

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Efeitos da *Lychnophora ericoides* (arnica brasileira) na
carcinogênese de cólon induzida experimentalmente pela
1,2- dimetilhidrazina

Cleverson Rodrigues Fernandes

Ribeirão Preto

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Cleverson Rodrigues Fernandes

Efeitos da *Lychnophora ericoides* (arnica brasileira) na carcinogênese de cólon induzida experimentalmente pela 1,2- dimetilhidrazina

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina. Área de concentração: Patologia experimental.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

Ribeirão Preto

2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cleverson Rodrigues Fernandes
Efeitos da *Lychnophora ericoides*
(arnica brasileira) na carcinogênese
de cólon induzida experimentalmente
pela 1,2- dimetilhidrazina

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre.
Área de concentração: Patologia Experimental

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Acima de tudo dedico a Deus, por ter me possibilitado estar aqui, por ter me enviado em uma família onde meus pais sempre priorizaram o caráter e a educação, sempre fazendo sacrifícios para o bem de todos os filhos. Obrigado Deus.

A meu grande pai, Cleber, que até hoje é meu herói, meu orgulho, o homem mais digno e honesto que já tive o privilégio de conviver, possuidor de uma sabedoria de vida única. Ensinou-me que o mais importante da vida é a paz interior, sempre me apoiou e se sacrificou pela minha educação, me chamando para a realidade quando eu sonhava sem objetivos, mas sem me tirar a emoção de sonhar. Te amo, te amo e te amo meu grande pai.

A minha saudosa mãe, Professora Eva, mulher guerreira, valente, obstinada e culta. Viveu em função dos filhos, falava com orgulho do filho que estava na USP, demonstrava que tudo era possível, sempre pronta para aconselhar com sabedoria, ajudava a todos sempre que podia e quando não podia. Me ensinou a ser digno, honesto e a fazer o bem sem olhar a quem, tinha verdadeira adoração pela educação. Te amo, te amo, te amo, saudade.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Britto, pela sabedoria como me conduziu, sempre enfatizando a responsabilidade moral e o amor à instituição, por ser meu molde profissional, por me mostrar todos os lados da pesquisa, pelos muitos “toques” dados, pela liberdade e confiança incomum, por ter me feito uma pessoa melhor e por sua dedicação e perseverança em me tornar um cientista. Professor obrigado pela chance.

A CAPES, pela bolsa concedida.

Às minhas irmãs, Mariela, Daniela e Julie, que apesar da distância física sempre estarão bem próximas do meu coração.

A minha namorada Karina, uma pessoa indispensável na minha vida, sempre companheira, responsável em grande parcela por minha realização profissional e pessoal. A mulher que escolhi para compartilhar todos os momentos da minha vida, te amo e muito obrigado.

Ao Prof. Dr Norberto Poperine Lopes, pela bondade e simplicidade ao me receber em seu laboratório, e pelo fornecimento da matéria prima, materiais e equipamentos para elaboração do extrato. Valeu “Betão”.

A Rosangela Orlandin Lopes e sua família, que me dão segurança e amizade. Um porto

seguro que ajuda a suportar a falta da minha família nesta cidade.

Especialmente a Aline e Patrícia as quais já estavam presentes quando aqui cheguei. Pessoas em quem posso confiar, me acolheram e ensinaram muito, sempre com respeito, honestidade, paciência e humildade. Obrigado amigas.

Aos companheiros do trabalho diário que se tornaram amigos para vida: Lisandra, Bachur, Célia, Vinícius, Tassiana, Luisiane, Kelé e Vespucio. Obrigado por sempre estarem de prontidão para todas as dificuldades em todas as horas, tanto para o trabalho quanto para o lazer.

Aos amigos da iniciação científica, do grupo de discussão de artigos e aos que estiveram comigo no desenvolvimento de vários projetos científicos: Pacu, Bunda, Herrero, Mauro, Pinga, Bruno, Ana, Maira, Gobbo e Andréa. Muito obrigado pelas boas idéias, disposição e entusiasmo em trabalhar.

As meninas da secretaria Édna Piu, Neide e Rosângela, por serem amigas solícitas e amáveis, sempre de bom humor, dispostas a ajudar e orientar.

Ao Paulinho do biotério, um amigo, “uma figura”, que sempre deu uma atenção especial aos meus animais.

Ao grande Toninho, um excelente anatomista, grande conhecedor da morfologia e patologia celular, sempre de bom humor e bondade contagiante.

Fernandes, C.R. **Efeitos da *Lychnophora ericoides* (arnica brasileira) na carcinogênese de cólon induzida experimentalmente pela 1,2- dimetilhidrazina.** 2007. 70 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007

RESUMO

Os focos de criptas aberrantes (FCAs) e o aumento do índice de proliferação celular do epitélio da mucosa retal (iPCNA) e de ciclooxigenase-2 (COX-2) servem como marcadores do risco de desenvolver o câncer de cólon, sendo usados na detecção precoce dos fatores que influenciam a carcinogênese colônica em ratos. Cinquenta ratos Wistar machos foram aleatoriamente divididos em quatro grupos. Todos os animais dos grupos G1 a G4 receberam quatro injeções do carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH) por duas semanas, sendo G5 o grupo controle e G1 recebendo apenas o DMH. Os grupos G2, G3 e G4 receberam o extrato de *Lychnophora ericoides* (LE), por 6, 4 e 2 semanas respectivamente. Os grupos G3 e G4 receberam o extrato de LE em fases distintas da carcinogênese, sendo G3 na fase de promoção e G4 na iniciação, e G2 durante as duas fases. Quarenta e dois dias após a primeira injeção de DMH para a indução neoplásica, foi observada redução, estatisticamente significativa, do número de FCAs, COX-2 e do iPCNA em todos os grupos que ingeriram o extrato de LE. Conclui-se que o extrato da *Lychnophora ericoides* atuou como fator inibidor da carcinogênese colônica.

Palavras chave: *Lychnophora ericoides*, câncer cólon, 1,2-dimetilhidrazina, focos de criptas aberrantes, inflamação, ciclooxigenase-2 e proliferação celular.

Fernandes, C.R. **Protective role of *Lychnophora ericoides* (a Brazilian Arnica) in 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis.** Faculdade de medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007

ABSTRACT

Aberrant crypt foci (ACF), cyclo-oxygenase-2 (COX-2) and colon rectal mucosal epithelial cell proliferation have been shown to increased in patients with neoplastic lesions of the large bowels and may serve as a marker risk for colorectal malignancy, have been used for early detection of factors that influence colorectal carcinogenesis in rats. Fifty male Wistar rats were randomly divided into five groups. All the animals were given four injections of the carcinogen 1,2-dimethylhydrazine (DMH) for two weeks less the group control G5 , G1 was the group that received only DMH, the groups G2, G3 and G4 received *Lychnophora ericoides* (LE) extracts for 6, 4 an 2 weeks respectively, G3 and G4 groups received LE at the post initiation and initiation phases of colonic carcinogenesis, and G2 in all the time of the experiment. Forty two days after the first injections of DMH for the neoplastic induction, we observed a statistically significant decrease number of cyclo-oxygenase-2 (COX-2), aberrant crypt foci (ACF) end proliferation cell (PCNA) in all groups. Thus, we concluded that *Lychnophora ericoides* extracts were effective against the colonic carcinogenesis.

