HEIDGE FUKUMASU

**Sobre os efeitos quimiopreventivos e antitumorais do guaraná,
Paullinia cupana Mart *var. sorbilis*, em modelos experimentais
in vivo e *in vitro***

São Paulo

2008

HEIDGE FUKUMASU

**Sobre os efeitos quimiopreventivos e antitumorais do guaraná,
Paullinia cupana Mart *var. sorbilis*, em modelos experimentais**

in vivo e in vitro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli

São Paulo

2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2008
FMVZ

Fukumasu, Heidge

Sobre os efeitos quimiopreventivos e antitumorais do guaraná, *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, em modelos experimentais in vivo e in vitro / Heidge Fukumasu. – São Paulo : H. Fukumasu, 2008.
300 f., il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli.

1. Guaraná. 2. Câncer. 3. Quimioprevenção do câncer. 4. Receptor CAR. 5. Conexina43. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da ação quimiopreventiva do guaraná (*Paullinia cupana* Mart. Var. *Sorbolis*) em camundongos com deficiência na expressão da Cx43 submetidos à carcinogênese pulmonar induzida por carcinógeno do tabaco (4-Methilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona", protocolo nº678/2005, utilizando 440 camundongos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "Evaluation of the chemopreventive activity of the guaraná (*Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbolis*) in connexin 43 deficient mice submitted to lung carcinogenesis induced by (4-Methilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona", protocol number 678/2005, utilizing 440 mice, under the responsibility of Prof. Dr. Maria Lúcia Zaidan Dagli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun", meeting).

São Paulo, 31 de maio de 2005

Profª Drª Júlia Maria Materna
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FUKUMASU, Heidge

Título: Sobre os efeitos quimiopreventivos e antitumorais do guaraná, *Paullinia cupana* Mart *var. sorbilis*, em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a) Dr(a)_____

Instituição_____

Assinatura_____

Julgamento_____

Prof(a) Dr(a)_____

Instituição_____

Assinatura_____

Julgamento_____

Prof(a) Dr(a)_____

Instituição_____

Assinatura_____

Julgamento_____

Prof(a) Dr(a)_____

Instituição_____

Assinatura_____

Julgamento_____

Prof(a) Dr(a)_____

Instituição_____

Assinatura_____

Julgamento_____

*A Andréia, meu amor super lindo, pela paixão,
amor, paciência, ajuda, paciência, carinho,
paciência... Te amo linda!*

*Não apenas esta tese, mas todas as minhas
conquistas que ainda virão eu dedico a minha
mãe, meu pai e meu irmão. Tive tudo que
precisei e quando não sabia o caminho vocês
indicaram, muitas vezes direcionando apenas
pelo carinho, amor e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

A professora Maria Lucia Zaidan Dagli, professora Malú, minha “mãe científica”. A pessoa que me abriu as portas da ciência, estimulando-me sempre a buscar respostas para as minhas incessantes perguntas. E claro, pelo apoio, amizade e liberdade incondicionais, os pilares essenciais para quem inicia na ciência.

Aos professores do Departamento de Patologia (FMVZ-USP) por terem me ajudado sempre que precisei e pela convivência durante estes 7 anos.

A professora Mariza P. de Melo e a técnica Silvana M.P. Pugine pelo auxílio na quantificação da atividade das enzimas antioxidantes.

Ao professor Mauricio Yonamine pela ajuda na quantificação da cafeína presente no guaraná.

A Doutora Mitsue Haraguchi, pela ajuda na confecção dos extratos de guaraná.

Ao meu amigo Zé (José L. Avanzo), que enquanto estive no Laboratório me ensinou tudo o que eu precisava e o que não precisava me tornando capaz de raciocinar e principalmente questionar. Culpa sua Zé!

A Tereza e a Ivone por terem me ensinado muito desde que iniciei no Laboratório.

A todos os funcionários do VPT pela ajuda e carinho, e em especial à Marguite, Cyntia, Livia, Claudia Mori, Herculano, Claudio, Rosires, Idalina, Nelsinho, Silvia, Claudia, Seu Luizinho, Edson e Shirley.

Aos meus amigos da graduação, André Simprão, Johnny B2, Wander, Alex Wilma, Orson Meiguei, Iara, Leda e Luiz Fudêncio. Independente da distância gerada pelos caminhos que escolhemos, sei que a amizade será eterna.

Aos amigos e colegas que fiz durante todo este tempo no VPT, Raimundo, Buga e Livia, Daniel “Dambi”, Fred e Carol, Ricardo Lazza, Alexandre Carioca, Lucas Mamadinha, Prof. Rao, Marcia, Patricia, Katia Pinello, Tarso, Katia Kimura, Carolzona, Carolzinha, Domenica, Bel, Caio, Renato, Paulinha, Viviane Neri, Natalia, Juliana, Heloisa, Marcelo, Bruno, Mirela, e Luise. E a todos os demais que de alguma maneira tenham compartilhado momentos sempre preciosos durante estes anos de VPT, quer tenham ocorrido nos próprios, no Pablitos, ou em qualquer outro lugar.

Aos funcionários da Biblioteca da FMVZ-USP pela ajuda na confecção da tese quanto nas necessidades que surgiam ocasionalmente.

A FAPESP pelo apoio financeiro (processos 02/02736-0; 04/04251-9 e 05/54194-4)

RESUMO

FUKUMASU, H. **Sobre os efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos do guaraná, *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.** [On the chemopreventive and antineoplastic effects of guarana, *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, in *in vivo* and *in vitro* experimental models]. 2008. 300 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O câncer é a segunda maior causa de morte no Brasil, atrás apenas de doenças cardíacas. Por isto, é evidente que grandes recursos sejam direcionados para a pesquisa no descobrimento de novas opções com a finalidade de erradicar esta doença. Dentre estas opções, a quimioprevenção do câncer tem chamado a atenção já que, mesmo com os imensos avanços no conhecimento sobre os mecanismos da carcinogênese e conseqüente desenvolvimento de novas drogas, os dados estatísticos de mortalidade não se tornaram menores. Somando-se a estes fatos, deve ser considerado que no Brasil o tratamento padrão do câncer não chega a todas as pessoas por ser extremamente caro. Desta forma, a quimioprevenção do câncer com fatores presentes na dieta ou oriundos de fontes consideradas baratas como fitoterápicos, deve ser apreciada. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos de uma planta brasileira, o guaraná (*Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*). Foram utilizados alguns experimentos em camundongos como indução genotóxica em fígado pela Dietilnitrosamina (DEN); carcinogênese pulmonar induzida pela 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), uma nitrosamina presente no tabaco; tumor ascítico de Ehrlich; disseminação hematogênica de melanoma B16/f10; e cultivo de células tumorais e não tumorais. Além disso, caracterizou-se o papel da Connexin43 na carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK e os efeitos do guaraná sobre o receptor CAR e sua ação quando da administração do ligante do CAR, 1,4-bis[2-(3,5-dichloropiridiloxi)]benzeno (TCPOBOP). Pudemos observar efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos do guaraná dependendo do modelo utilizado, demonstrando que seu modo de ação principal é a redução da proliferação celular. Além disso, observamos que os tumores de pulmão dos animais tratados com a planta apresentavam menor tamanho, menor grau maligno, menor índice de proliferação celular e menor ativação do fator de transcrição CREB. Observamos também que a Connexina43 (Cx43) tem importante papel na carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK, atuando como

supressor tumoral e em fases tardias possivelmente tendo papel inverso, ou seja, como um oncogene. Caracterizamos os efeitos do guaraná sobre a ativação do receptor CAR e demonstramos que, por si só, o guaraná induz a expressão do CAR, além de alterar a expressão de alguns de seus transcritos como a CYP2B10 e CYP3A11. Ao analisarmos os efeitos de extratos de guaraná sobre células de tumor de pulmão (E9) *in vitro*, verificamos o mesmo efeito antiproliferativo, diminuindo a expressão do PCNA e da Conexina43 de maneira dose-dependente, além de verificar um aumento da expressão do receptor CAR. Ao fim propomos uma hipótese de mecanismo de ação baseando-se nas alterações encontradas oriundas da administração do guaraná. Concluimos que o guaraná apresenta componentes com ação antitumoral em camundongos, tendo efeito quimiopreventivo ou antineoplásico dependendo do modelo utilizado.

Palavras chave: Guaraná. Câncer. Quimioprevenção do câncer. Receptor CAR. Conexina43. Biotransformação de xenobióticos.

ABSTRACT

FUKUMASU, H. **On the chemopreventive and antineoplastic effects of guarana, *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, in *in vivo* and *in vitro* experimental models.** [Sobre os efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos do guaraná, *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*]. 2008. 300 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Cancer is the second biggest cause of deaths in Brazil, only behind of cardiac diseases. As a result, it is evident that great resources for research will be directed towards the discovery of new options to eradicate this disease. Among these options, cancer chemoprevention has calling for attention since the huge advances in the knowledge of carcinogenesis and development of new drugs did not decrease statistical data on mortality due to cancer. In addition, it must be considered that in Brazil, cancer therapy is not available for all given that it is too expensive. Therefore, cancer chemoprevention with dietary factors or from medicinal plants has got to be treasured. Following these lines, the aim of this work was to evaluate the chemopreventive and antineoplastic effects of a Brazilian plant, *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, most known as guarana. It was used several experiments in mice and cell culture essays as: protection against DEN-induced DNA damage; NNK-induced lung carcinogenesis; Ehrlich Ascitic Tumor; metastasis of B16/f10 melanoma cells; and cell culture of a tumorigenic and a non-tumorigenic cell lines. Additionally, it was characterized the role of Connexin43 in the NNK-induced lung carcinogenesis and the effects of guarana on the CAR receptor before and after the administration of TCPOBOP. We note a chemopreventive or antineoplastic effect of guarana depending on the model employed and showed that the mode of action responsible for these effects was reduced cell proliferation. Also, the lung tumors of guarana-treated animals were smaller, less aggressive, with decreased cell proliferation and CREB activation. On the other hand, we observed that Connexin43 have an important role on NNK-induced lung carcinogenesis because it may act as a tumor suppressor and in advanced stages as an oncogene. The effects of guarana on the CAR activation were characterized and we showed that guarana induces CAR mRNA expression, altering the levels of its transcripts as CYP2B10 and CYP3A11. We also examined the effects of guarana extracts on a lung tumor cell culture (E9 cells) and demonstrated the same

antiproliferative effect observed previously, by decreased PCNA and Connexin43 proteins in a dose-dependent manner along with an increase in CAR protein. At last we hypothesized a mechanism of action for guarana effects basing in our findings. We concluded that guarana presents substances that have antitumoral effects in mice, enclosing a chemopreventive or antineoplastic effect depending on the model studied.

