review. J Oral Pathol. 1981 June;10(3):129-46.
- 19 Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil [texto on line]. Rio de Janeiro: INCA; 2005 [citado em 01 jun. 2007]. 94p. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/versaofinal.pdf>.
- 20 Brasileiro Filho G. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: Brasileiro Filho G. Bogliolo. Patologia geral. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2004. Cap.8, p.173-234.
- 21 Brentani MM, Coelho FRG, Kowalski LP. Bases da oncologia. 2. ed. São Paulo: Tecmedd; 2003.
- 22 Broders AC. Carcinoma: grading and practical applications. Arch Pathol. 1926 ;2:376-81.

- 23 Bush JA, Li G. The role of bcl-2 family members in the progression of cutaneous melanoma. *Clin Experim Metast.* 2003;20(6):531-9.
- 24 Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res.* 2000 Feb.;33(2):179-89.
- 25 Capasso R, Izzo AA, Pinto L, Bifulco T, Vitobello C, Mascolo N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia.* 2000 Aug.;71 (Suppl 1):S58-65.
- 26 Carmo ED. Carcinoma epidermóide induzido quimicamente pelo DMBA em pele de camundongos hairless: estudo clínico, histológico e histoquímico [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2004.
- 27 Carmo ED, Costa Pereira A, Brandão AAH, Blumer Rosa LE. Agentes naturais e seus derivados na quimioprevenção do câncer de pele. *Rev Soc Bras Câncer.* 2007; 14:38-43.
- 28 Chitturi S, Farrell GC. Herbal hepatotoxicity: an expanding but poorly defined problem. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000 Oct.; 15(10):1093-9.
- 29 Chun KS, Kim SH, Song YS, Surh YJ. Celecoxib inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and activation of AP-1 and p38 MAP kinase in mouse skin. *Carcinogenesis.* 2004 May;25(5):713-22.

- 30 Conti CJ. Vascular endothelial growth factor: regulation in the mouse skin carcinogenesis model and use in antiangiogenesis cancer therapy. *Oncologist*. 2002;7 (Suppl 3):4-11.
- 31 Cooper GM. Câncer. In: Cooper GM. A célula uma abordagem molecular. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2001. p.633-74.
- 32 Corns CM. Herbal remedies and clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem*. 2003 Sept.;40(Pt 5):489-597.
- 33 Cotran RS, Kumar V, Collins T. Neoplasia. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins patologia estrutural e funcional. 6.ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. Cap. 8, p.233-95.
- 34 Cunha AP. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia [texto on line]. [citado em 20 jul. 2006]. Disponível em: http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/aspectos_historicos.pdf
- 35 Delehedde M, Cho SH, Sarkiss M, Brisbay S, Davies M, El-Naggar AK et al. Altered expression of bcl-2 family member proteins in nonmelanoma skin cancer. *Cancer*. 1999 Apr.;85(7):1514-22.
- 36 Deng JF. Clinical and laboratory investigations in herbal poisonings. *Toxicol*. 2002 Dec.;181-2:571-6.
- 37 Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol*. 2002 Apr.;146 (Suppl 61):1-6.
- 38 Einspahr JG, Stratton SP, Bowden GT, Alberts DS. Chemoprevention of human skin cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002 Mar.;41(3):269-85.

- 39 Ernst E. Adverse effects of herbal drugs in dermatology. *Br J Dermatol.* 2000 Nov.;143(5):923-9.
- 40 Ernst E. Serious psychiatric and neurological adverse effects of herbal medicines: a systematic review. *Acta Psychiatr Scand.* 2003 Aug.; 108(2):83-91.
- 41 Eveson JW. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: a review. *J Oral Pathol.* 1981 June;10(3):129-46.
- 42 Fabbrocini G, Russo N, Pagliuca MC, Delfino M, Staibano S, Molea G et al. p53, cyclin-D1, PCNA, AgNOR expression in squamous cell câncer of the lip: a multicenter study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2000 Aug.;16(4):172-7
- 43 Fassoni AA, Salles CFF, Consolaro A. Carcinogênese bucal quimicamente induzida por DMBA: estudo em hamsters sírios dourados. *Rev Odontol USP.* 1993 out./dez.;7(4):285-91.
- 44 F'guyer S, Afaq F, Mukhtar H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2003 Apr.;19(2):56-72.
- 45 Freitas CS, Baggio CH, Da Silva-Santos JE, Rieck L, Moraes Santos CA, Correia Junior C et al. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, *Amaranthaceae*, in rats. *Life Sci.* 2004 Jan.;74(9):1167-79.