Keywords: *Lychnophora ericoides*, câncer colon, 1,2-dimethylhydrazine, aberrant crypt foci, inflammation, cyclo-oxygenase-2 and proliferation cell.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1**- Número de células marcadas positivamente pelo PCNA por cripta por animal, em relação ao número total de células por cripta nos animais dos grupos I ao V 66
- Tabela 2**- Índices médios de células positivamente marcadas pelo PCNA (iPCNA) por animal dos grupos I ao V 67
- Tabela 3** - Média do número de FCAs/cm² por animal, contados 30 campos microscópicos, e seus respectivos desvios-padrões 68
- Tabela 4** - Índice médio dos FCAs/cm², por grupo. 69
- Tabela 5** - Relação entre o número total de células e o número de células fortemente coradas pela COX-2 70

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Foto da planta *Lychnophora ericoides* 15
- Figura 2** - Esquema do delineamento experimental dos grupos 28
- Figura 3** – Foto das criptas com células marcadas pelo PCNA 36
- Figura 4**– Gráfico de comparação estatística entre os resultados dos quatro grupos estudados em relação ao iPCNA médio por grupo 37
- Figura 5** – Foto dos focos de criptas aberrantes 39
- Figura 6** – Gráfico de comparação estatística entre os resultados dos quatro grupos estudados em relação ao número médio de FCAs/cm² por grupo 40
- Figura 7**- Células com marcação positiva (setas) para expressão de COX-2, na mucosa do cólon de ratos 41
- Figura 8** – Gráfico de comparação estatística entre os resultados do índice de células positivas para COX-2 nos cinco grupos estudados. 42

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

DMH – 1,2- dimetilhidrazina

DNA - Ácido desoxirribonucléico

FCAs – Focos de criptas aberrantes

H&E - Hematoxilina & Eosina

PCNA – Proliferating cell nuclear antigen

iPCNA - índice médio de células positivamente marcadas pelo PCNA

SD – Desvio-padrão

LE - *Lychnophora ericoides*

ROS – Espécies reativas de oxigênio

PGE2 – Prostaglandina E2

iNOS – Enzima óxido nítrico sintetase indutível

Pgs - Prostaglandinas

® - Marca registrada

COX-2 – ciclooxigenase-2

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de Siglas e Símbolos

1 – INTRODUÇÃO	14
1.1 - Propriedades da <i>Lychnophora ericoides</i>	15
1.2 – Câncer de cólon	17
1.2.1 – Câncer de cólon: epidemiologia	17
1.2.2 - O câncer de cólon no Brasil	17
1.3 - Os estágios da carcinogênese	18
1.4 – Câncer e inflamação	19
1.5 - Indução do câncer de cólon	20
1.5.1 - Carcinogênese química	20
1.6 - Marcadores biológicos (biomarcadores) da carcinogênese colônica	21
2 – JUSTIFICATIVA	24
3 - OBJETIVO	26
4 – MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1- Delineamento experimental	27
4.2 - Preparo dos extratos hidroalcoólicos de <i>L. Ericoides</i>	28
4.3 - Preparo do carcinógeno	29
4.4 - Cuidados na aplicação da DMH	29

4.5 - Coleta e processamento do material	30
4.6 - Focos de criptas aberrantes (FCAs)	31
4.7 – Imunohistoquímica	31
5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
6 – RESULTADOS	36
6.1 - A proliferação celular	36
6.2 - Contagem dos FCAs	38
6.3 – Expressão da COX-2	40
7 – DISCUSSÃO	44
8 – CONCLUSÃO	51
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
10 – ANEXOS	66

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Propriedades da *Lychnophora ericoides*

Lychnophora mart (Asteraceae) é um gênero de planta encontrado endemicamente no Brasil, abrangendo 68 espécies, conhecidas popularmente como "arnica da serra ou falsa arnica". Este gênero é restrito a regiões centrais sendo específica do cerrado brasileiro (ROBINSON, 1992; SEMIR, 1993; MANSANARES *et al.*, 2002). Entre as espécies de *Lychnophora*, a *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) é a mais utilizada popularmente (Figura 1). A medicina tradicional brasileira utiliza emplastos alcoólicos e hidroalcoólicos preparados das folhas e raízes da *Lychnophora ericoides* (LE) para o tratamento de feridas, inflamação e dor (CERQUEIRA *et al.*, 1987; LOPES, 2001).



Figura 1- Foto da planta *Lychnóphora ericoides*. Fonte: <http://www.pirenopolis.tur.br>

Investigações fitoquímicas prévias do extrato apolar de *Lychnophora ericoides*, evidenciaram vários compostos, entre eles a lactona sesquiterpênica (SIs), lignanas (Lg) e flavonoides (BORELLA *et al.*, 1998; BORSATO *et al.*, 2000; SAKAMOTO *et al.*,

2003). Uma grande variedade de propriedades farmacológicas é atribuída aos flavonoides, os quais estão presentes em várias espécies do reino vegetal consumidas diariamente em nossa dieta (frutas, vegetais, vinho tinto, chá preto e verde) apresentando propriedades anti-inflamatórias, anti-viral, anti-espasmódica, anti-tumoral e antioxidantes, além da modulação dos radicais livres, e inibição da ação de algumas enzimas (LIMASSET *et al.*, 1999; MIDDLETON JR. *et al*, 2000 ., KANASHIRO *et al*, 2004).

Investigações microscópicas da superfície das folhas da *L. ericoides* revelaram a presença da lactona sesquiterpênica que tem atividade anti-tumoral (PICMAN, 1986, KONISH *et al*, 2002). Além dos compostos goiasensolido e centraterina que são os mais potentes furanoeliandolidos (classe à qual pertencem essas substâncias), que são inibidores do fator NF-kB, que é o mensageiro celular responsável pelo início da inflamação (SAKAMOTO *et al*, 2003). A inibição do NF-KB pode ser observada na inibição da oncogênese e proliferação celular. Talvez este seja um importante alvo no entendimento da terapia contra o câncer (DOS SANTOS *et al* 2004; BORSATO *et al*, 2000; SAKAMOTO *et al*, 2003), embora a lactona sesquiterpênica tenha apresentado atividade antiinflamatória *in vitro*, o mesmo não foi evidenciado *in vivo*, no entanto este composto apresenta citotoxicidade (DOS SANTOS *et al*, 2004). Além disso a lactona sesquiterpênica é descrita como potente alérgico (GOBBO-NETO *et al*, 2005), sendo estas as razões para o isolamento e retirada do tricoma glandular na fase de elaboração do extrato usado neste trabalho.

As SLs possuem o composto 15-deoxigoiazensilido, com propriedades citotóxicas e genotóxicas desencadeador da apoptose e liberação de espécies reativas do oxigênio (VASCONCELOS *et al*, 2007)

Diferentes vitaminas e outros micronutrientes presentes nos vegetais, frutas e outros produtos das plantas, podem prevenir o desenvolvimento do câncer (carcinogênese), por meio da interferência na ação dos carcinógenos, e determinados agentes responsáveis por mutações genéticas e promotores de tumor (HANAUSEK *et al*, 2003)

Os Preparados contendo o extrato bruto da *lychnophora sp* e alguns de seus constituintes isolados tais como os flavonoides, são usados freqüentemente pela medicina popular brasileira como agente anti-inflamatório e analgésico (KANASHIRO *et al*, 2004)

Atualmente existem fortes evidências sugerindo que drogas anti-inflamatórias não esteroides reduzem o risco do desenvolvimento do câncer de cólon (NOGUEIRA *et al*, 2005)

1.2 - CANCER DE CÓLON

1.2.1 – Câncer de cólon: epidemiologia

Ferlay *et al* , em seu estudo de morbidade e mortalidade por câncer afirmou que haviam 10,1 milhões de novos casos de câncer no mundo em 2000, com 6,2 milhões de mortes e 22,4 milhões de pessoas vivendo com câncer. Isso representa um aumento de 19% na incidência e 18% da mortalidade em relação ao ano de 1990.

No mundo, os tumores malignos que acometem o cólon e o reto, somam a cada ano cerca de 945 mil novos casos, sendo o segundo mais prevalente no mundo, com uma estimativa de 2,4 milhões de pessoas vivas com diagnóstico nos últimos cinco

anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004), o câncer de intestino grosso representa 15% do total das neoplasias malignas e acomete um em cada vinte habitantes nos países ocidentais (CHOEN, FRIENDMAN, 1992).