Keywords: guarana. Cancer. Cancer Chemoprevention. CAR receptor. Connexin43. Xenobiotic metabolism.

LISTA DE ABREVIATURAS E TERMOS UTILIZADOS

AhR	Receptor aril-hidrocarbono
ALT	Alanina Aminotransferase
AQUEG	Extrato aquoso de guaraná
BHT	Hidroxitolueno-butilado
CAM	Medicina alternativa e complementar
CAR	Receptor Andróstenos/Ativado Constitutivo (<i>Constitutive Androstane/activated Receptor</i>)
CAT	Catalase
CDK	Quinase dependente de ciclina
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar ao RNA
Conéxons	Unidade morfológica das junções do tipo GAP que consiste da oligomerização de 6 conexinas
COOH	Carboxila
CREB	Proteína Elemento-Ligante Responsiva ao AMP-cíclico (<i>Cyclic AMP Response Element-Binding Protein</i>)
Cx43	Conexina43; proteína da junção GAP alfa-1
DEN	Dietilnitrosamina; Nitroso-dietilamina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ETOHG	Extrato etanólico de guaraná
Éxon	Um segmento de bases nitrogenadas de um determinado gene eucarioto que consiste de DNA que codifica para uma sequência de nucleotídeos no RNA mensageiro
GGT	Gama Glutamiltransferase
GJIC	Comunicação por junções comunicantes entre duas células caracterizada pelo acoplamento de conéxons de ambas células adjacentes; junções do tipo GAP; junções GAP
GRED	Glutathione redutase
Hairpin	Pareamento de bases intramoleculares geralmente palindrômicas que ocorre com fitas únicas de DNA ou mesmo RNA
HPRT	Hipoxantina ribosil-transferase

Intron	Seção de DNA que não codifica qualquer parte da proteína produzida pelo gene
MDA	Malonilaldeído
MDM2	Proteína Minuto Duplo de Camundongo -2 (Mouse Double Minute-2 protein)
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
MS1, MS2	Isoformas do gene MDM2
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Forma reduzida de NADP
NET	Nitrosaminas específicas do tabaco
NNK	4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona
NRF2	Receptor relacionado ao Fator Nuclear Eritróide 2-parecido 2 (<i>NF-E2 related factor-2</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>P.cupana</i>	<i>Paullinia cupana</i> Mart var. <i>sorbilis</i> ; guaraná
PAH	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PBREM	Módulo elemento-responsivo ao fenobarbital
PBS	Solução tampão a base de fosfato
PCNA	Antígeno Nuclear de Células em Proliferação
PCR real time	Reação da Polimerase em cadeia em tempo real
PCR	Reação da Polimerase em cadeia
PPAR	Receptor proliferador-ativado de peroxissomo (<i>Peroxisome Proliferator-activated receptor</i>)
Primer	Oligonucleotídeos que reconhecem um determinado gene; iniciadores
PXR	Receptor X-pregnano (<i>Pregnane-X receptor</i>)
qPCR	Reação de PCR em tempo real semi-quantitativa
RNA	Ácido Ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação da Polimerase em cadeia com enzima Transcriptase Reversa, utilizada para converter RNA mensageiro em cDNA
<i>Smear</i>	Termo usado para caracterizar formato característico de degradação de DNA visível após eletroforese em gel de agarose
SOD	Superóxido Dismutase

Splicing alternativo caracteriza o processo pelo qual mais de uma isoforma de uma proteína pode ser codificada a partir do DNA

TAE Tumor Ascítico de Ehrlich

TBS Solução tampão a base de Trizma

TCPOBOP 1,4-bis[2-(3,5-dichloropiridiloxi)]benzeno

Wnt1 (*wingless-type mmtv integration site family, member 1*)

WT Animal selvagem; sem deleção da Cx43 (*Wild type*)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: CÂNCER, CARCINOGENESE E QUIMIOPREVENÇÃO	26
1 Câncer, Carcinogênese e Quimioprevenção.....	27
1.1 INTRODUÇÃO	27
1.2 O QUE É CÂNCER?	28
1.3 QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER	30
 CAPÍTULO 2: GUARANÁ: UM ALIMENTO FUNCIONAL?	32
2 Guaraná (<i>Paullinia Cupana</i>): Um Alimento Funcional?	33
<i>Aceito para publicação na série Advances in Food and Nutrition Research sob o título: "Guarana as a functional food: where do we stand?"</i>	
2.1 INTRODUÇÃO	34
2.2 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DO GUARANÁ.....	34
2.3 EFEITOS PATOFISIOLÓGICOS COMPROVADOS CIENTIFICAMENTE	37
2.4 FUNÇÕES SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL	39
2.5 SUPLEMENTOS PARA PERDA DE PESO: GUARANÁ	40
2.6 O GUARANÁ COMO AGENTE MICROBICIDA	43
2.7 EFEITO GASTROPROTETOR E ANTI-ULCEROGÊNICO DO GUARANÁ.....	44
2.8 POSSÍVEIS EFEITOS PREVENTIVOS DE DOENÇA CARDIOVASCULAR	45
2.9 POSSÍVEL EFEITO AFRODISÍACO DO GUARANÁ	46
2.10 O GUARANÁ COMO AGENTE ANTIOXIDANTE.....	46
2.11 PERSPECTIVAS FUTURAS	48

CAPÍTULO 3: OBJETIVOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	49
3.1 OBJETIVOS	50
3.1.1 Objetivos específicos.....	50
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	52
3.2.1 Ação do guaraná na fase de iniciação	52
3.2.2 Ação do guaraná nas fases de promoção e progressão.....	53
3.2.3 Função da conexina43 sobre a carcinogênese pulmonar	53
3.2.4 Ação do guaraná como agente antineoplásico	53
3.2.5 Efeitos do guaraná sobre a ativação do receptor nuclear CAR	54
 Capítulo 4: EFEITO QUIMIOPREVENTIVO DO GUARANÁ SOBRE O DANO DE DNA	 55
 4 O Guaraná (<i>Paullinia cupana</i>) Modula As Enzimas Antioxidantes E Do Citocromo P450 Prevenindo O Dano De DNA Induzido Por Carcinógeno No Fígado De Camundongos	 56
<i>Submetido a publicação</i>	
RESUMO.....	57
4.1 INTRODUÇÃO	58
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	60
4.2.1 Animais	60
4.2.2 <i>Paullinia cupana</i>	60
4.2.3 Protocolo experimental.....	61
4.2.4 Análises do soro	61
4.2.5 Atividade da catalase, glutathione-redutase e superóxido-dismutase	61
4.2.6 Quantificação da fragmentação de DNA (técnica do DNA <i>smear</i>)	62
4.2.7 Extração de RNA e confecção do DNA complementar	63
4.2.8 Análise da expressão gênica semi-quantitativa	63
4.2.9 Avaliação do splicing alternativo de MDM2	65
4.2.10 Análises estatísticas	66
4.3 RESULTADOS	67

4.3.1	Caracterização da hepatotoxicidade da dietilnitrosamina	67
4.3.2	Hepatotoxicidade da <i>P.cupana</i> na dose de 2000 mg/kg	71
4.3.5	O guaraná diminui o dano de DNA e a expressão de MDM2 induzidos pela dietilnitrosamina.....	73
4.3.6	A capacidade antioxidante do guaraná aumenta a atividade da superóxido dismutase e glutatona-redutase.....	74
4.3.7	O guaraná altera a expressão de enzimas do citocromo p450	76
4.4	DISCUSSÃO	78

CAPÍTULO 5: EFEITO QUIMIOPREVENTIVO DO GUARANÁ SOBRE A

	CARCINOGENESE PULMONAR	82
5	O Guaraná (<i>Paullinia cupana</i>) controla a progressão da carcinogênese pulmonar induzida pela 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona em camundongos: um papel para a inibição da ativação de CREB/ATF-1	83
	<i>Em preparação</i>	
	RESUMO.....	84
5.1	INTRODUÇÃO	86
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	88
5.2.1	Animais	88
5.2.2	<i>Paullinia cupana</i> , moagem e mistura da ração	88
5.2.3	Protocolos experimentais.....	89
5.2.3.1	Protocolo experimental 1: avaliação dos efeitos do guaraná sobre modelo de carcinogênese espontânea em camundongos A/J: 20 semanas	89
5.2.3.2	Protocolo experimental 2: avaliação dos efeitos do guaraná sobre modelo de carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK em camundongos A/J: 18 semanas.....	90
5.2.3.3	Protocolo experimental 3: avaliação dos efeitos do guaraná sobre modelo de carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK em camundongos A/J: 52 semanas.....	91
5.2.4	Análise histopatológica	92

5.2.5	Imunoistoquímica para PCNA e fosfo-CREB	93
5.2.6	Análise estatística	94
5.3	RESULTADOS	95
5.3.1	Efeitos do guaraná sobre o ganho de peso	95
5.3.2	O guaraná não influencia a carcinogênese espontânea em camundongos A/J	99
5.3.2.1	Número de lesões macroscópicas.....	99
5.3.2.2	Número de lesões histológicas	100
5.3.3	Efeitos do guaraná sobre a carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK e avaliada após 18 semanas de tratamento	101
5.3.3.1	Número de lesões macroscópicas.....	101
5.3.3.2	Análise histopatológica	103
5.3.4	Efeitos do guaraná sobre a carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK e avaliada após 52 semanas de tratamento	107
5.3.4.1	Análise macroscópica	107
5.3.4.2	Análise histológica	110
5.3.4.3	Análise da proliferação celular nos tumores.....	113
5.3.4.4	Análise do grau de atividade de CREB	114
5.4	DISCUSSÃO.....	116
CAPÍTULO 6: EFEITO DA CONEXINA43 SOBRE A CARCINOGENESE PULMONAR		120
6	A importância da proteína da junção GAP alfa-1 durante a carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK, uma nitrosamina derivada do tabaco	121
	<i>Em preparação</i>	
	RESUMO.....	122
6.1	INTRODUÇÃO	124
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	127
6.2.1	Animais	127
6.2.2	Protocolo experimental.....	127
6.2.3	Análise macroscópica	128

6.2.4	Exame histopatológico	128
6.2.5	Genotipagem	129
6.2.6	Imunoistoquímica para conexina43.....	130
6.2.7	Western blot para conexina43	130
6.2.8	PCR em tempo real	132
6.2.9	Análises estatísticas	133
6.3	RESULTADOS	134
6.3.1	Genotipagem	134
6.3.2	A deficiência da conexina43 aumenta a multiplicidade das lesões macroscópicas no pulmão de camundongos tratados com NNK.....	135
6.3.3	A deficiência da conexina43 aumenta a malignidade das lesões neoplásicas pulmonares.....	137
6.3.4	Análise semi-quantitativa da proteína conexina43.....	139
6.3.5	Imuno-localização da conexina43.....	141
6.3.6	Expressão do mRNA da conexina43.....	143
6.4	DISCUSSÃO	144