- 46 Gaiotto MAM. Relação entre a atividade proliferativa do epitélio e a resposta angiogênica estromal em neoplasias intra-epiteliais do colo uterino. RBGO. 2000 jun.;22(6):339-45.
- 47 Garay HM, Alves J, Ochucci JM, Belizário JE. Degradação seletiva de proteínas e suas implicações no câncer. Rev Biotecnol Ciên Desenvol. 2003 jan./jun.;30:60-70.
- 48 Greenwald P. Cancer chemoprevention. BMJ. 2002 Mar.;324(7339):714-8.
- 49 Guerra MR, Gallo CVM, Mendonça GAS. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. Rev Bras Cancerol. 2005;51(3):227-34.
- 50 Gupta S, Mukhtar H. Chemoprevention of skin cancer: current status and future prospects. Cancer Metastasis Rev. 2002;21(3-4):363-80.
- 51 Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia médica. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. 1014p
- 52 Guzman-Silva MAG, Guimarães JSP. Carcinogênese química cutânea. Rev Bras Cancerol. 1985; 31(4): 285-91.
- 53 Harrist TJ et al. Skin. In: Rubin E, Farber JL. Pathology. 3.ed. New York: Lippincott-Raven; 1998; p.1237-98.

- 54 Heller B, Klufftinger AM, Davis NL, Quenville NF. A modified method of carcinogenesis induction in the DMBA hamster cheek pouch model of squamous neoplasia. *Am J Surg.* 1996 Dec.;172(6):678-80.
- 55 Hsu S, Singh B, Schuster G. Induction of apoptosis in oral cancer cells: agents and mechanisms for potential therapy and prevention. *Oral Oncol.* 2004 May;40(5):461-73.
- 56 Hussein MR, Al-Badaiwy ZH, Guirguis MN. Analysis of p53 and bcl-2 protein expression in the non-tumorigenic, pretumorigenic, and tumorigenic keratinocytic hyperproliferative lesions. *J Cutan Pathol.* 2004 Nov.;31(10):643-51.
- 57 Johnstone S, Logan RM. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2006 Apr.; 42(4): 337-42.
- 58 Kakizoe T. Chemoprevention of cancer: focusing on clinical trials. *Jpn J Clin Oncol.* 2003 Sept.;33(9):421-42.
- 59 Katiyar SK, Ahmad N, Mukhtar H. Green tea and skin. *Arch Dermatol.* 2000 Aug.;136(8):989-94.
- 60 Kitakawa D. Utilização do AgNOR no processo de carcinogênese quimicamente induzida pelo DMBA em borda lateral de língua de hamsters Sírio Dourado [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2003.

- 61 Kligman LH, Elenitsas R. Melanoma induction in a hairless mouse with short-term application of dimethylbenz[a]anthracene. *Melanoma Res.* 2001 Aug.;11(4):319-24.
- 62 Kumar NB, Allen K, Bell H. Perioperative herbal supplement use in cancer patients: potential implications and recommendations for presurgical screening. *Cancer Control.* 2005 July;12(3):149-57.
- 63 Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis NJ. Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005 Sept.;131(9):624-30.
- 64 Li N, Chen X, Liao J, Yang G, Wang S, Josephson Y et al. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamsters by tea and curcumin. *Carcinogenesis.* 2002 Aug.;23(8):1307-13.
- 65 Loggini B, Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Camacci T, De Jeso K et al. CD34 microvessel density and VEGF expression in basal and squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2003;199(11):705-12.
- 66 Lopes HJJ. Enzimas no laboratório clínico [texto on line]. 2005 [citado em 04 jun. 2007]. Disponível em: http://www.goldanalisa.com.br/publicacoes/enzimas_no_laboratorio_clinico.pdf.
- 67 Loureiro APM, Di Mascio P, Medeiros MHG. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. *Quím Nova.* 2002 set./out.;25(5):777-93.