1.2.2 - O câncer de cólon no Brasil

No Brasil, dados da Fundação Nacional de Saúde (1996), das regiões sul e sudeste, demonstram que o câncer de cólon está entre as principais causas de morbimortalidade por doenças neoplásicas.

No estado de São Paulo, é a quarta forma mais comum de câncer. É grave o problema de saúde em todo o mundo e sua incidência vem aumentando ano a ano, sendo considerado, ao menos em parte, que este aumento resulte da moderna cultura ocidental. (WANDERPOOL, 1986).

A sobrevida média cumulativa em cinco anos é cerca de 40 a 50% e não é grande a diferença entre os países desenvolvidos e os em desenvolvimento: 49% (variando entre 30 e 61%) e 44% (variando entre 33 e 45%), respectivamente. A média mundial estimada é de 44% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

1.3 - Os estágios da carcinogênese

A carcinogênese é um processo complexo, provavelmente envolvendo uma plethora de eventos epigenéticos ocorrendo nos níveis morfológico, celular e molecular, podendo ser dividida em três estágios principais: iniciação, promoção e progressão (BIRD, 1995; FODDE, 2002).

A carcinogênese é um processo de múltiplas fases. A transformação neoplásica implica no envolvimento da célula através de estágios seqüenciais, e diferentes agentes podem afetar a transição entre os estágios (VANIO, MCGREGOR, 1992).

No desenvolvimento do câncer, os estágios de iniciação e progressão envolvem alterações genéticas as quais são operacionalmente reversíveis e moduladas por uma grande variedade de fatores ambientais (HIKITA *et al*, 1999).

No estágio de iniciação, ocorrem mudanças no genótipo da célula normal, uma vez que o carcinógeno interage com o ácido nucléico levando a mutação em oncogenes e anti-oncogenes. Somente mutações de genes críticos podem levar a formação de tumores, os mais relevantes estão na ativação de oncogenes e na inativação dos genes supressores de tumor (JAKOBISIAK *et al* , 2003; ANIVIMOV, 2007).

No estágio de promoção, a célula adquire um novo fenótipo por causa do micro ambiente que envolve o tumor. A carcinogênese não envolve somente a célula alvo, mas também todo o ambiente, criando condições para a promoção da célula iniciada (fatores de crescimento, citocinas, desequilíbrio metabólico e imunodepressão) levando a formação de células pré-neoplásicas. (ANIVIMOV, 2007).

Por fim, no estágio de progressão, ocorre a transformação de células pré-neoplásicas nos tumores podendo levar a invasão do tecido, migração e formação de metástase (JAKOBISIAK *et al* , 2003).

Estes estágios da carcinogênese podem ser facilmente reproduzidos em múltiplos modelos experimentais os quais abrangem os modelos de indução química, predisposição genética e os de implantação e transplantação em cavidades corporais, sendo o de indução química o mais utilizados devido a sua praticidade e especificidade (HOFFMAN-GOETZ, 2003).

1.4 - Câncer e inflamação

O envolvimento da ativação maciça dos neutrófilos em conjunto com a ativação de espécies reativas do oxigênio, na fisiopatologia dos processos inflamatórios, tem atraído o interesse na descoberta de novos compostos que possam ser capazes de modular estes processos (KANASHIRO *et al*, 2004).

Por mais de 100 anos as drogas anti-inflamatórias não esteroides são usadas com sucesso para amenizar as condições de dor e processos inflamatórios (GROVER *et al*, 2003). A inibição da COX-2, pode reduzir a infiltração de macrófagos, podendo até causar redução do crescimento tumoral (NAKAO *et al*, 2005.; DOMINIQUE *et al*, 2004).

A ciclooxigenase-2 (COX-2) é uma proteína expressa em resposta à presença de mediadores locais liberados em consequência de vários estímulos que fazem parte de uma resposta inflamatória (DuBOIS *et al.*, 1996). Além disso, a COX-2 também está associada a fatores angiogênicos e a formação de novos vasos no processo de carcinogênese (WU *et al.*; 2004).

1.5 – Indução do câncer de cólon

1.5.1 - Carcinogênese química

Os carcinógenos químicos são classificados conforme sua ação: direta (por exemplo, a N-metil-N-nitrosouréia ou NMU) ou indireta (por exemplo, o 1,2-dimetilhidrazina ou DMH). Os carcinógenos químicos estimulam a proliferação celular e

induzem a formação de tumores numa variedade de órgãos e tecidos, dependendo da via de administração, tempo, dose, duração e frequência da administração, e do sexo do animal (BALISH *et al*, 1977).

O câncer de cólon pode ser induzido em modelos experimentais, utilizando cancerígenos químicos como a dimetilhidrazina (DMH), que possui um alto grau de especificidade para o cólon de variadas espécies de roedores (DESCHNER, 1974; REDDY *et al.*, 1975; LAMONT, O'GORMAN, 1978; ROGERS, NAUSS, 1985; OLIVEIRA *et al*, 2001). Estes modelos são de grande importância nos estudos que englobam os diversos aspectos da morfologia e patogenia da doença, contribuindo para o aperfeiçoamento do seu diagnóstico, prevenção e tratamento.

Em modelos experimentais da carcinogênese do cólon, verificou-se que a DMH acarreta aumento na proliferação celular do cólon, com elevação do número total de células por cripta, aumento do número de células marcadas por timidina, elevação do índice mitótico (razão entre o número de células marcadas e o número total de células) nas criptas (OLIVEIRA *et al*, 2001)

1.6 - Marcadores biológicos (biomarcadores) da carcinogênese colônica

Estudos evidenciaram, que ratos tratados com cancerígenos químicos como o DMH, apresentaram focos de criptas aberrantes (FCAs). Estas alterações relacionadas ao processo de transformação neoplásica, podendo ser utilizadas como biomarcadores indicadores de provável progressão para câncer, estas lesões pré neoplásicas se caracterizam morfológicamente por apresentarem criptas com aberturas terminais alteradas, espessamento epitelial com células proeminentes e tamanho maior que as

criptas adjacentes (SIU *et al*, 1997 ; PARK *et al*, 1997).

Os FCAs, encontrados no cólon de ratos tratados com o carcinógeno químico dimetilhidrazina, são largamente usados para detectar possíveis fatores que possam influenciar a carcinogênese de cólon nos seus estágios iniciais, pois estas podem ser quantificadas, caracterizadas e utilizadas como biomarcadores do câncer de cólon (MACLELLAN *et al*, 1991.; THORUP *et al*, 1994)

Embora ainda permaneçam desconhecidos muitos dos eventos que acontecem entre o aumento da população celular das criptas e o aparecimento do câncer, já é bem estabelecido em humanos, que a proliferação celular da mucosa colônica está aumentada em indivíduos com alto risco para câncer, e, freqüentemente, se manifesta através da projeção do compartimento proliferativo das criptas em direção à luz do tubo gastrointestinal (OLIVEIRA *et al*, 2001). O antígeno de proliferação celular nuclear (PCNA), é utilizado para se quantificar a proliferação celular e é considerado um marcador intermediário para o risco de neoplasia coloretal (MURRAY *et al*, 1995).

JUSTIFICATIVA

2 – JUSTIFICATIVA

A resposta inflamatória é tipicamente acompanhada pela geração de radicais livres e pelo estímulo de diversos mediadores responsáveis pelo aumento da expressão dos FCAs, COX-2 e do iPCNA, os quais podem ser considerados bons marcadores da oncogênese do cólon (GARCIA *et al*, 2007; OLIVEIRA *et al*, 2001; BIRD,1995; MURRAY *et al*, 1995) Considerando o aumento da incidência do câncer de cólon no mundo e as propriedades anti-inflamatórias da LE, este trabalho visou verificar os possíveis efeitos do extrato da planta LE na carcinogênese colônica em ratos Wistar

OBJETIVO

3 – OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o bloqueio do desenvolvimento do câncer de cólon, proveniente dos compostos naturais do extrato da *L.ericoides* nos estágios de iniciação e promoção da carcinogênese colônica, utilizando os parâmetros de histologia do cólon através da análise e quantificação dos focos de criptas aberrantes da ciclooxigenase-2 e da proliferação celular da mucosa do epitélio retal, decorrentes da ação do 1,2-dimetilhidrazina.