CAPÍTULO 7: EFEITO ANTINEOPLÁSICO DO GUARANÁ SOBRE METÁSTASES

	PULMONARES DE MELANOMA.....	147
7	<i>A Paullinia cupana</i> Mart var. <i>sorbilis</i>, guaraná reduz a proliferação celular e aumenta a apoptose de metástases pulmonares de melanoma B16/F10 em camundongos.....	148
	<i>Braz J Med Biol Res 2008, 41(4)305-310</i>	
	RESUMO.....	149
7.1	INTRODUÇÃO	150
7.2	MATERIAL E MÉTODOS	152
7.2.1	Animais	152
7.2.2	<i>Paullinia cupana</i>	152
7.2.3	Cultivo celular	153
7.2.4	Protocolo experimental	153

7.2.5	Análise histopatológica	153
7.2.6	Imunohistoquímica para PCNA.....	154
7.2.7	Detecção de apoptose	154
7.2.8	Análises estatísticas	155
7.3	RESULTADOS	156
7.4	DISCUSSÃO	161

CAPÍTULO 8: EFEITO ANTINEOPLÁSICO DO GUARANÁ SOBRE O TUMOR ASCÍTICO

	DE EHRLICH	164
8	<i>A Paullinia cupana</i> diminui a proliferação do Tumor Ascítico de Ehrlich por induzir parada do ciclo celular na fase G0/G1 devido a níveis alterados de p27 ^{KIP1} e ciclina-D1	165
	<i>Submetido a publicação</i>	
	RESUMO.....	166
8.1	INTRODUÇÃO	167
8.2	MATERIAL E MÉTODOS	169
8.2.1	Anticorpos e reagentes	169
8.2.2	Animais	169
8.2.3	Guaraná (<i>Paullinia cupana</i>)	170
8.2.4	Protocolo experimental.....	170
8.2.5	Análise por citometria de fluxo	172
8.2.6	Western blot para ciclina D1 e p27 ^{kip1}	172
8.2.7	Análise da expressão gênica	173
8.2.8	Análises estatísticas	174
8.3	RESULTADOS	175
8.3.1	<i>A P.cupana</i> reduz o crescimento das células de TAE e sua malignidade.....	175
8.3.2	<i>A P.cupana</i> induz parada na fase G1 nas células do TAE	176
8.3.3	O tratamento com <i>P.cupana</i> aumenta a proteína p27 ^{kip1} e reduz a expressão de ciclina d1 nas células do TAE	177

8.3.4	O tratamento com <i>P.cupana</i> aumenta a sobrevivência dos animais inoculados com TAE	180
8.4	DISCUSSÃO	182

CAPÍTULO 9: EFEITO CITOTÓXICO E ANTIPROLIFERATIVO DE UM EXTRATO DE GUARANÁ SOBRE CÉLULAS TUMORAIS DE PULMÃO DE CAMUNDONGOS..... 185

9	Efeito Citotóxico e Antiproliferativo de um Extrato de Guaraná Sobre Células Tumorais de Pulmão de Camundongos	186
	<i>Em preparação</i>	
	RESUMO.....	187
9.1	INTRODUÇÃO	188
9.2	MATERIAL E MÉTODOS	190
9.2.1	Preparação dos extratos de guaraná	190
9.2.2	Cultivos celulares	190
9.2.3	Avaliação da citotoxicidade dos extratos do guaraná	191
9.2.4	Ensaio de proliferação celular	192
9.2.5	Avaliação da morte celular por apoptose	192
9.2.6	Análise das fases do ciclo celular	193
9.2.7	Detecção de proteínas por western blot	193
9.2.8	Análises estatísticas	195
9.3	RESULTADOS	196
9.3.1	Avaliação da citotoxicidade dos extratos de guaraná sobre as células E9 e E10	196
9.3.2	Efeito do ETOHG sobre a proliferação das células E9	199
9.3.3	Efeitos do ETOHG sobre o ciclo celular	200
9.3.4	Efeitos do ETOHG sobre a atividade de caspase-3	201
9.3.5	Análise de proteínas por western blot.....	202
9.4	DISCUSSÃO	208

CAPÍTULO 10: EFEITOS DO GUARANÁ SOBRE O RECEPTOR CAR.....	211
10 O guaraná (<i>Paullinia cupana</i>) e a cafeína aumentam a expressão do receptor Andróstenos/Ativado Constitutivo no fígado de camundongos.....	212
<i>Submetido a publicação</i>	
RESUMO.....	213
10.1 INTRODUÇÃO	214
10.2 MATERIAL E MÉTODOS	217
10.2.1 Substâncias químicas	217
10.2.2 Animais	217
10.2.3 Guaraná	218
10.2.4 Protocolo experimental.....	218
10.2.5 Análise histopatológica	219
10.2.6 Análise bioquímica sérica	220
10.2.7 Detecção de colágeno	220
10.2.8 Análise da comunicação intercelular por junções GAP	220
10.2.9 Imunoistoquímica para PCNA.....	221
10.2.10 Análise por western blot das conexinas e PCNA.....	222
10.2.11 Análise da expressão gênica	223
10.2.12 Análises estatísticas	223
10.3 RESULTADOS	225
10.3.1 A cafeína e o guaraná induzem perda de peso apenas após a administração do TCPOBOP e não aumentam o dano hepático associado com o ligante do CAR	225
10.3.2 A cafeína e o guaraná exacerbam a hepatomegalia induzida pela ativação do CAR	225
10.3.3 A cafeína e o guaraná aumentam a hepatomegalia induzida pelo TCPOBOP por aumentar a proliferação dos hepatócitos.....	227
10.3.4 A ativação do CAR gera extensa degeneração vacuolar e conseqüente remodelação tecidual: ausência de efeito da cafeína e do guaraná	229
10.3.5 Ativação do CAR leva a perda da capacidade de comunicação intercelular por junções GAP	230

10.3.6 A alteração na capacidade da GJIC ocorre devido aos níveis de conexinas26 e 32	231
10.3.7 Indução enzimática de CYP1A2, CYP2B10 E CYP3A11 pela cafeína e guaraná: um possível papel do CAR.....	235
10.3.8 A cafeína e o guaraná exacerbam a transcrição pelo CAR de CYP1A2 e CYP3A11 após administração do ligante TCPOBOP.....	235
10.3.9 A cafeína e o guaraná aumentam a expressão do CAR após 24 horas da administração do TCPOBOP	236
10.4 DISCUSSÃO	238

CAPÍTULO 11: POSSÍVEIS INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS ENTRE FITO E QUIMIOTERÁPICOS 242

11 Natural É Sinônimo De Saudável? Os Fitoterápicos E Suas Interações Medicamentosas Na Terapia Do Câncer	243
<i>Submetido a publicação</i>	
11.1 INTRODUÇÃO	244
11.2 FATORES QUE ORIGINAM A RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA.....	245
11.3 COMO OCORREM AS INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS?	246
11.4 QUAL A IMPORTÂNCIA DOS RECEPTORES XENO-SENSORES?	249
11.5 PRODUTOS NATURAIS ORINUNDOS DE PLANTAS – ENFOQUE NOS MECANISMOS TOXICOCINÉTICOS.....	250
11.5.1 Ginkgo (<i>Ginkgo biloba</i>)	253
11.5.2 Castanha da Índia (<i>Aesculus hippocastanum</i>)	254
11.5.3 Ginseng (<i>Panax ginseng</i>)	254
11.5.4 Boldo (<i>Peumus boldus</i>)	255
11.5.5 Alcachofra (<i>Cynara scolymus</i>)	255
11.5.6 Maracujá (<i>Passiflora incarnata</i>)	256
11.5.7 Valeriana (<i>Valeriana officinalis</i>)	256
11.5.8 Plantas nativas do Brasil.....	257
11.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	259

CAPÍTULO 12: DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	261
12.1 DISCUSSÃO GERAL	262
12.2 CONCLUSÕES.....	274
REFERÊNCIAS	275

Capítulo 1

**Introdução:
Câncer, carcinogênese e
quimioprevenção**

1 Câncer, Carcinogênese e Quimioprevenção

1.1 INTRODUÇÃO

A ciência biológico-biomédica avança a uma velocidade muito grande, e a tendência é que com os novos métodos e o conhecimento científico acumulado a cada novo dia, as descobertas sobre os mais diferentes problemas que afligem a humanidade solucionem os enigmas de outrora. Porém, ao acompanhar mais a fundo esta “corrida” científica, um destes problemas continua fazendo cada vez mais vítimas pelo mundo todo, independentemente do avanço na medicina ocorrido nos últimos 50 anos: o câncer. No ano de 2002 verificou-se que 11 milhões de pessoas foram diagnosticadas e 7 milhões morreram por causa desta doença no mundo todo (KAMANGAR; DORES; ANDERSON, 2006). Obviamente que a disparidade entre as diferentes regiões do mundo levam a diferenças nos dados de incidência, morbidade e mortalidade, sendo possível notar que em países desenvolvidos, as curvas de mortalidade e de novos casos tendem a se estabelecer. Já nos países pobres tem ocorrido um aumento na incidência e mortalidade de pessoas com câncer, por causas diversas, porém principalmente causas consideradas evitáveis como aumento no consumo de tabaco, exposição a alimentos contaminados com toxinas (aflatoxina, por exemplo), prevalência de infecção por *Helicobacter pylori* etc. Os dados brasileiros do ano de 2000 indicaram que as neoplasias são a segunda maior causa de morte, ficando atrás apenas de doenças do sistema circulatório (INCA, INSTITUTO NACIONAL DO CâNCER, 2003), sendo que entre 1979 e 2000 foi observado um aumento lento e gradativo no número de mortes por câncer de pulmão, próstata e mama; por outro lado, ocorreu uma diminuição nos casos de morte por tumor de estômago (INCA, INSTITUTO NACIONAL DO CâNCER, 2003).

Sendo assim é lógico e esperado que seja feita ciência sobre o câncer, desde a pesquisa básica tentando compreender os diversos mecanismos que levam ao desenvolvimento progressivo da doença, à ciência traducional (do inglês, *translational medicine*) e aplicada (ou clínica). Ambas devem compreender e absorver o conhecimento básico para formular novas opções com intuito de diminuir o número de mortes causadas

por neoplasias. As alternativas para se reduzir a mortalidade gerada pelos cânceres são consideradas três principais: detecção precoce, prevenção e tratamento. Dentre estas opções, a mais plausível seria a prevenção, porém também é a mais controversa, como veremos a seguir.