- 68 Louro ID. Ongogenética: parte 1. Rev Soc Bras Cancerol. 2000 jul./set.;3(11):36-45.
- 69 Louro ID, Llerena Júnior JC, Melo MSV, Ashton-Prolla P, Conforti-Froes N. Genética molecular do câncer. São Paulo: MSG Produção; 2002.
- 70 Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. Carcinogenesis. 2000 Mar.; 21(3):485-95.
- 71 Magalhães FAC. Estudo comparativo entre os aspectos citológicos e histológicos afeitos à evolução da carcinogênese induzida por DMBA (9,10-dimetil-1,2-benzantraceno) em bordo lingual de hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*) [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2004.
- 72 Mainenti P. Carcinogênese quimicamente induzida por DMBA em glândulas salivares submandibulares de ratos (*Rattus norvegicus*) [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2006.
- 73 Mans DRA, Rocha AB, Schwartzmann G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist*. 2000;5 (3):185-98.
- 74 Matsuzaki P, Akisue G, Salgado Oloris SC, Gorniak SL, Zaidan Dagli ML. Effect of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form. *Life Sci*. 2003 Dec.;74(5):573-9.

- 75 Mazzanti G, Braghiroli L. Analgesic anti-inflammatory action of *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze. *Phytoth Res.* 1994;8 (7):413-6.
- 76 Michaluart P Júnior. Quimioprevenção e retinóides. In: Parise OJ. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000. p.235-44.
- 77 Monteiro AD. Estudo comparativo entre os aspectos clínicos, histopatológicos e das regiões organizadoras nucleolares pela impregnação pela prata (AgNOR) na evolução do carcinoma epidermóide quimicamente induzido por 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) em língua de hamsteres sírios dourados (*Mesocricetus auratus*) [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2004.
- 78 Moura RA, Wada CS, Purchio A, Almeida TV. Determinações bioquímicas. Técnicas de laboratório. 3.ed. São Paulo: Athenen; 1994. p.35-96.
- 79 Nakai S, Takagi N, Miichi H, Hayashi S, Nishimoto N, Takemoto T et al. Pfaffosides, nortriterpenoid saponins, from *Pfaffia paniculata*. *Phytochemist.* 1984; 23(8):1703-5.
- 80 Näyhä V, Laitakari J, Stenbäck F. Stage-dependent expression of an angiogenic agent and vascular organization in experimental skin tumor development. *Toxicol Pathol.* 2003 Sept.Oct.;31(5):539-48.

- 81 Neto AG, Costa JM, Belati CC, Vinholis AH, Possebom LS, Da Silva Filho AA et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. *J Ethnopharmacol.* 2005 Jan.;96(1-2):87-91.
- 82 Neto AG, Silva Filho AA, Costa JM, Vinholis AH, Souza GH, Cunha WR et al. Evaluation of the trypanocidal and leishmanicidal in vitro activity of the crude hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) roots. *Phytomedicine.* 2004 Nov.;11(7-8):662-5.
- 83 Niggemann B, Grubber C. Side-effects of complementary and alternative medicine. *Allergy.* 2003 Aug.;58(8):707-16.
- 84 Nishimoto N, Nakai S, Takagi N, Hayashi S, Takemoto T, Odashima S. Pfaffosides and nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. *Phytochemist.* 1984;23(1):139-42.
- 85 Nishimura A. Changes in bcl-2 and bax expression in rat tongue during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced carcinogenesis. *J Dent Res.* 1999 June;78(6):1264-9.
- 86 Novellino ATN, Amorim RFB, Queiroz, LMG, Freitas RA. Análise da imunoexpressão do PCNA e p53 em carcinoma de células escamosas oral. Correlação com a gradação histológica de malignidade e características clínicas. *Acta Cir Bras.* 2003 set./out.; 18(5): 458-64.
- 87 Oliveira F. *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze: o ginseng brasileiro. *Rev Bras Farmacognosia.* 1986 jan./jun.;1(1):86-92.