MATERIAL E MÉTODOS

4 - MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cinquenta ratos Wistar, machos, de aproximadamente 170g. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia, em condições de temperatura ambiente constante $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e em ciclo noite-dia 12:12-h. A umidade relativa do ar era de 60-70%. Os animais foram alimentados com dieta padrão Purina® para ratos e água de torneira *ad libitum*. Durante o período de adaptação (uma semana) foram acomodados em número de cinco por gaiola e, após o início do experimento, em gaiolas individuais com dimensão de 26x14x12 centímetros. Os animais foram mantidos segundo as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP.

4.1- Delineamento experimental

Após o período de adaptação de uma semana, os animais foram aleatoriamente divididos em cinco grupos, G1, G2, G3, G4 e G5 colocados em gaiolas individuais, sendo dez animais por grupo. Os grupos G1, G2, G3 e G4 receberam o carcinógeno químico DMH, o grupo G5 não recebeu o DMH nem o extrato. Os animais pertencentes aos grupos de ingestão do extrato (G2, G3 e G4) receberam 10 ml por dia do extrato as 08:00 da manhã em seus respectivos recipientes de água individual, onde a água era repostada assim que o animal terminava de beber todo extrato. A inspeção para averiguar a ingestão do extrato foi de uma em uma hora para a imediata reposição da água. O grupo (G1) recebeu apenas DMH; o grupo (G2) recebeu extrato aquoso de LE por seis semanas e DMH; o grupo (G3) recebeu o extrato no início da terceira semana de isolamento (ao término do protocolo de duas semanas da aplicação do DMH) pelas quatro semanas

seguintes e DMH; o grupo (G4) recebeu o extrato de LE apenas nas duas primeiras semanas da administração da DMH, e o grupo (G5), não recebeu o extrato nem o DMH. O esquema abaixo (Figura 2) ilustra o delineamento experimental.

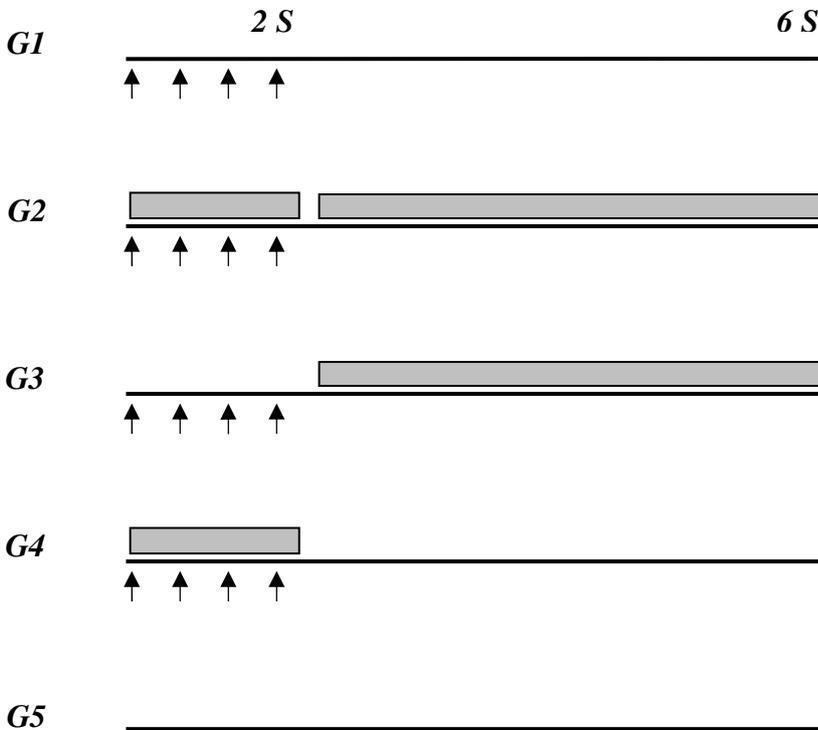


Figura 2: Esquema do delineamento experimental, onde: (S) Semanas; (↑) DMH administrada 2 vezes por semana durante 2 semanas; (caixa cinza) Extrato de LE, administrado 10 ml/dia, via oral.

4.2 – Preparo dos extratos hidroalcoólicos de *L. ericoides*

As plantas foram coletadas em Ibiraci, Minas Gerais, Brasil, pelo Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, docente do Departamento de Física e Química da Universidade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, onde 1800 gr de folhas secas foram submersas em CH_2CL_2 , por um minuto, para a remoção dos constituintes da superfície das folhas, em seguida levadas à estufa para secagem por 24h. Após este período foram maceradas e colocadas em solução de etanol 20 GL (EET 20) por 24 horas. O extrato foi

filtrado por filtração simples e desalcoolizado por rotaevaporador, utilizando a temperatura máxima de 70 °C.

4.3 - Preparo do carcinógeno

Foi utilizada a 1,2-dimetilhidrazina (DMH), em uma concentração de 40 mg/kg dissolvida em água destilada e estabilizada em pH de 6,5 aplicado no subcutâneo, duas vezes por semana durante duas semanas (RODRIGUES *et al*, 2002). A solução de DMH foi preparada imediatamente antes de cada aplicação.

4.4 - Cuidados na aplicação da DMH

O preparo da solução, bem como a sua administração, foi realizado com equipamentos de proteção individual (aventais, luvas, óculos de proteção e máscaras contra gases). Após a manipulação da DMH os materiais de laboratório foram imersos em solução aquosa neutralizante de permanganato de potássio. O material destinado ao lixo e o restante do carcinógeno não aplicado foram acondicionados em sacos plásticos e encaminhados para incineração.

4.5 - Coleta e processamento do material

Os animais foram sacrificados na 6^o semana após a administração da primeira dose de DMH, utilizando a câmara de CO₂. A seguir, os ratos foram submetidos a toracolaparotomia mediana para inventário da cavidade torácica e ressecção do cólon para estudo. Os restos mortais foram congelados à -8°C no Biotério do Departamento de Patologia, e encaminhados para o Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão

Preto (FMRP-USP) onde foram incinerados.

O cólon foi retirado, aberto longitudinalmente pela borda mesentérica e lavado com solução salina tamponada a 9%, medido com régua graduada em milímetros e submetido ao exame macroscópico, anotando-se a incidência, distribuição, tamanho e característica das possíveis lesões. Foram estendidos entre placas de papelão com a mucosa voltada para cima protegida com papel de seda e submersos em formalina tamponada a 10% por um período de 24 horas.

Os fragmentos foram retirados da formalina, recortados e processados. As peças foram desidratadas por submersão em banho de álcool com concentrações crescentes. Posteriormente, para a diafanização das peças, as mesmas foram submersas em banho de xilol por 2 horas e 30 minutos.

Em seguida, as amostras foram incluídas em parafina fluida. Parte do cólon foi incluído horizontalmente com a mucosa voltada para baixo e parte verticalmente para obtenção de cortes longitudinais e transversais respectivamente. Os blocos foram cortados em micrótomo para obtenção de cortes com 5 µm de espessura e montados em lâmina.

A coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris por 3 minutos e a contra-coloração com a solução de Eosina Floxina alcoólica por 10 segundos. Para posterior desidratação, a lâmina foi submersa em concentrações crescentes de álcool e em seguida diafanizadas em xilol que é o meio miscível do entelan (Merck & Co. Inc, SA) utilizado para montagem das lâminas.

4.6 – Focos de criptas aberrantes (FCAs)

Foi feito um rastreamento da mucosa de todo o cólon, através de exame com lupa adequada. Os FCAs foram identificados, quantificados e foi calculada a frequência (por

unidade de área em cm²) e a distribuição ao longo do cólon (BIRD, 1995).