1.2 O QUE É CÂNCER?

Câncer é considerado como sendo tumor (ou neoplasma, ou neoplasia) maligno, ou seja, que já possui a capacidade de invadir os tecidos adjacentes e gerar metástases em órgãos distantes. Porém a definição mais utilizada para neoplasma é a do médico oncologista britânico Rupert A. Willis, que em 1952 definiu “Neoplasma é uma massa anormal de tecido, no qual o seu crescimento excede e é descoordenado em relação ao tecido normal, e persiste da mesma maneira excessiva mesmo após a interrupção dos estímulos que levaram a sua formação” (WILLIS, 1952). O processo pelo qual o câncer se desenvolve é denominado de carcinogênese, onde diversas evidências demonstraram que em humanos e possivelmente em outras espécies animais, seja um processo de múltiplos passos que refletem alterações genéticas (e epigenéticas) que direcionam a transformação progressiva de células normais em derivados altamente malignos (HANAHA; WEINBERG, 2000). Em humanos acredita-se que sejam necessários de 6 a 7 eventos independentes, seqüenciais e estáveis antes que as células cancerosas se tornem malignas (ARMITAGE; DOLL, 1954). Interessantemente, este modelo foi proposto por Epidemiologistas, antes do advento da biologia molecular (WEISS, 2004). Estes eventos, genéticos ou não, recaem sobre 6 grandes tipos de alterações que as células cancerosas podem apresentar, já denominados como os pontos chaves do câncer (*Hallmarks of cancer*): auto-suficiência em fatores de crescimento; insensibilidade aos fatores inibitórios; evasão da apoptose; neoangiogênese; potencial ilimitado de replicação e; invasão tecidual e metastatização (HANAHA; WEINBERG, 2000). Devem-se ainda serem consideradas alterações que levem à geração de instabilidade cromossômica, potencialmente facilitando a ocorrência do acúmulo das alterações descritas (YAMASAKI; MIRONOV, 2000).

A carcinogênese além de ser caracterizada como um processo de múltiplos passos pode ser dividida em três fases para melhor compreensão e estudo: iniciação, promoção e progressão (BERENBLUM; SHUBIK, 1949). A iniciação consiste na primeira alteração, sendo aceito que esta seja responsável por impedir que a célula se diferencie terminalmente (TROSKO, 2007). A fase promocional consiste no período em que as células iniciadas crescem clonalmente sob a ação de substâncias não genotóxicas, induzindo a proliferação celular. Estas substâncias podem ser endógenas como no caso de infecções crônicas, como exemplo pode-se citar influência de *Helicobacter pylori* sob a carcinogênese de estômago. Podem também ser exógenas, onde xenobióticos não-genotóxicos geram este efeito promotor, como o fenobarbital para tumor de fígado, hidroxitolueno-butilado (BHT) para tumor de pulmão etc. A partir do momento que a lesão pré-neoplásica continua a crescer mesmo na ausência do agente promotor caracteriza-se o início da fase de progressão da carcinogênese. Nesta fase se localizam as lesões benignas (adenomas, por exemplo), assim como as malignas (adenocarcinomas). O modelo de carcinogênese colo-retal proposto no século passado (FEARON; VOGELSTEIN, 1990) condiz com esta teoria, onde se observa determinada seqüência característica de alterações envolvendo oncogenes (RAS) e genes supressores de tumor (Figura 1.1).

Figura 1.1 – Modelo de carcinogênese colo-retal genético. Baseado em descrições de Fearon e Vogelstein (FEARON; VOGELSTEIN, 1990)

1.3 QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER

O termo quimioprevenção do câncer foi cunhado a primeira vez por Michael Sporn (SPORN et al., 1976) e foi definido como sendo os meios pelos quais se pudesse interromper, reverter ou modular a carcinogênese. Desde então pesquisadores do mundo todo foram (e continuam) atraídos pela premissa de que “prevenir é melhor que remediar”, o que no caso do câncer pode ser considerado uma regra. Isto se deve ao fato, conforme comentado acima, que o câncer ainda é uma doença que apresenta índices muito altos de mortalidade. Mesmo com os imensos avanços no conhecimento sobre os mecanismos da carcinogênese e conseqüente desenvolvimento de novas drogas, os dados estatísticos de mortalidade não serão mudados até que ocorra uma mudança fundamental na ênfase dada à pesquisa do câncer, direcionando maiores recursos para a prevenção do câncer do que para o tratamento de uma doença em estágio-final (SPORN; SUH, 2002b).

A quimioprevenção é dividida conceitualmente em três partes: prevenção primária, ou seja, prevenir o início do câncer em indivíduos saudáveis; prevenção secundária, ou seja, prevenir o câncer em pacientes com condições de pré-malignidade (que apresentem lesões pré-neoplásicas); e prevenção terciária, ou seja, prevenir que novos cânceres se desenvolvam em pacientes já curados com um câncer inicial. O exemplo de quimioprevenção de câncer de mama com tamoxifeno demonstrou resultados promissores, reduzindo 49 e 43% a incidência de tumores invasivos com prevenção primária e secundária, respectivamente (HONG; SPITZ; LIPPMAN, 2000). A utilização do tamoxifeno nestas condições ilustrou outro princípio geral da quimioprevenção: o número de pacientes e a duração do ensaio clínico são maiores em ensaios de prevenção primária do que de prevenção secundária ou terciária. Este fato leva-nos a considerar que quimioprevenção do câncer deve ser de alguma maneira direcionada para pessoas que tenham predisposição a determinado tipo de câncer, evitando assim medicar pessoas que provavelmente nunca terão câncer em determinado órgão. Além disso, as drogas quimiopreventivas devem por si só apresentarem baixo grau de toxicidade e custo, já que deverão ser consumidas por um longo período.

Estas drogas são classicamente divididas em agentes inibidores, bloqueadores e supressores da carcinogênese (WATTENBERG, 1985). Os agentes inibidores devem impedir a formação das substâncias carcinogênicas atuando sobre os agentes precursores; os agentes bloqueadores devem atuar sobre as substâncias carcinogênicas, sendo genotóxicas ou não, eliminando-as ou tornando-as menos tóxicas; e os agentes supressores devem agir sobre as manifestações malignas das células cancerosas, ou seja, impedindo a carcinogênese (WATTENBERG, 1985). A maneira mais racional para a quimioprevenção é estudar e testar novos agentes que atuem em alvos moleculares e celulares específicos (SPORN; SUH, 2002b). Referente a esta afirmação, já foi demonstrado que diversos fitoquímicos derivados de plantas, que fazem parte da dieta, interferem em estágios específicos da carcinogênese (SURH, 2003a). Estes fitoquímicos são componentes não nutritivos presentes na dieta que possuem efeito anticarcinogênico substancial. A quimioprevenção com os fitoquímicos presentes na dieta é considerada uma maneira para controlar o câncer de forma barata, rapidamente aplicável, aceitável e acessível (SURH, 2003a). Sendo assim, uma ótima alternativa para um país como o nosso que não possibilita a todos o acesso às melhores formas de tratamento de câncer sejam elas radio ou quimioterápica.

Capítulo 2

Guaraná: um alimento funcional?

Aceito para publicação no livro da série *Advances in Food and Nutrition Research* sob o título: “*Guarana as a functional food: where do we stand?*”

2 Guaraná (*Paullinia Cupana*): Um Alimento Funcional?

Heidge Fukumasu^a e Maria Lucia Zaidan-Dagli^a

^a Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, São Paulo, SP, Brasil

2.1 INTRODUÇÃO

Alimentos funcionais são definidos como sendo qualquer alimento ou ingrediente que pode prover benefícios para a saúde acima dos conferidos pelos nutrientes convencionais que os alimentos já contêm (MARRIOTT, 2000). Desta maneira, as plantas são ótimas opções como alimentos funcionais tendo em vista o conhecimento gerado devido ao seu extensivo uso por milhares de anos na dieta tanto na medicina oriental (JIA; GAO; TANG, 2003) como por tribos indígenas brasileiras (CARLINI, 1991). Os primeiros relatos do uso de plantas como ervas medicinais, são da Mesopotâmia e datam cerca de 2600 anos antes de Cristo, onde as substâncias utilizadas eram óleos de espécies de Cedros, *Cupressus sempervirens* (Cipreste), *Glycyrrhiza glabra* (Alcaçuz), *Commiphora myrrha* (Mirra), e *Papaver somniferum* (Papoula), todas quais ainda são usadas para o tratamento de doenças desde resfriados e tosses até infecções parasitárias e processos inflamatórios (GURIB-FAKIM, 2006). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 75% a 80% do mundo em desenvolvimento ainda utiliza continuamente plantas para sua medicação (BARRETT; KIEFER; RABAGO, 1999), seja por razões culturais, sociais ou mesmo econômicas.

Dentre as várias espécies amazônicas que são reconhecidas pelo seu potencial econômico, o guaraná é uma que particularmente chama a atenção (GONCALVES et al., 2006). O guaraná (*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*) pertence à família Sapindaceae e é um arbusto originário do Brasil, mais precisamente da região Amazônica, que vem sendo utilizado como estimulante pelos índios da tribo *Saterê-Maué* durante séculos (HENMAN, 1986). Atualmente o guaraná é utilizado na composição de inúmeros produtos, como bebidas não alcoólicas, refrigerantes, tônicos, compostos anti-estresse, complexos para emagrecimento, entre outros.

2.2 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DO GUARANÁ

Os frutos do guaraná são os mais comumente utilizados, mas também podem ser usadas as folhas, as flores e até as sementes. No entanto, em relação as suas composições químicas cada parte da planta contém diferenças, como por exemplo: nas sementes não se encontram teofilina nem teobromina (dois radicais metil-xantínicos, assim como a cafeína), porém estes radicais estão presentes nas outras estruturas como folhas, flores e frutos (HENMAN, 1986). Além disto, o extrato de guaraná apresenta em sua composição os radicais metil-xantínicos, como a cafeína, teobromina e teofilina, ocorrendo também taninos, saponinas, catequinas, epicatequinas, proantocianidóis, e outros componentes de menor expressão. Dá-se ênfase à alta concentração de taninos, chegando a 16,00% e de cafeína, com valores que variam de 2,5 a 5,8% (HENMAN, 1982a). Sendo a quantidade de cafeína extraída do pó de guaraná variável dependendo do solvente orgânico utilizado (MAJHENIC; SKERGET; KNEZ, 2007) (Figura 2.1).