- 88 Oliveira F, Akisue G, Akisue MK. Contribuição para o estudo farmacognóstico do "ginseng brasileiro" *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze. *An Farm Quím S. Paulo*.1980 jan./dez.;20(1/2):261-77.
- 89 Orengo IF, Gerguis J, Phillips R, Guevara A, Lewis AT, Black H. Celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor as a potential chemopreventive to UV-induced skin cancer. *Arch Dermatol*. 2002 June;138(6):751-5.
- 90 Oshima M, Gu Y. *Pfaffia paniculata* induced changes in plasma estradiol-17 β , progesterone and testosterone levels in mice. *J Reprod Dev*. 2003 Apr.;49(2):175-80.
- 91 Ouhtit A, Muller HK, Davis DW, Ulrich SE, McConkey D, Ananthaswamy HN. Temporal events in skin injury in the early adaptive responses in ultraviolet-irradiated mouse skin. *Am J Pathol*. 2000 Jan.;156(1):201-7.
- 92 Panizza S. Fáfia. Plantas que curam (cheiro de mato). 24.ed. São Paulo: IBRASA; 2001. p.105-6.
- 93 Pentland AP, Schoggins JW, Scott GA, Khan KN, Han R. Reduction of UV-induced skin tumors in hairless mice by selective COX-2 inhibition. *Carcinogenesis*. 1999 Oct.;20(10):1939-44.
- 94 Pereira Netto AD, Moreira JC, Dias AEXO, Arbilla G, Ferreira LFV, Oliveira AS et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) e seus derivados nitrados (NHPAS): uma revisão metodológica. *Quím Nova*. 2000;23(6):765-73.

- 95 Pinello KC, Fonseca ESM, Akisue G, Silva AP, Oloris SCS, Sakai M et al. Effects of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) extract on macrophage activity. *Life Sci.* 2006 Feb.;78(12):1287-92.
- 96 Provasi M, Oliveira CE, Martino MC, Pessini LG, Bazotte RB, Cortez DAG. Avaliação da toxicidade e do potencial antihiperlipemizante da *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae). *Acta Scientiarum.* 2001 Jun.;23(3):665-9.
- 97 Queiroga CL. *Pfaffia paniculata* Kuntze (Amaranthaceae). *Rev Racine.* 2004 jan.;78:56-62.
- 98 Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon.* 2001 May;39(5):603-13.
- 99 Rates SMK, Gossman G. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. *Rev Bras Farmacog.* 2002 jul./dez.;12(2):85-93.
- 100 Reed J. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol.* 1999 Jan.;11(1):68-79.
- 101 Ribeiro DA, Salvadori DM, Marques ME. Abnormal expression of bcl-2 and bax in rat tongue mucosa during the development of squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Int J Exp Pathol.* 2005 Dec.;86(6):375-81.
- 102 Roy AM. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity with thymolphthalein monophosphate. *Clin Chem.* 1970 May;6(5):31-6.

- 103 Salley JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. *J Dent Res.* 1954 Apr.;33(2):253-62 apud Heller B, Klufftinger AM, Davis NL, Quenville NF. A modified method of carcinogenesis induction in the DMBA hamster cheek pouch model of squamous neoplasia. *Am J Surg.* 1996 Dec.;172(6):678-80.
- 104 Sanches NR, Galletto R, Oliveira CE, Bazotte RB, Cortez, DAG. Avaliação do potencial anti-hiperglicemiante da *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae). *Acta Scientiarum.* 2001;23(2):613-7.
- 105 Shiobara Y, Inoue S, Kato K, Nishiguchi Y, Oishi Y, Nishimoto N et al. A nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. *Phytochemist.* 1993 Apr.;32(6):1527-30.
- 106 Silva TC. Efeitos da *Pfaffia paniculata* (ginseng brasileiro) sobre lesões preneoplásicas em camundongos submetidos a modelo de hepatocarcinogênese [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2003.
- 107 Silva TC, Silva AP, Akisue G, Avanzo LJ, Kazumi NM, Fukumasu H et al. Inhibitory effects of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on preneoplastic and neoplastic lesions in a mouse hepatocarcinogenesis model. *Cancer Lett.* 2005 Aug.;226(2):107-13.
- 108 Sorenson CM. Bcl-2 family members and disease. *Bioch Bioph Acta.* 2004 Mar.;1644(2-3):169-77.
- 109 Sporn MB. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res.* 1976 July;36(7 PT 2):2699-702.