4.7 – Imunohistoquímica

A avaliação da proliferação celular foi feita através de imuno-marcação do antígeno PCNA (do inglês Proliferating cell nuclear antigen) que identifica células em proliferação. Este estudo foi realizado em tecidos colônicos fixados em formalina e inclusos em parafina. Os cortes foram recuperados antígenicamente através de incubação em panela a vapor em meio tamponado por 40 minutos. Após resfriamento do material, as peroxidases teciduais endógenas foram removidas pela adição de peróxido de hidrogênio e ligações inespecíficas do anticorpo primário foram evitadas por adição de soro de cavalo. As lâminas foram então incubadas com anticorpo primário anti-PCNA, marca Novocastra, clone PC10, diluição de 1:200 por 12 horas em câmara úmida com temperatura ambiente e incubadas com anticorpo primário COX-2, marca Novocastra, clone 4H12, diluição de 1:300, com localização no citoplasma celular. Em seguida, houve a incubação com anticorpo secundário e por último, a etapa com avidina-biotina para a formação do imunocomplexo. A reação foi identificada após a revelação por tratamento com DAB (Sigma-aldrich Inc., USA) por 5 minutos e contra coloração com Hematoxilina de Harris seguida de montagem das lâminas. Em seguida, foi realizada a quantificação das células positivamente e negativamente marcadas, para estabelecimento da proporção entre elas, obtendo o índice das células positivas para o COX-2 e PCNA (IC), o qual é um parâmetro objetivo da proliferação celular (SINGH *et al.*, 1997).

5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando o software Graph Pad Prism 4.0 (San Diego, Califórnia). Para verificar as comparações das variáveis obtidas entre os grupos foi utilizada a Análise de Variância de Uma Via (ANOVA). Nas demais comparações foi utilizado o pós-teste de Tukey's Multiple Comparison. A probabilidade de $p < 0.05$ foi considerada estatisticamente significativa.

RESULTADOS

6 - RESULTADOS

6.1 - A proliferação celular

Foram contadas 20 criptas por animal (o número total de células contadas por animal foi superior a 1000). Em cada cripta, estimou-se o número total de células e o número de células marcadas fortemente pelo PCNA. Foram consideradas apenas as células fortemente marcadas, sendo esta contagem realizada por apenas um observador a fim de se evitar falso positivo (BUTTOW *et al*, 2003, KOHNO *et al*, 2002, LAVEZZI *et al*, 2000, SUZUKI *et al*, 2004) (Figura 3).

Após a contagem, a média do número de células marcadas do total de células por cripta para cada animal foi calculada, tabela 1 (em anexo).

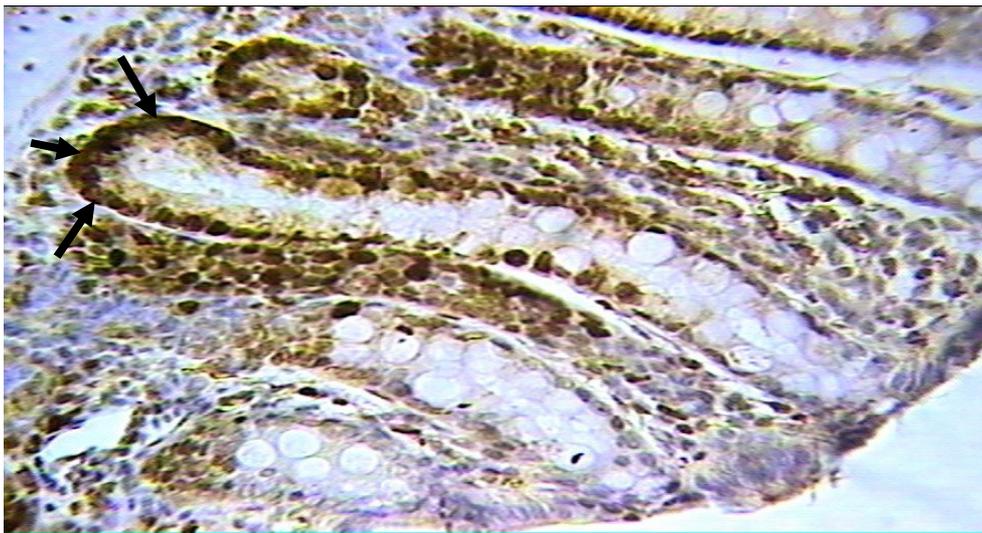


Figura 3 – Cripta com células marcadas para a presença de PCNA no cólon de ratos do grupo G1. Os núcleos enegrecidos nos dois terços inferiores da cripta (setas), correspondem as células com marcação positiva para PCNA. 400X

O índice médio das células positivamente marcadas pelo PCNA (iPCNA) em cada grupo foi calculado pelo número médio de células marcadas para o PCNA nas cripta em cada animal, dividido pela média do número total de células nas criptas de cada animal do grupo (BUTTOW *et al*, 2003; KOHNO *et al*, 2002, GARCIA *et al*, 2005).

A comparação estatística entre os resultados do iPCNA dos quatro grupos

estudados na tabela 2 (anexo) está apresentada no gráfico abaixo (Figura 4).

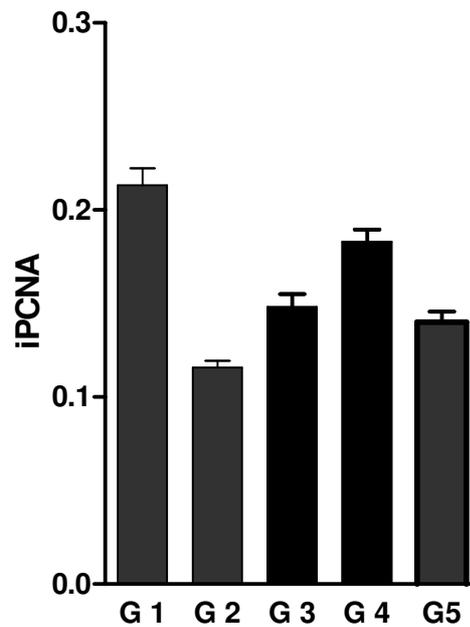


Figura 4 – Gráfico de comparação estatística entre os resultados dos cinco grupos estudados em relação ao iPCNA médio por grupo $G1 > G4 > G3 = G5 > G2$; $p < 0,001$; onde G1 recebeu apenas DMH, G2 DMH + extrato de LE por 6 semanas, G3 DMH + extrato de LE por 4 semanas após as 2 semanas de aplicação da DMH, G4 DMH + extrato de LE durante as 2 semanas de aplicação da DMH e G5 não recebeu DMH nem extrato de LE.

Constatou-se que houve diferença estatisticamente significativa em relação à proliferação celular entre todos os grupos (Figura 4).

Observou-se um decréscimo do número de células marcadas positivamente pelo PCNA, diretamente proporcional ao tempo de ingestão do extrato, com uma redução de 46% da proliferação celular no grupo (G2) que recebeu o extrato por seis semanas ($P < 0,001$) em relação ao grupo controle (G1).

Quando comparado o grupo controle (G1) com o grupo (G3), que recebeu o extrato após o término das duas semanas de aplicação da DMH por quatro semanas consecutivas, representando o estágio da promoção da carcinogênese colônica, foi constatada uma redução de 30,51% no iPCNA ($P < 0,001$) (Figura 4).

Houve diferença estatisticamente significativa em relação ao iPCNA entre o grupo (G1) o grupo (G4) que recebeu o extrato apenas nas duas primeiras semanas de aplicação da DMH, representando o estágio de iniciação, com redução de 14,08% ($P < 0,05$) (Figura 4).