Figura 2.1 – O conteúdo de cafeína (mg/g do extrato) para os diferentes métodos de extração usando os solventes: água, metanol, acetona (35%) e etanol (60%), obtidos a temperatura ambiente (TR) ou de fervura (TB) [Extraído de Majhenic, Skerget e Knez (2007)]

A contribuição do guaraná na dieta com relação à cafeína é importante já que este possui em média 4 vezes mais cafeína que o próprio café (TFOUNI et al., 2007). Alguns autores aprimoraram a extração das metil-xantinas (SALDANA et al., 2002) e determinaram também a quantidade de metil-xantinas em amostras de guaraná por diferentes técnicas, como por exemplo, a cromatografia de coluna de gás capilar (PAGLIARUSSI; FREITAS; BASTOS, 2002). Neste sentido, em um estudo publicado pelo nosso grupo, onde utilizamos o guaraná como agente quimiopreventivo na hepatocarcinogênese química em camundongos (FUKUMASU et al., 2006b), também avaliou-se a amostra da planta quanto a sua composição bromatológica e química (Tabela 2.1). Em outro trabalho recentemente publicado (KOFINK; PAPAGIANNOPOULOS; GALENSA, 2007) analisou-se extratos de semente de guaraná que demonstrou que todos enantiômeros de catequina e epicatequina estavam presentes ((+)- e (-)-catequina e (+)- e (-)-epicatequina), podendo ser encontrados em diferentes amostras de extratos de sementes de guaraná. Estas substâncias são compostos polifenólicos de grande interesse científico e comercial atualmente.

Por fim, avaliou-se (CAMARGO et al., 2006) os níveis de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAH) em treze amostras de guaraná e foi demonstrado que dependendo do processamento, detectam-se alguns destes PAHs, conhecidos como substâncias carcinogênicas, nas amostras da planta. Logo, atenção deve ser dada ao processamento das sementes, com a finalidade de se evitar a contaminação excessiva por PAHs.

Tabela 2.1 – Composição química e bromatológica da *P.cupana* [Extraído de Fukumasu et al. (2006b)]

Parâmetros	Valores
Matéria seca*	986,70
Matéria Orgânica**	978,87
Extrato etéreo**	45,90
Fibras totais**	27,99
Fibras detergentes neutras**	322,28
Fibras detergentes ácidas**	95,67
Lignina**	76,63
Proteínas totais**	134,82
Fenóis totais**	14,00
Taninos totais***	13,00
Taninos condensados****	5,72

* g.kg⁻¹ de matéria orgânica (à 100°C); ** g.kg⁻¹ de matéria seca; *** porcentagem da matéria original equivalente ao ácido tânico; **** porcentagem da matéria seca equivalente a leucocianidina

2.3 EFEITOS PATOFISIOLÓGICOS COMPROVADOS CIENTIFICAMENTE

Recentemente tem se estudado o guaraná como nunca visto antes. Na figura 2.2 tem-se o número de publicações por ano encontradas na base de dados Scopus (publicações até Dezembro de 2007). Desde o pioneiro trabalho de Snow, sobre a importância dos fitoquímicos presentes no guaraná (SNOW, 1887), os pesquisadores têm aprofundado o conhecimento sobre esta planta tanto do ponto de vista bioquímico quanto fisiopatológico, visando na maioria das vezes aplicações terapêuticas, tendo muitas vezes como base o conhecimento indígena. O dito popular nos ensina que o guaraná apresenta diversos efeitos terapêuticos como o de melhorar a memória, ser energético, diurético, lipofílico, anti-stress

e antidiarréico, porém poucos destes efeitos já foram comprovados cientificamente, como veremos a seguir.

Os efeitos do guaraná mais estudados cientificamente até o presente momento explicitam seus efeitos sobre suas funções estimulantes, principalmente sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), alterações de comportamento e como indutor de perda de peso. Todos estes efeitos levam o guaraná a ser considerado como um agente adaptógeno (MENDES; CARLINI, 2007). O termo adaptógeno (ou resistógeno) foi definido recentemente para substâncias reguladoras metabólicas naturais que aumentam a habilidade do organismo para se adaptar a fatores ambientais e evitar danos gerados por estes fatores (PANOSSIAN; WIKMAN; WAGNER, 1999). Por outro lado, outras funções têm sido estudadas recentemente como, por exemplo, a inibição da agregação plaquetária, proteção contra a lesão gástrica induzida por etanol, quimioprevenção contra o câncer, anti-bactericida e anti-oxidante. Daqui em diante discutiremos cada efeito detalhadamente.

Figura 2.2 – Número de publicações encontradas por ano na base de dados “SCOPUS” (www.scopus.com) sob o tema “Guarana” até o ano de 2007

2.4 FUNÇÕES SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Dentre os diversos usos populares do guaraná, seu uso como tônico e estimulante das funções cerebrais (Quadro 2.1) são de longe os mais conhecidos (GALDUROZ; CARLINI, 1996; CARLINI, 2003). Avaliou-se os efeitos do guaraná em ratos sobre a capacidade de manter a memória e reverter amnésia (ESPINOLA et al., 1997). Assim, estes pesquisadores demonstraram que o guaraná reverte parcialmente os efeitos amnésicos da escopolamina em ratos velhos. Além disto, verificou-se que o guaraná foi útil para manter a memória previamente adquirida, pelo teste de *Lashey III maze*. No final de 22 meses, os animais velhos tratados com guaraná apresentaram menos erros e tempo necessários que os animais controle, porém este dado não atingiu significância estatística. Estes autores ainda verificaram que estes efeitos são provavelmente devido a outras substâncias presentes no guaraná que não a cafeína. Em outro estudo, Campos e colaboradores (CAMPOS et al., 2005) mostraram que o guaraná apresentou efeito antidepressivo em camundongos por significativamente reduzir a duração da imobilidade no teste de natação forçada. Estes autores sugeriram ainda que tal efeito do guaraná ocorreu por um mecanismo diferente do adenosinérgico gerado pela cafeína.

Com relação aos seres humanos, os efeitos cognitivos do guaraná têm se mostrado controversos. Por um lado, já foi observado que o guaraná aumenta os efeitos psicoativos melhorando o desempenho, sendo este efeito principalmente sobre a atenção e precisão (KENNEDY et al., 2004). O mesmo grupo demonstrou recentemente num estudo duplo-cego placebo os efeitos de diferentes doses do guaraná em humanos (HASKELL et al., 2007). Neste estudo os autores confirmaram seus resultados anteriores sobre a melhora cognitiva dos pacientes, onde doses menores de guaraná tiveram um resultado melhor que altas doses. Os autores sugerem ainda que estes efeitos sejam devido a outras substâncias presentes no guaraná que não a cafeína. Por outro lado, em outros estudos também realizados em humanos, Galduróz e Carlini (1996) não observaram qualquer efeito cognitivo após a administração de guaraná em pacientes humanos, tanto em experimentos com exposição ao guaraná aguda ou crônica. Entretanto, estes efeitos controversos podem ser explicados pela utilização de diferentes amostras de guaraná em cada experimento.

Efeito	Espécie	Dose de Guaraná	Tipo do Extrato	Referência
<i>Manutenção da Memória</i>	Rato	0.3 – 3.0 mg/ml	Aquoso	(ESPINOLA et al., 1997)
<i>Anti-amnésico</i>	Rato	0.3 – 3.0 mg/ml	Aquoso	(ESPINOLA et al., 1997)
<i>Anti-depressivo</i>	Camundongo	25 – 50 mg/kg	Bruto – Pó	(CAMPOS et al., 2005)
<i>Melhora precisão e atenção</i>	Humano	75 mg	Etanólico	(KENNEDY et al., 2004)
<i>Melhora cognitiva</i>	Humano	37.5 – 300 mg	Etanólico	(HASKELL et al., 2007)

Quadro 2.1 – Efeitos do guaraná sobre o Sistema Nervoso Central publicados previamente

2.5 SUPLEMENTOS PARA PERDA DE PESO: GUARANÁ

O guaraná é também muito utilizado como um alimento funcional fazendo parte do grupo de plantas com reconhecida finalidade de gerar perda de peso. Estes suplementos geralmente têm em sua composição outras plantas além do guaraná, como por exemplo: Ginseng (*Panax ginseng*), Erva-mate (*Ilex paraguayensis*), Ma-Huang (*Ephedra sp.*) e Damiana (*Turnera diffusa* var. *aphrodisiaca*). Dentre estas combinações, as plantas que possuem cafeína (guaraná) e efedrina (Ma-Huang) são as conhecidas por produzirem a perda de peso em animais e seres humanos (DULLOO; MILLER, 1986, 1987).

Desta forma, Boozer et al. (2001) ao estudar os efeitos de um suplemento que continha guaraná e Ma-Huang, em pacientes humanos, demonstraram que em um curto prazo de exposição (8 semanas), o suplemento efetivamente promoveu a perda do peso e gordura dos pacientes (Figura 2.3). Contudo, os autores sugeriram ao final do seu trabalho a avaliação por um tempo maior que as 8 semanas do experimento. Outro estudo, também

realizado em humanos (ANDERSEN; FOGH, 2001), demonstrou que um suplemento sul-americano com guaraná, erva-mate e Damiana (Zotrim®) induziu perda de peso significativa em pacientes obesos após 45 dias de uso. Este efeito ocorreu porque o suplemento aumentou o tempo para esvaziamento gástrico, conseqüentemente mantendo os pacientes saciados por mais tempo. Os autores também indicam que se estudem os princípios ativos de cada uma das plantas com a finalidade de verificar qual seria o responsável por tal efeito. Quando este suplemento foi dado por seis semanas para profissionais obesos da área da saúde, observou-se perda clinicamente significativa de peso em 22% dos pacientes (RUXTON et al., 2007). Conjuntamente, estes dois experimentos provem informações sobre o possível efeito do guaraná como indutor de perda de peso devido a um aumento do tempo de saciedade das pessoas por aumentar o tempo necessário para o esvaziamento gástrico.

Figura 2.3 – Alterações no peso corpóreo (kg) durante o estudo de 8 semanas nos pacientes tratados ou do grupo placebo. Os valores demonstrados representam a média $\pm$ D.P.. As linhas sólidas representam o grupo placebo e a linha pontilhada o grupo tratado. Extraído de Boozer et al. (2001)

Em um estudo feito em ratos sedentários e treinados (LIMA et al., 2005) a respeito da ação do guaraná sobre o metabolismo lipídico, foram avaliadas as seguintes variantes: peso vivo, consumo de água e alimento, gordura muscular total, incorporação de oleato, conteúdo de glicogênio e a expressão do mRNA e atividade da enzima palmitoiltransferase I. Os autores observaram que todas as alterações induzidas pelo guaraná levaram a um efeito sobre o metabolismo de lipídeos, e quando o guaraná era descafeinado, este efeito se perdia. Logo, concluíram que os efeitos são decorrentes do conteúdo de metil-xantinas do guaraná.