- 110 Sporn MB, Suh N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nature Rev.* 2002 July;2(7):537-43.
- 111 Stedman C. Herbal hepatotoxicity. *Semin Liver Dis.* 2002;22(2):195-206.
- 112 Stenbäck F, Mokinen MJ, Tommi J, Kowppilas S, Juha R, Talue L et al. The extracellular matrix in skin tumor development – a morphological study. *J Cut Pathol.* 1999 Aug.;26(7):327-38.
- 113 Stickel F, Patsenker E, Schuppan D. Herbal hepatotoxicity. *J Hepatol.* 2005 Nov.;43(5):901-10.
- 114 Strieth S, Hartschuh W, Pilz L, Fusenig NE. Angiogenic switch occurs late in squamous cell carcinomas of human skin. *Br J Cancer.* 2000 Feb.;82(3):591-600.
- 115 Takemoto T, Nishimoto N, Nakai S, Takagi N, Hayashi S, Odashima S et al. Pfaffic acid, a novel nortriterpene from *Pfaffia paniculata* Kuntze. *Tetrahedron Letters.* 1983;24(10):1057-60.
- 116 Taniguchi SF, Bersani-Amado CA, Sudo LS, Assef SMC, Oga S. Effect of *Pfaffia iresinoides* on the experimental inflammatory process in rats. *Phytot Res.* 1997;11:568-71.
- 117 The Jackson Laboratory. JAX ® Mice Data Sheet [text on line]; [cited on 2006 Apr. 10]. Disponível em: <http://jaxmice.jax.org/strain/000673.html>.
- 118 Tsai KY, Tsao H. The genetics of skin cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2004 Nov.;131C(1):82-92.

- 119 Turolla MSR, Nascimento ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Rev Bras Ciênc Farmac.* 2006 abr./jun.;42(2):289-306.
- 120 Veiga Junior VF, Pinto AC. Plantas medicinais: cura segura? *Quím Nova.* 2005 maio/jun.:28(3):519-28.
- 121 Vickers A. Botanical medicines for the treatment of cancer: rationale, overview of current data, and methodological considerations for phase I and II trials. *Cancer Invest.* 2002;20(7/8):1069-79.
- 122 Xu XC. COX-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, a recent development. *Anti-Cancer Drugs.* 2002 Feb.;13(2):127-37.
- 123 Yamagiwa K, Ichikawa K. On the experimental production of papilomas (in German). *Verh Jpn Pathol Ges*, v.5, p.142-8, 1915 apud Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control.* 1997 May; 8(3): 444-72.
- 124 Yamaguchi NH. Desenvolvimento de novos tratamentos para o câncer: da pesquisa básica ao uso clínico. *Rev Soc Bras Cancerol.* 2000 abr./jun.;3(10):6-14.
- 125 Yamanaka K, Mizol M, Kato K, Hasegawa A, Nakano M, Okada S. Oral administration of dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenic, in mice promotes skin tumorigenesis initiated by dimethylbenz(a)anthracene with or without ultraviolet B as a promoter. *Biol Pharm Bull.* 2001 May;24(5):510-4.

- 126 Walaszek Z, Hanausek M, Slaga TJ. Mechanisms of chemoprevention. *Chest*. 2004 May;125(Suppl 5):128S-33S.
- 127 Watanabe T, Watanabe M, Watanabe Y, Hotta C. Effects of oral administration of *Pfaffia paniculata* (brazilian ginseng) on incidence of spontaneous leukemia in AKR/J. [abstract] *Cancer Detect Prev*. 2000;24(2):173-8.
- 128 Ward LS. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002 ago.;46(4):351-60.

Anexo A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – São Dimas – CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9000 – FAX (12) 3947-9028 -

**Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos**

São José dos Campos, 16 de maio de 2007

Ofício nº 034/07-CEP

Prezado(a) Sr.(a)	ELAINE DIAS DO CARMO
Projeto	Avaliação da <i>Pfaffia paniculata</i> e <i>Pfaffia glomerata</i> como agentes quimiopreventivos na carcinogênese quimicamente induzida pelo DMBA em pele de camundongos Hairless: Estudo Clínico, histopatológico e imunoistoquímico
PARECER	
Foi aprovada a emenda ao projeto acima mencionado, com referência a ALTERAÇÃO DO NOME DO PROJETO , passando para “ Avaliação da ação sistêmica de <i>Pfaffia glomerata</i> na carcinogênese quimicamente induzida pelo DMBA em pele de camundongos Hairless ”. Convalidando dessa forma o Protocolo nº 016/2005-PA/CEP de 09/08/2005.	

Atenciosamente,

Prof. Dra. **SUELY CARVALHO MUTTI NARESSI**
Coordenadora do CEP/HUMANOS/FOSJC

Apêndice B – Ficha para avaliação histológica de pele: Bánóczy & Csiba (1976) e Broders (1926).