Ocorreu uma redução do iPCNA estatisticamente significativa em G2 quando comparado isoladamente com G3 e G4. Em relação ao G3, a redução foi de 22,29% ($P < 0,01$) e ao G4 de 37,15% ($P < 0,001$). Na análise entre os grupos G3 e G4 houve redução do iPCNA em 19,12% no grupo G3 ($P < 0,01$) (Figura 4)

O grupo G5, que não recebeu DMH e extrato, apresentou menor proliferação celular que os grupos G1 e G4 ($P < 0,001$), mas quando comparado com G3 e G2 não apresentou diferença estatística ($P > 0,05$), apesar de ser observada uma redução da proliferação celular quando comparado a G2.

6.2 - Contagem dos FCAs

A presença de FCAs no cólon foi constatada em todos os animais que receberam a DMH, confirmando a efetividade do carcinógeno DMH (Figura 5), só não sendo observado no grupo G5 que não recebeu o DMH.

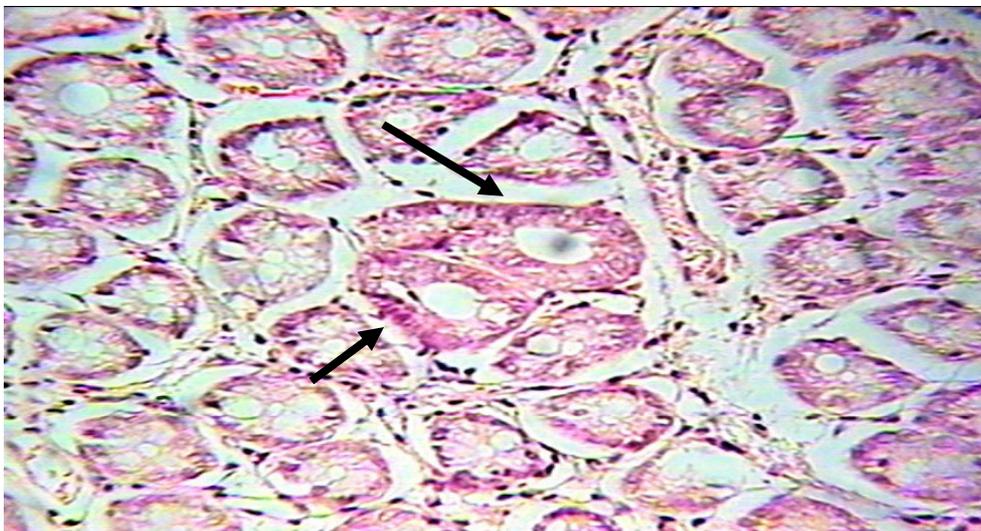


Figura 5 – Focos de Criptas Aberrantes (setas) em cólon de rato submetido à aplicação de DMH. 400X

Após a observação de trinta campos microscópicos por animal, calculou-se a média do número de focos de criptas aberrantes por cm^2 (FCAs/ cm^2) por animal representados na tabela 3 (anexo), e a média do número de FCAs/ cm^2 e respectivos desvios-padrões por grupo (GARCIA *et al*, 2005). Os resultados estão expressos na tabela 4 (em anexo).

Houve uma diminuição estatisticamente significativa dos FCAs em todos os grupos que receberam o extrato (G2, G3, G4), com um decréscimo do número de FCAs diretamente proporcional ao tempo de ingestão do extrato e uma redução de 54,76% dos FCAs do G2 ($P < 0,001$) em relação a G1 (Figura 6).

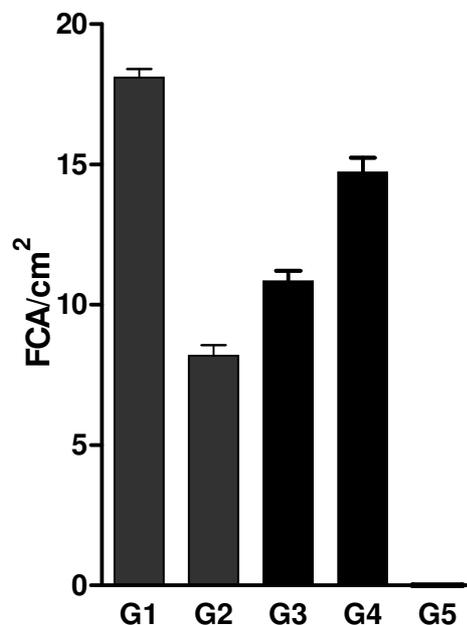


Figura 6 - Comparação entre os resultados dos cinco grupos estudados, em relação ao número médio de FCAs/cm² por grupo ($G1 > G4 > G3 > G2$; $p = 0,001$), onde G1 recebeu apenas DMH, G2 DMH + extrato de LE por 6 semanas, G3 DMH + extrato de LE por 4 semanas após as 2 semanas de administração de DMH e G4 DMH + extrato de LE durante as 2 semanas de administração de DMH e G5 não recebeu DMH ou LE e não apresentou aparecimento de FCAs.

Quando comparado o G1 com os grupos G3 e G4 verificou-se uma redução de 40,12% no número de FCAs ($P < 0,001$) no grupo G3 e uma redução de 18,68% do número de FCAs ($P < 0,001$) no grupo G4 (Figura 6).

Houve uma redução estatisticamente significativa nos FCAs em G2 quando comparado isoladamente com G3 e G4, em relação a G3 de 24,45% ($P < 0,001$) e a G4 de 44,3% ($P < 0,001$). Assim como foi observado entre os grupos G3 e G4, uma redução dos FCAs de 26,53% no grupo G3 ($P < 0,001$) (Figura 6). No grupo G5 não foram encontrados FCAs.

6.3– Expressão da COX-2

Em cada cripta, estimou-se o número total de células e o número de células marcadas fortemente pelo COX-2 sendo considerado positivo quando detectada a coloração no citoplasma das células (figura 7). O índice de marcação foi determinado pela relação entre o número total de células e o número de células fortemente coradas. Os resultados do COX-2, estão apresentados na tabela 5 (em anexo).

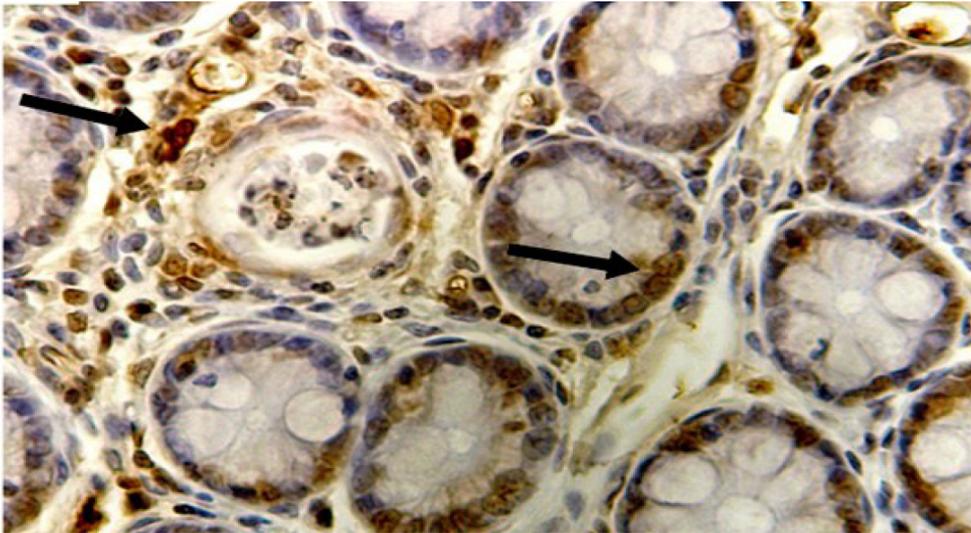


Figura 7- Células com marcação positiva (setas) para expressão de COX-2, na mucosa do cólon de ratos (Grupo G1). 400X.

Constatamos que houve uma diminuição estatisticamente significativa das células marcadas positivamente pelo COX-2 em todos os grupos que receberam o extrato (G2, G3, G4), com um decréscimo do número das células marcadas positivamente pelo COX-2 diretamente proporcional ao tempo de ingestão do extrato. Ocorreu uma redução das células com marcação positiva para o COX-2 nos grupos G2, G3, G4 e G5 em relação ao grupo G1 ($P < 0,001$) (Figura 8).