Independente do mecanismo de indução de perda de peso, o guaraná é uma das plantas mais utilizadas com essa finalidade. Assim, um estudo recente de Sharpe e colaboradores (SHARPE et al., 2007) na cidade de Columbia, capital do estado da Carolina do Sul (EUA) demonstrou que em 73 lojas avaliadas na zona metropolitana, foram encontrados 402 produtos com a finalidade de gerar perda de peso, com um total de 4053 ingredientes diferentes. Destes, 10 ingredientes foram os mais comumente encontrados, onde os autores demonstraram o guaraná como sendo o terceiro mais presente nos suplementos, antes mesmo que o chá verde, por exemplo. Por outro lado, estes autores também consideraram a hipótese de o guaraná ser um ingrediente que poderia apresentar contra-indicações baseadas na literatura (Tabela 2.2). Desta maneira, em uma revisão sistemática sobre os efeitos adversos de suplementos para perda de peso (PITTLER; ERNST, 2004) os efeitos colaterais mais comumente relacionados com o consumo de guaraná foram: irritabilidade, palpitações cardíacas, taquicardia, ansiedade e outras desordens de sistema nervoso central. Portanto, de fato pacientes que apresentem predisposição para quaisquer destes efeitos devem ter o consumo de guaraná reduzido e devem ser acompanhados freqüentemente por um médico.

Tabela 2.2 – Os 10 principais ingredientes encontrados em 402 produtos para perda de peso encontrados no comércio na região metropolitana e as características destes ingredientes. Extraído de Sharpe et al. (2007)

Ingredient	No. of products containing ingredient	% of total products containing ingredient	% of products with the ingredient having a label warning	% of products with the ingredient containing one or more proprietary blends	% of products with the ingredient included within proprietary blend ^a	% of products with the ingredient that have claim on label	Mean±standard deviation total no. of ingredients in products with the ingredient	Range for no. of all ingredients in products with the ingredient	Mean±standard deviation daily amount of ingredient in products ^a	Range for daily amount of ingredient in products ^a
Ginger root	106	26.4	90.6	65.1	58.5	86.6 ^b	15.4±7.32	4-47	161.2±147.87 mg	6-696 mg
Chromium picolinate	104	25.9	79.8	41.3	91.3	76.9 ^b	10.9±8.22	1-38	532.0±469.50 µg	24-2,250 µg
Guarana seed extract	87	21.6	95.3	58.6	36.8	83.9 ^b	13.7±6.74	3-32	2,395.8±2,637.92 mg	22-9,000 mg
<i>Garcinia cambogia</i>	82	20.4	77.8	30.9	16.0	74.1 ^b	11.2±7.62	1-38	2,112.0±2,295.87 mg	84-12,000 mg
Ma huang	81	20.1	92.5	47.5	30.0	88.8 ^c	13.0±6.87	3-36	1,038.4±733.32 mg	24-3,015 mg
Tea (green)	74	18.4	88.9	58.3	47.2	86.1 ^b	12.7±6.39	1-30	601.0±593.03 mg	50-3,000 mg
Salix alba	58	14.4	91.2	59.6	47.4	86.0 ^b	13.0±7.17	4-36	381.0±360.47 mg	50-1,800 mg
Ginseng (Siberian)	57	14.2	86.0	64.9	63.2	82.5 ^c	16.9±5.96	7-36	151.9±157.02 mg	1.5-500 mg
Cayenne (<i>Capsicum</i>)	55	13.7	81.8	49.1	41.8	85.5 ^b	13.6±7.55	3-36	153.2±173.94 mg	14-600 mg
Zhi shi	54	13.4	86.8	52.8	26.4	90.6 ^b	12.0±5.72	4-28	588.4±560.81 mg	25-1,950 mg

^aIf the ingredient is part of a proprietary blend, the amount of it included is generally not given on the label; therefore, products in which the top-10 ingredient was part of a proprietary blend could not be used in calculating the mean daily amount of the ingredient across products.

^bMost common claim: Burns fat/weight loss.

^cMost common claim: Accelerate metabolism/burn kilocalories/increase energy.

2.6 O GUARANÁ COMO AGENTE MICROBICIDA

Dois trabalhos demonstraram recentemente que o guaraná pode apresentar efeito microbicida para algumas espécies tanto de bactérias como de fungos. O extrato utilizado por Basile e colaboradores (BASILE et al., 2005), nas concentrações de 16 e 128 µg/ml mostraram um efeito antibacteriano significativo contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* e *Escherichia coli*. Em outro trabalho (MAJHENIC; SKERGET; KNEZ, 2007) onde estudaram os efeitos de extratos de guaraná sobre fungos contaminantes de alimentos (*Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* e *Penicillium cyclopium*) e bactérias patogênicas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus cereus*), demonstrou-se que os extratos alcoólicos do guaraná apresentaram maior efeito que os extratos aquosos.

2.7 EFEITO GASTROPROTETOR E ANTI-ULCEROGÊNICO DO GUARANÁ

Diversas plantas já foram estudadas por possuir efeito gastroprotetor ou anti-ulcerogênico com a finalidade de compreender seus mecanismos moleculares, sendo já em parte descritos (ZAYACHKIVSKA et al., 2004). Assim, Campos e colaboradores (CAMPOS et al., 2003) demonstraram que um extrato seco das sementes do guaraná (50 e 100mg/kg, p.o.) quando administrados em ratos com lesões gástricas agudas induzidas pelo etanol ou indometacina, gerou uma diminuição significativa na severidade das lesões induzidas pelo etanol (Tabela 2.3), semelhante ao efeito observado quando da administração da cafeína (20 e 30 mg/kg, p.o.). Interessantemente os autores observaram também que o guaraná, porém não a cafeína, inibiu as úlceras gástricas induzidas pela indometacina. Em conjunto com estes resultados, os autores afirmam que tanto o guaraná quanto a cafeína causaram uma diminuição significativa da secreção/volume gástrico em ratos com seu piloro obstruído por 4 horas. Por fim, os autores indicam que esta propriedade gastroprotetora do guaraná necessita de melhor elucidação no que diz respeito ao seu mecanismo de ação.

Tabela 2.3 – Efeitos do extrato de *P.cupana* nas lesões gástricas. Adaptado de Campos et al. (2005)

Tratamento	Dose (mg/kg, p.o.)	Indometacina (Escore de úlceras)	Etanol (% área com lesão em mm ²)	Suco Gástrico (ml)	Acidez total (μEq/h)
Controle	-	47,5±2,9	21,4±2,9	6,7±1,5	327,5±72,8
Guaraná	50	35,0±2,9	9,4±1,8	3,8±0,6	145,0±63,7
Guaraná	100	26,5±2,5	13,45±2,5	2,9±0,8	148,8±50,8
Cafeína	20	40,5±4,1	8,9±2,3	3,8±0,8	113,0±22,8
Cafeína	30	32,0±4,8	1,1±1,2	2,5±0,4	86,3±16,6

2.8 POSSÍVEIS EFEITOS PREVENTIVOS DE DOENÇA CARDIOVASCULAR

Nos dias de hoje, as doenças cardiovasculares ainda são responsáveis por mais mortes que o câncer nos Estados Unidos (HEALTH, 2007). Este termo embora se refira a uma classe de doenças que envolvem o coração e os vasos sanguíneos, é normalmente empregado a aterosclerose (doença arterial). Com relação a esta doença, já se demonstrou que o extrato aquoso de guaraná pode preveni-la, pois inibiu a agregação plaquetária (BYDLOWSKI; YUNKER; SUBBIAH, 1988). Os autores demonstraram que o princípio ativo seria solúvel em água e resistente ao calor, parecendo ser diferente de salicilatos, ácido nicotínico e das xantinas conhecidas. Em outro trabalho, o mesmo grupo demonstrou que este efeito sobre a agregação plaquetária ocorreu pelo menos em parte, devido à menor síntese de tromboxana nas células tratadas com guaraná (BYDLOWSKI; DAMICO; CHAMONE, 1991).

2.9 POSSÍVEL EFEITO AFRODISÍACO DO GUARANÁ

Antunes et al. (2001) estudaram os efeitos de um conhecido suplemento brasileiro de ervas medicinais (Catuama®) sobre o relaxamento do corpo cavernoso de coelhos com a finalidade de verificar se tal suplemento teria efeito afrodisíaco. A Catuama® apresenta em sua composição as seguintes plantas: *Paullinia cupana* (guaraná; Sapindaceae), *Trichilia catigua* (catuaba; Meliaceae), *Zingiber officinalis* (gengibre; Zingiberaceae) e *Ptychopetalum olacoides* (muirapuama; Olacaceae). Os autores verificaram que o suplemento realmente gerou um relaxamento rápido, curto e dose-dependente do corpo cavernoso dos coelhos. Ainda demonstraram ao estudar isoladamente as plantas que constituem a Catuama®, que a que apresentou maior efeito foi o guaraná (ANTUNES et al., 2001), sendo desta maneira, o guaraná a planta responsável em conferir o poder afrodisíaco na Catuama®.

2.10 O GUARANÁ COMO AGENTE ANTIOXIDANTE

Ao considerar o guaraná como um possível agente adaptógeno, Mendes e Carlini (2007) com certeza levaram em conta a capacidade antioxidante do guaraná, demonstrada até o presente momento apenas *in vitro* (MATTEI et al., 1998b; BASILE et al., 2005; MAJHENIC; SKERGET; KNEZ, 2007). No trabalho pioneiro de Mattei e colaboradores (MATTEI et al., 1998b), os pesquisadores avaliaram a ação antioxidante de um extrato aquoso-alcoólico do guaraná medindo a inibição da peroxidação lipídica espontânea de homogenizados de cérebros de ratos. Observaram que o guaraná mesmo em baixas concentrações (1,2 µg/ml) inibiu o processo de peroxidação lipídica, provavelmente devido a altas concentrações de taninos presentes no guaraná. Os autores na época sugeriram com base nestes dados que o guaraná poderia ser um possível agente adaptógeno. Outro estudo (BASILE et al., 2005) estudou os efeitos de um extrato etanólico do guaraná pelo teste do malonilaldeído (MDA), medindo a concentração de MDA em células 3T3-L1 após indução de dano celular com citrato de amônio férrico. Os autores verificaram que o extrato do guaraná induziu uma diminuição da peroxidação lipídica em torno de 62.5% com a concentração de

2,0 µg/ml e que este efeito era dose-dependente (Figura 2.4). Em outro trabalho publicado recentemente, Mahjenic e colaboradores demonstraram que extratos de guaraná extraídos com diferentes solventes, como etanol, metanol, acetona e água apresentaram forte efeito antioxidante e inibitório sobre radicais livres (MAJHENIC; SKERGET; KNEZ, 2007). Neste trabalho, os autores avaliaram a atividade antioxidante do guaraná numa reação oxidante induzida pelo calor num sistema aquoso com beta-caroteno e ácido linoleico (SKERGET et al., 2005), onde as amostras de guaraná preveniram a oxidação em relação à amostra controle. Mahjenic e colaboradores, também estudaram a ação do guaraná na inibição de radicais livres, num sistema onde se estuda a ação de substâncias capazes de inibir radicais livres de 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH), provavelmente sendo pela habilidade de doar hidrogênio. O DPPH é um radical livre instável e recebe elétrons ou radicais-hidrogênio para se tornar uma molécula estável (GULCIN et al., 2004). Neste modelo experimental, os mesmos extratos de guaraná inibiram os radicais livres.