Avaliação Histológica de Pele Bánóczy & Csiba (1976) e Broders (1926)		Grupo: Animal nº	
		OBS 1	OBS 2
Queratinização	Ausente		
	Paraqueratina		
	Hiperparaqueratina		
	Ortoqueratina		
	Hiperortoqueratina		
Camada Granulosa	Ausente		
	Presente		
Epitélio	Sem projeções papilíferas		
	Com projeções papilíferas exofíticas		
	Hiperplasia		
	Atrofia		
	Acantose		
	Espongiose		
	Excitose		
Atipias epiteliais (Bánóczy & Csiba, 1976)	Pleomorfismo celular e nuclear		
	Perda de estratificação epitelial		
	Hipercromatismo nuclear		
	Aumento do tamanho do núcleo		
	Nucléolos aumentados		
	Duplicação da camada basal		
	Perda de continuidade da camada basal		
	Queratinização individual ou de grupo de células na:		
	- camada espinhosa		
	- camadas mais profundas		
	Projeção em gota dos cones epiteliais		
	Figuras mitóticas na porção mediana do epitélio		
	Mitoses atípicas		
	Aumento de figuras mitóticas		
Perda da coesão celular			
Perda da polaridade das células basais			
Graus de atipia (Bánóczy & Csiba, 1976)	Leve		
	Moderada		
	Intensa		
Diferenciação celular (Broders, 1926)	Grau 1		
	Grau 2		
	Grau 3		
	Grau 4		

Apêndice C – Ficha de avaliação macroscópica de fígado e rins.

Avaliação Macroscópica Fígado e Rins	Avaliador nº:	
	Grupo:	Animal nº:
	Fígado	Rins
Coloração		
Necrose		
Fibrose		
Hemorragia		
Observações		

Apêndice D – Ficha de avaliação histológica de fígado e rins.

Avaliação Histológica – Fígado e Rins		Avaliador nº:	
		Grupo:	Animal nº:
		Fígado	Rins
Degeneração Hidrópica	Presente		
	Ausente		
Degeneração Gordurosa	Presente		
	Ausente		
Necrose	Presente		
	Ausente		
Fibrose	Presente		
	Ausente		
Infiltrado Inflamatório	Presente		
	Ausente		
Lesão Vascular	Presente		
	Ausente		
Observações			

CARMO ED. Evaluation of systemic action of lyophilized extract of *Pfaffia glomerata* in the chemically induced carcinogenesis by DMBA on the skin of hairless mice. [Doctorate thesis]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos. UNESP – São Paulo State University; 2007.

ABSTRACT

The goals of this study were both to evaluate the effect of systemic administration of the extract of Pfaffia glomerata in the chemical carcinogenesis model on the skin of hairless mice, as well as to investigate the hepatic and renal toxicity of the administered doses. For that we have used 32 hairless mice, female, aged 5 weeks, distributed in control group (C) and experimental groups (E1, E2 e E3). The experimental groups E1, E2 e E3 received systemic administration of the lyophilized extract of P. glomerata in 200, 400 and 1000 mg/Kg/day doses, respectively, by oral means, during 15 weeks. Group C received only filtered water. Two weeks after the beginning of the lyophilized extract of P. glomerata administration, the animals were submitted to chemical carcinogenesis induced by the 0,5% DMBA brushed in the dorsal region. At the 15th week a clinical evaluation was conducted, skin biopsy made, blood sample collected and liver and kidneys of the animals removed. After that the following evaluation were conducted: histopathological and immunohistochemical evaluation of the skin lesions, histopatological evaluation of the organs, and toxicological evaluation of the blood samples. The blood samples went also thorough the following analysis: enzymatic activity of alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase and urea concentration. When comparing C and E groups, the Kruskal-Wallis statistical analysis has not shown any statistically significant difference of type, size and malignancy grading. It has not been observed statistically significant difference in the alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase and urea analysis. The Spearman correlation test showed significant relation for VEGF and PCNA and the χ^2 test for inflammatory infiltrate in the liver and kidneys. We therefore concluded that the treatment using 200, 400 and 1000mg/Kg/day of the lyophilized extract of P. glomerata in such an experimental model has not shown chemopreventitive action and revealed evidence of toxicity for liver and kidneys.

KEY-WORDS: Medicinal plants; chemoprevention; drug toxicity; 9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracene; squamous cell carcinoma; mice inbred HRS, immunohistochemistry.