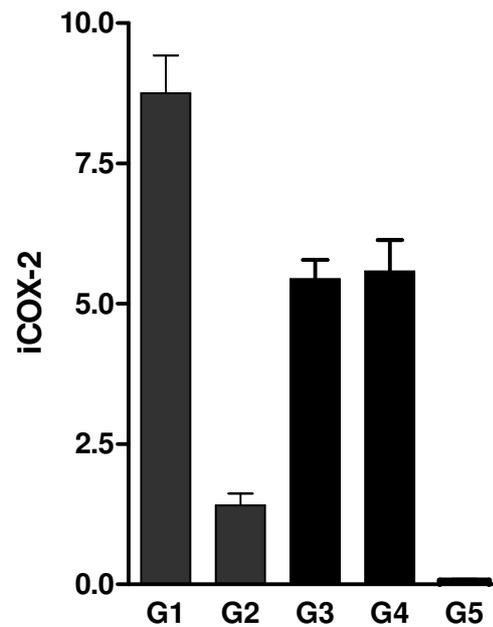


Figura 8 – Gráfico de comparação estatística entre os resultados do índice de células positivas para COX-2 nos cinco grupos estudados. $G1 > G3 = G4 > G2 > G5$; $p < 0,001$. O grupo G1 recebeu apenas DMH, G2 DMH + extrato de LE por 6 semanas, G3 DMH + extrato de LE por 4 semanas após as 2 semanas de aplicação da DMH, G4 DMH + extrato de LE durante as 2 semanas de aplicação da DMH e G5 não recebeu DMH nem extrato de LE.

Houve uma redução estatisticamente significativa das células com marcação positiva para o COX-2 em G2 quando comparado isoladamente com G3 e G4 ($P < 0,001$), mas comparado a G5 o grupo G2 não apresentou resultados significativos ($P > 0,05$), assim como o observado na análise estatística entre os grupos G3 e G4 ($P > 0,05$).

DISCUSSÃO

7 - DISCUSSÃO

No presente estudo, foi demonstrado que a administração por via oral do extrato da LE, uma planta exclusiva do Brasil (DOS SANTOS *et al*, 2004), está associada a redução do iPCNA, iCOX-2 e dos FCAs em ratos Wistar tratados com DMH quando comparados aos animais que não receberam o extrato. A literatura demonstra que a carcinogênese colônica induzida pelo DMH em roedores é morfológicamente similar aos tumores de cólon em humanos, inclusive englobando todos os estágios de seu desenvolvimento (POZHARISSKI, 1979; POZHARISSKI *et al*, 1990).

Para elucidar os efeitos do extrato de LE, buscou-se compreender em qual das fases da carcinogênese colônica o extrato apresenta ação mais eficiente, pois os estágios da carcinogênese já são conhecidos há mais de cinquenta anos, e foram descritos primeiramente em modelos experimentais que utilizaram roedores, sendo designados como iniciação, promoção e progressão (YUSPA, SHEILDS, 1997; SLAGA, 1980).

Foi averiguado o efeito do extrato nas fases de iniciação, e promoção . A fase de progressão não foi avaliada, pois durante a progressão do tumor, células pré-neoplásicas se desenvolvem dentro do tumor, através de um processo de expansão clonal, o qual é facilitado pela progressiva instabilidade genômica e expressão alterada dos genes (PITOT, 1989), e os animais deste experimento sofreram eutanásia prévia a estes eventos, devido a pouca disponibilidade de extrato e dificuldade de se obter a matéria prima na natureza. Além do mais, levaria um tempo muito superior a seis semanas de ingestão de extrato para se atingir a fase de progressão, com a necessidade de produção de extrato em larga escala, gerando grande devastação da planta LE.

A fase de iniciação ocorre quando o DNA de uma célula ou de uma população de células sofrem um dano devido à exposição a um carcinógeno endógeno ou exógeno. Caso este dano não seja reparado, pode levar a mutações genéticas (SLAGA,1984). O

G4 recebeu o extrato apenas durante as duas semanas de administração da DMH, o que equivale à ação do extrato durante a fase de iniciação.

O G3 recebeu o extrato após as duas semanas de administração do carcinógeno, até o dia da eutanásia, durante 4 semanas a fim de se averiguar seus efeitos na fase de promoção. O estágio de promoção é caracterizado pela expansão clonal seletiva das células iniciadas, o que resulta na expressão alterada dos genes e seus produtos, os quais estão associados a hiperproliferação, remodelamento tecidual e inflamação (SLAGA *et al* 1980; SUGIMURA 1992).

O G2 recebeu o extrato durante as 6 semanas do experimento, abrangendo as fases de iniciação e promoção, sendo observado neste grupo os melhores resultados.

O G1 recebeu apenas a DMH. A administração da DMH em ratos resulta na metilação do DNA nas células epiteliais colônicas, com a substituição do grupo metil pelo grupo etil nestas células (PORIES, 1993) e este é considerado o estágio de iniciação, que é facilmente reprodutível em modelos experimentais podendo abranger além da fase de iniciação, as fases de promoção e progressão possibilitando a visualização macroscópica dos neoplasmas dependendo da dose, tempo e modo de administração. Assim, este modelo é amplamente utilizado para se investigar a relação entre os FCAs e o câncer de cólon (SUNTER *et al*, 1978; SEQUEIRA *et al*, 2000; BIRD, 1987; McLELLAN, BIRD, 1988).

Mediadores inflamatórios como as citocinas e fatores de crescimento podem desencadear o crescimento tumoral pelo estímulo da proliferação celular, adesão, vascularização e potencial metastático nos estágios tardios do desenvolvimento tumoral (DOBROVOLSKAIA *et al*, 2005). A ciclooxigenase-2 (COX-2) é um marcador que serve para quantificar a resposta inflamatória. A Cox-2, comparada à mucosa normal, está super expressa em 40% dos adenomas humanos e em 80% dos adenocarcinomas (EBERHART *et al*, 1994; KARGNMAN *et al*, 1995; SANO *et al*, 1995; KUTCHERA *et al*,

1996).

A resposta inflamatória é tipicamente acompanhada pela geração de radicais livres e pelo estímulo de diversos mediadores inflamatórios como as citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e angiogênicos. Os radicais livres podem causar danos diretos ao DNA ou afetar os mecanismos de reparo do DNA, aumentando a instabilidade genética, podendo desta forma contribuir para o primeiro estágio da transformação neoplásica, conhecido como “iniciação”. A ciclooxigenase2 (COX-2), e a indução da síntese de óxido nítrico (iNOS) são os principais responsáveis pela produção de uma grande quantidade destes mediadores (CLARK *et al*, 2003; HINZ, BRUNE, 2002). O aumento do número de ROS pode potencialmente causar danos aos lipídeos, proteínas e DNA. As ROS podem também levar à mutagênese celular e induzir a proliferação de células tumorais (DREHER, JUNOD; 1996).

Foi observado uma redução estatisticamente significativa na expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) em todos os grupos que receberam o extrato sendo seu melhor efeito no grupo G2 o qual recebeu o extrato por seis semanas, abrangendo as fase de iniciação e promoção, a expressão da COX-2 foi aumentando significativamente, à medida que reduzia-se o tempo de ingestão do extrato. A ativação de inibidores seletivos da COX-2 pode ser a chave da patogênese do câncer de cólon (STEINBACH *et al*, 2000).

O experimento demonstrou que os benefícios do extrato são diretamente proporcionais ao tempo de ingestão, com seu melhor efeito quando ingerido nas fases de iniciação e promoção simultaneamente (G2), seguido pela fase de promoção (G3) e menor efeito na iniciação (G4), apesar de ter apresentado efeitos significativamente estatísticos em todas as fases quando comparados entre si, sendo comprovado pela diminuição na expressão dos marcadores celulares para os FCAs, iCOX-2 e iPCNA.