Figura 2.4 – Atividade Antioxidante do Extrato Etanólico do Guaraná. Os valores são expressos como picomoles de malonildialdeído/MG de proteína total (***) $p < 0.001$). Grupos: (1) controle (ausência de citrato férrico de amônio e de guaraná); (3-5) presença de citrato férrico de amônio e extrato de guaraná nas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 µg/ml, respectivamente. Porcentagem de inibição: (3) 17,8%; (4) 44,6%; (5) 65,2% sobre o grupo (2). Extraído de Basile et al. (2005)

Apenas recentemente avaliou-se a ação antioxidante do guaraná em animais vivos, onde foi possível observar que o guaraná administrado para camundongos BALB/c fêmeas

gerou efeito antioxidante por conter substâncias que mimetizam a ação da superóxido dismutase. Posteriormente este efeito será comentado com maior detalhamento (capítulo 4 a seguir). Ao melhor do nosso conhecimento, este é o primeiro relato da ação antioxidante do guaraná em animais, sendo conseqüentemente o primeiro que levanta a possibilidade do guaraná ter ação antioxidante principalmente contra um radical livre específico ($O^{\cdot -2}$).

2.11 PERSPECTIVAS FUTURAS

Conforme descrito neste capítulo, diversos efeitos do guaraná já foram estudados cientificamente, sendo que em sua grande maioria, foram estudos realizados em animais de laboratório. Por um lado, devemos levar em consideração que resultados observados em camundongos ou ratos não podem ser totalmente transpostos aos seres humanos, mas por outro lado, estes estudos são fundamentais, pois ajudam a compreender melhor os efeitos do guaraná, principalmente pensando na futura aplicação em seres humanos e outros animais quer sejam de interesse zootécnico ou mesmo afetivo.

Um ponto que se deve levar em conta é a grande quantidade de cafeína encontrada nas amostras de guaraná, substância esta que diversas pessoas são sensíveis ou mesmo podem ser intoxicadas. Logo, atenção deve ser prestada ao se consumir o guaraná como erva medicinal para atingir qualquer efeito acima descrito, da mesma maneira que cuidado deve ser tomado ao se consumir o guaraná como um alimento funcional. Ao considerarmos o guaraná como um agente adaptógeno, pouca quantidade diariamente parece ser a melhor forma de se consumir para poder se aproveitar dos efeitos benéficos do guaraná, tanto como agente anti-estresse, anti-obesidade ou mesmo como agente quimiopreventivo contra o câncer, como descreveremos nos próximos capítulos.

Os outros efeitos interessantes induzidos pela administração do guaraná como sua ação moduladora sobre as enzimas do citocromo p450, seu efeito protetor sobre o DNA, além dos seus efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos foram elucidados e serão descritos nos capítulos a seguir.

Capítulo 3

**Objetivos e
Delineamento
Experimental**

3 OBJETIVOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.1 OBJETIVOS

Os objetivos gerais foram:

- Avaliar os efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos do guaraná, *Paullinia cupana Mart var. sorbilis*, em modelos experimentais realizados em camundongos e em cultura de células;
- Estudar o modo de ação e possíveis mecanismos responsáveis pelos efeitos do guaraná, *Paullinia cupana Mart var. sorbilis*.

3.1.1 Objetivos específicos

Especificamente os objetivos foram determinados de acordo com cada modelo experimental utilizado, sendo estes descritos abaixo:

- Avaliar o efeito quimiopreventivo do guaraná sobre o dano de DNA induzido pelo carcinógeno DEN em camundongos;
- Avaliar o efeito quimiopreventivo do guaraná sobre a carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK em camundongos;
- Avaliar o efeito antineoplásico do guaraná sobre as metástases pulmonares de células de melanoma B16/f10 em camundongos;

- Avaliar o efeito antineoplásico do guaraná sobre o tumor ascítico de Ehrlich em camundongos;
- Avaliar o efeito antitumoral de dois extratos diferentes de guaraná sobre os cultivos celulares de células imortalizadas não transformadas epiteliais de pulmão de camundongos (E10) e células tumorais de pulmão de camundongos (E9);
- Avaliar os efeitos da administração de guaraná e cafeína sobre a ativação do receptor nuclear de metabolismo, CAR, em camundongos;
- Avaliar os efeitos da Conexina43 sobre a tumorigênese pulmonar induzida pelo NNK em camundongos.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Nesta seção será comentada a seqüência experimental utilizada nesta tese. Porém para facilitar a compreensão dos experimentos, devemos lembrar de conceitos descritos no capítulo 1 sobre as diferentes fases as quais a carcinogênese é dividida. Nosso intuito foi verificar os efeitos do guaraná sobre as diversas fases do processo carcinogênico, desde a fase de iniciação que compreende a primeira alteração (geralmente genotóxica), passando pela fase de promoção e progressão onde se observa a expansão clonal das células tumorais culminando no acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que levam a seleção de células com maior capacidade maligna. Posteriormente, utilizamos experimentos *in vivo* e *in vitro* para verificar os efeitos do guaraná sobre as células já transformadas e malignas. Além dos efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos do guaraná, caracterizamos seu efeito e da cafeína sobre a indução enzimática hepática de diversas enzimas do citocromo p450, e a expressão de diversos receptores considerados “chave” nas alterações moleculares induzidas por xenobióticos.

Por fim, avaliamos a função da Conexina43 sobre a carcinogênese pulmonar induzida por uma nitrosamina do tabaco, procurando caracterizar uma possível via importante de ação do guaraná.

3.2.1 Ação do guaraná na fase de iniciação

Para avaliarmos os efeitos do guaraná nesta fase, estudamos seus efeitos sobre as lesões de DNA induzidas por um carcinógeno químico, a Dietilnitrosamina. Na figura 3.1, este experimento é denominado como “A” e seus resultados, discussão e conclusão estão descritos no capítulo 4.

3.2.2 Ação do guaraná nas fases de promoção e progressão

Para avaliarmos a ação quimiopreventiva do guaraná, utilizamos um modelo experimental de carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK, uma nitrosamina do tabaco em camundongos (Experimento B na figura 3.1). Este modelo foi baseado no trabalho de Hecht e colaboradores (HECHT et al., 1989) com algumas modificações. Este experimento é descrito no capítulo 5.

3.2.3 Função da conexina43 sobre a carcinogênese pulmonar

Além dos experimentos onde analisamos a ação do guaraná em modelos experimentais, foram realizados outros, nos quais avaliamos a função da Conexina43 sobre o desenvolvimento do processo carcinogênico induzido pelo NNK em camundongos (Experimento C na figura 3.1 e no capítulo 6). Desta maneira, foram utilizados camundongos que já nascem com a deleção em um dos alelos da Conexina43 e, assim, pode-se considerar que este modelo experimental permitiu avaliar a ação da Conexina43 durante todas as fases da carcinogênese induzida pelo NNK, já que observamos lesões malignas em alguns animais ao fim do experimento.

3.2.4 Ação do guaraná como agente antineoplásico

Para avaliarmos os efeitos do guaraná nesta fase da carcinogênese, utilizamos três modelos experimentais, sendo dois em animais e outro em cultura de células. No primeiro experimento em animais utilizamos o modelo de disseminação hematogênica de células de melanoma B16/f10 que se alojam nos pulmões (Experimento D na figura 3.1 e no capítulo 7). Além disso, avaliamos a ação do guaraná sobre o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos (Experimento E na figura 3.1 e capítulo 8). Já *in vitro*, avaliamos a

ação de extratos do guaraná sobre o crescimento das culturas celulares E9 e E10, sendo uma linhagem tumoral (E9) e a outra apenas imortalizada (E10). Estas linhagens são oriundas de pulmão de camundongos (Experimento F na figura 3.1 e no capítulo 9).

3.2.5 Efeitos do guaraná sobre a ativação do receptor nuclear CAR

Neste capítulo avaliamos a ação do guaraná e da cafeína sobre a ativação dos principais receptores de metabolismo e biotransformação e de alguns de seus genes alvo. Além disso, discutimos a possível função destes efeitos sobre a carcinogênese (Capítulo 10). Por fim, no capítulo 11 discute-se a importância para a sociedade da ativação destes receptores por plantas com potencial terapêutico e suas potenciais interações medicamentosas.

Figura 3.1 – Delineamento experimental correlacionado com as diferentes fases da carcinogênese. Experimento A: Capítulo 4; Experimento B: Capítulo 5; Experimento C: Capítulo 6; Experimento D: Capítulo 7; Experimento E: Capítulo 8 e; Experimento F: Capítulo 9

Capítulo 4

Efeito quimiopreventivo do guaraná sobre o dano de DNA

*Parcialmente submetido à publicação como “Guarana
(Paullinia cupana) modulated antioxidant and
cytochrome p450 enzymes to prevent carcinogen
induced DNA-damage in mice liver”.*

4 O Guaraná (*Paullinia cupana*) Modula As Enzimas Antioxidantes E Do Citocromo P450 Prevenindo O Dano De DNA Induzido Por Carcinógeno No Fígado De Camundongos

Heidge Fukumasu^a, Andréia Oliveira Latorre^a, José Luis Avanzo^a, Tereza Cristina da Silva^a, Silvana Marina Piccoli Pugine^b, Mariza Pires de Melo^b, Luciana C. Cunha^a, Mauricio Yonamine^c, Kurapati Venkata Kesava Rao^a, Maria Lucia Zaidan-Dagli^a

^a Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, São Paulo, SP, Brasil

^b Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP, Pirassununga, SP, Brasil