Os marcadores celulares são de grande confiabilidade, pois abrangem múltiplas

fases, envolvendo uma série de alterações patológicas, incluindo discretas lesões microscópicas da mucosa, as quais estão correlacionadas aos FCAs e a malignidade dos tumores (BIRD, 1995; TAKAYAMA *et al*, 1998). Os FCAs representam alterações morfológicas focais induzidas pela DMH na mucosa colônica (FENOGLIO-PREISER, NOFFSINGER, 1999).

Na carcinogênese química, a proliferação celular freqüentemente aparece imediatamente após a indução da carcinogênese no órgão alvo. Isto sugere que a fase S do ciclo celular é a mais sensível na iniciação (WATTENBERG, 1985).

Os ácidos cafeoquímicos presentes no extrato da LE promovem *in vitro* a formação de prostaglandinas E2 (PGE2) por leucócitos polimorfonucleares (KIMURA, OKUDA, 1987). A prostaglandina 2 (PGE2) está elevada no câncer de cólon, evidenciando uma relação direta entre a super expressão destas enzimas e a carcinogênese colorretal (PUGH, THOMAS, 1994; OKA *et al*, 1994). Há evidências que sugerem o envolvimento das prostaglandinas (Pgs) e do óxido nítrico (NO) em vários processos fisiopatológicos incluindo a inflamação e a carcinogênese (CLARK *et al*, 2003; HINZ, BRUNE, 2002). Diversos trabalhos evidenciam a relação entre o aumento do crescimento do tumor, a inflamação e a geração de ROS.

Mediadores inflamatórios como as citocinas e fatores de crescimento podem desencadear o crescimento tumoral pelo estímulo da proliferação celular, adesão, vascularização e potencial metastático nos estágios tardios do desenvolvimento tumoral (DOBROVOLSKAIA, KOZLOV, 2005).

A resposta inflamatória é tipicamente acompanhada pela geração de radicais livres e pelo estímulo de diversos mediadores inflamatórios como as citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e angiogênicos. Os radicais livres podem causar danos diretos ao DNA ou afetar os mecanismos de reparo do DNA, aumentando a instabilidade genética e podendo, desta forma, contribuir para o primeiro estágio da transformação neoplásica,

conhecido como “iniciação”. (CLARK, 2003; HINZ, BRUNE, 2002). O aumento do número de ROS pode potencialmente causar danos aos lipídeos, proteínas e DNA. As ROS podem também levar à mutagênese celular e induzir a proliferação de células tumorais (DREHER, JUNOD; 1996).

Neste trabalho, mesmo com a presença dos ácidos cafeoquímicos no extrato da LE, verificou-se que ele não foi suficiente para potencializar a ação da DMH, provavelmente por serem desconhecidos seus efeitos *in vivo*, ou por seus efeitos serem inferiores aos benefícios dos outros compostos do extrato. Para o esclarecimento desta dúvida serão necessárias mais pesquisas.

Talvez a chave para explicação dos efeitos positivos do extrato de LE, utilizado neste trabalho, esteja envolvida nos mecanismos de ação dos flavonóides, possíveis responsáveis pela redução da expressão dos marcadores analisados. Os flavonóides possuem vários efeitos benéficos na inflamação, nos ROS e na carcinogênese (KANASHIRO *et al*, 2004).

Os resultados sugerem que os efeitos quimiopreventivos da LE podem estar associados a inibição da promoção do tumor, com maior efetividade que na fase de iniciação tumoral. Entretanto, mais estudos são necessários para se verificar os mecanismos envolvidos nestes efeitos quimiopreventivos da LE na carcinogênese colônica.

Ainda resta elucidar quais destes compostos tiveram ação no decréscimo dos FCAs, iCOX-2 e do iPCNA devido a grande variedade de compostos presentes no extrato. Talvez a resposta contra o desenvolvimento do câncer possa estar em um dos compostos encontrados no extrato da LE ou na combinação de todos. O possível mecanismo de ação da LE necessita de mais investigações.

CONCLUSÃO

8 – CONCLUSÃO

O extrato da *Lychnophora ericoides* foi efetivo na redução do iPCNA, iCOX-2 e no número de FCAs, nas fases de iniciação e promoção da carcinogênese colônica, sendo seus efeitos diretamente proporcionais ao tempo de ingestão do extrato da LE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR JFN, ANTICH IA, MARTÍNEZ AP, DE LA ROSA I, TORTAJADA C, GAMUNDÍ AG AND TUGORES JJP. Cyclooxygenase-2 inhibition in colon experimental carcinogenesis. **REV ESP ENFERM DIG** (Madrid) Vol. 97. N.º 9, pp. 637-647, 2005

AMERICAN CÂNCER SOCIETY: **Câncer Facts and Figures**. Atlanta, G. A., 1995.

WU, AW.; GU, J.; LI, ZF., JI, JF, XU, GW. COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. **World J Gastroenterol**. 10(16):2323-2326, 2004.

YUSPA SH, SHIELDS PG. Etiology of cancer: chemical factors. In: DeVita VT Jr, Hellman SH, Rosenberg SA, editors. **Cancer: principles and practice of oncology**. 5th ed. Philadelphia (PA): **Lippincott-Raven**; p.185–202.1997

10 – ANEXOS

Tabela 1 - Numero de células marcadas positivamente pelo PCNA por cripta por animal, em relação ao numero total de células por cripta nos animais dos grupos I ao V.

Animal	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
1	12/68	7/74	11/59	10/61	10/71
2	13/70	8/65	11/67	12/73	9/65
3	14/54	8/71	8/71	10/57	11/78
4	16/60	8/71	9/64	12/61	10/70
5	11/57	8/70	9/65	11/60	9/63
6	16/73	8/75	9/67	12/61	9/67
7	16/72	8/70	10/75	13/73	11/75
8	16/74	9/64	11/75	12/73	10/71
9	13/65	8/70	9/70	11/53	9/65
10	13/71	10/91	10/71	14/64	8/58

Tabela 2- Índices médios de células positivamente marcadas pelo PCNA (iPCNA) e os respectivos desvios-padrões (SD) nos grupos de I ao V.

Grupo	iPCNA±SD
I	0,213±0,0283
II	0,115±0,0114
III	0,148±0,0214
IV	0,183±0,0203
V	0,139±0,0094

Tabela 3 –Média do número de FCAs/cm² por animal, contados 30 campos microscópicos, e seus respectivos desvios-padrões..

Animal	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
1	18,1	9,3	11,4	13,3	0
2	18,9	8,0	9,4	13,0	0
3	17,6	9,9	12,6	13,8	0
4	17,5	8,4	11,4	13,6	0
5	17,7	7,8	12,0	14,0	0
6	20,3	9,7	12,1	14,8	0
7	16,9	7,5	9,8	16,9	0
8	17,7	8,1	10,3	18,0	0
9	18,0	7,0	9,5	15,7	0
10	18,3	6,2	9,9	14,1	0
Média±SD	0,936	1,180	1,192	1,648	0

Tabela 4 - Índice médio dos FCAs/cm², por grupo.

Grupo	FCAs/cm²
I	18,1
II	8,19
III	10,84
IV	14,72
V	0

Tabela 5- Índice médio de células positivamente marcadas pelo COX-2

Animal	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
1	7,8	0,9	4,5	5,0	0,06
2	8,9	2,2	3,9	4,6	0,01
3	6,2	1,5	5,9	4,1	0,1
4	6,9	0,6	7,0	5,6	0,12
5	9,2	0,9	5,7	7,2	0,07
6	7,9	1,4	5,1	9,4	0,11
7	7,3	1,8	4,9	3,2	0,08
8	8,5	1,3	7,4	6,4	0,05
9	12,3	2,7	4,8	5,4	0,11
10	12,5	0,8	5,5	4,9	0,06

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)