^c Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

Atualmente, as bases científicas para a bioatividade e os mecanismos envolvidos na ação dos agentes quimiopreventivos são em grande parte incompletos ou até mesmo desconhecidos. Devido a isto, neste estudo, nós reportamos os efeitos protetores do guaraná sobre o estresse genotóxico induzido pela Dietilnitrosamina (DEN). Para isto, utilizamos camundongos fêmeas da linhagem BALB/c que receberam o guaraná em três doses por 15 dias (100, 1000 e 2000 mg/kg, por gavagem). No dia 15, os animais foram submetidos à DEN (160 mg/kg, I.P.) e eutanasiados 4 horas depois. O peso corpóreo e do fígado foram determinados e amostras de fígado e soro foram congeladas em nitrogênio líquido. Além disto, analisamos no soro dos animais as seguintes variáveis: alanina-aminotransferase (ALT), gama-glutamyltransferase (GGT), uréia, colesterol, triglicérides, proteínas totais e albumina. Adicionalmente, avaliamos a degradação do DNA (DNA *smear*), a atividade das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutathione redutase) e a expressão do mRNA de enzimas do citocromo p450 (CYP1A2, CYP2A5, CYP2B10, CYP2E1 e CYP3A11), das enzimas antioxidantes e de MDM2. Caracterizamos também a expressão das formas alternativas expressas de MDM2. Assim, pôde-se observar que quatro horas após a administração DEN, o dano de DNA e GGT aumentaram significativamente, sendo que o tratamento prévio com o guaraná nas três doses diminuiu estes efeitos. No que concerne aos mecanismos responsáveis por estes efeitos, o guaraná (1000mg/kg) apresentou atividade antioxidante *in vivo*, por degradar principalmente os radicais superóxido, uma vez que, o tratamento com guaraná aumentou a atividade da Superóxido Dismutase (SOD) sem alterar sua expressão. Em relação às enzimas do citocromo p450, observamos que o guaraná induziu alterações nos níveis de expressão de algumas destas (CYP1A2, CYP2A5 e CYP3A11), entretanto, não se pode argumentar que o efeito protetor é devido à alteração na biotransformação da DEN, já que não analisamos os níveis protéicos e de atividade destas enzimas. Finalmente, concluímos que o guaraná tem efeito protetor contra o dano de DNA induzido pela DEN no fígado de camundongos e que este efeito ocorre em parte devido a sua capacidade antioxidante, degradando principalmente os radicais superóxido que são formados durante a biotransformação da DEN.

4.1 INTRODUÇÃO

Nos anos recentes, atenção considerável tem sido dada para identificar agentes naturais quimiopreventivos contra o câncer, presentes na dieta ou em plantas medicinais. É sabido que alguns fitoquímicos podem controlar o processo carcinogênico bloqueando os efeitos adversos dos carcinógenos, ou suprimindo a transformação maligna das células pré-neoplásicas (SURH, 2003b). Assim, entre os alimentos que compõem a dieta humana, muitas substâncias naturais já foram identificadas como potenciais agentes quimiopreventivos, e, além disto, sabe-se que o consumo de grandes quantidades de vegetais e frutas pode prevenir o desenvolvimento de cânceres (SPORN; SUH, 2002a).

A carcinogênese é um processo com múltiplas fases sendo que cada um destes passos envolve alterações genéticas que direcionam a transformação progressiva das células normais em derivados altamente malignos (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000). Embora não esteja claro nesta afirmação, estas alterações também podem ocorrer como eventos epigenéticos, como por exemplo, a hipermetilação de regiões promotoras de genes ou a deacetilação das histonas (JONES; BAYLIN, 2002). Ao se considerar que estas alterações genéticas levam ao desenvolvimento do câncer, o dano de DNA é considerado o primeiro passo da carcinogênese (POIRIER, 2004a) porque pode gerar mutações e/ou quebras das fitas de DNA. Desta maneira, é aceito mundialmente que carcinógenos químicos como a Dietilnitrosamina (DEN), podem gerar adutos no DNA, ou induzir outras modificações no DNA como ligações cruzadas (*cross-linking*), quebra, rearranjos cromossomais e deleções (POIRIER, 2004a). Geralmente, os carcinógenos químicos genotóxicos são divididos em diretos ou indiretos. Esta classificação se baseia na necessidade ou não destas substâncias serem biotransformadas para se tornarem carcinogênicas. Esta biotransformação ocorre principalmente pelas enzimas do sistema de monoxigenases do citocromo p450, sendo que este processo leva a formação das substâncias que formam adutos e também a geração de espécies reativas de oxigênio, as quais também podem interagir com o DNA e levar as alterações mencionadas anteriormente.

Deste modo, é fundamental o aumento no conhecimento de fitoquímicos que possam controlar o processo carcinogênico bloqueando os efeitos adversos dos diferentes carcinógenos a que todos estão expostos ao longo da vida. Neste sentido, pode-se destacar

a *Paullinia cupana*, também conhecida como guaraná, uma planta brasileira que cresce originalmente na região de Maués, na Amazônia brasileira (HENMAN, 1982a). Atualmente é consumida mundialmente como substância tônica e estimulante, sendo que trabalhos publicados previamente demonstraram que o guaraná possui um potente efeito antioxidante *in vitro* (MATTEI et al., 1998b), tem um efeito antidepressivo quando administrado por longos períodos (OTOBONE et al., 2007) e é bactericida (BASILE et al., 2005). Além disso, trabalhos prévios produzidos em nosso laboratório demonstraram que o guaraná apresentou efeito quimiopreventivo em modelo de hepatocarcinogênese induzida pela DEN em camundongos (FUKUMASU et al., 2006b) e preveniu o dano de DNA induzido pela DEN no fígado de camundongos (FUKUMASU et al., 2006a). Naquele momento foi possível apenas sugerir os possíveis mecanismos moleculares que o guaraná gerava nos fígados dos animais para induzir o efeito protetor. Portanto, neste trabalho estudamos novamente o efeito protetor do guaraná sobre o dano de DNA induzido pela DEN com ênfase no estresse oxidativo gerado pela DEN e em enzimas relacionadas à sua biotransformação. Assim, reportamos que o guaraná atua como um agente protetor sobre o dano induzido pela DEN, um carcinógeno hepático muito potente principalmente pela sua atividade antioxidante, por aumentar a atividade da superóxido-dismutase. Além disso, observamos que o tratamento com guaraná modula a expressão de algumas enzimas do citocromo p450, que podem também serem responsáveis pelos efeitos encontrados.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Animais

Cem (100) camundongos fêmeas BALB/c com dois meses de idade criados e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP foram utilizados neste estudo. Estes foram mantidos num ciclo de claro-escuro de 12 horas, com condições controladas de temperatura ($20 \pm 4^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa ($55 \pm 10\%$). Todos os animais tiveram acesso livre à ração (NUVILAB – CR1®, Nuvital Nutrientes LTDA) e água filtrada. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram realizados seguindo as diretrizes internacionais (NIH, 1985) de bem-estar animal e foram revisados e aprovados pelo comitê de Bioética da FMVZ-USP.

4.2.2 *Paullinia cupana*

O guaraná foi gentilmente cedido pela Empresa Brasileira de Agropecuária (EMBRAPA) Amazônia Ocidental e foi mantido em condições secas à temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$ até a administração aos animais. As três doses de guaraná (100, 1000 e 2000 mg/kg) foram diluídas em 0,2ml de água filtrada e administradas diariamente (uma única vez por dia) por gavagem. Os animais do grupo controle receberam apenas água por gavagem. O conteúdo de cafeína na maior dose de guaraná administrada aos animais (2000 mg/kg) era equivalente a quantidade que um consumidor ávido de café ingere diariamente (aproximadamente 8 xícaras de café), já que a quantidade média no café é de 135 mg (EROWID, 2007).

4.2.3 Protocolo experimental

Os 100 animais foram separados aleatoriamente em 4 grupos iguais: A (controle – 0mg/kg de *P.cupana*); B (100mg/kg *P.cupana*); C (1000mg/kg *P.cupana*) e; D (2000mg/kg *P.cupana*). Os animais foram tratados uma vez por dia por 15 dias com as diferentes doses de guaraná. No décimo quinto dia, 13 animais de cada grupo receberam uma injeção de DEN (160 mg/kg, em 200 µl de solução salina 0,9% estéril, intraperitonealmente), sendo que os restantes foram injetados apenas com solução salina. Após 4 horas, todos os camundongos foram humanamente eutanasiados por anestesia profunda com Tiopental (250mg/kg) e, em seguida, foram pesados e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, as quais foram mantidas a temperatura ambiente por pelo menos 45 minutos para formação de coágulo. Após este período, as amostras de sangue foram centrifugadas a 4000 rpm, por 10 minutos para melhor separação do soro, o qual foi então preservado à -20°C até sua análise. Além disso, os fígados foram coletados, pesados e rapidamente congelados em nitrogênio líquido, sendo mantidos à -80°C até sua utilização.

4.2.4 Análises do soro

As análises bioquímicas de Alanina-aminotransferase, gama-glutamilttransferase, proteínas totais, albumina, colesterol, triglicérides e uréia foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante (CELM, São Paulo, Brasil).

4.2.5 Atividade da catalase, glutathiona-redutase e superóxido-dismutase

As atividades destas enzimas foram analisadas conforme descrito previamente (PUGINE et al., 2007). O meio de extração utilizado para a mensuração da atividade total da superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona redutase (GRED), foi tampão PBS

(10 mM, pH 7,4). O total da atividade da SOD foi determinado com base no seu efeito inibitório na taxa de redução dependente de superóxido do azul de nitro tetrazólio pela enzima oxidase xantina-xantina (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971) e a leitura feita a 550 nm. Já a atividade da catalase foi feita a 240 nm, após a redução com peróxido de hidrogênio (BEERS; SIZER, 1952). A atividade da glutathione redutase foi determinada medindo-se a taxa de oxidação de NADPH a 340 nm simultaneamente à redução de glutathione oxidada (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). Todas as medidas espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro Beckman–DU70.

4.2.6 Quantificação da fragmentação de DNA (técnica do DNA *smear*)

Para verificar a extensão do dano de DNA, utilizou-se a técnica de fragmentação de DNA conforme descrita anteriormente por nosso grupo (FUKUMASU et al., 2006a). Brevemente, esta técnica consiste em realizar a separação eletroforética de todo DNA genômico extraído de um tecido num gel de agarose à 1,2%. Primeiramente, as amostras de fígado congeladas (cerca de 40mg) foram maceradas em solução de lise (NaCl 0.1 M, tris–HCl 0.05 M, EDTA 0.1 M, 0.49 mg protease K/ml, SDS 1%) e incubadas por 2 horas à 65°C. Após este período, as amostras foram centrifugadas (10000 rpm à 4°C, por 20 minutos) e o sobrenadante coletado. Adicionou-se etanol à 70% gelado (duas vezes o volume do sobrenadante) e também acetato de sódio gelado (3 M, 10% do volume total). Então, a amostra foi gentilmente homogeneizada até que o DNA formasse a “medusa”, sendo coletada com auxílio de uma ponteira de micropipeta. Este DNA foi lavado com etanol (70%, 500µl à 4°C) e secado completamente à temperatura ambiente. Finalmente as amostras foram dissolvidas em 50 µl de tampão Tris-EDTA (TE, 10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA). Após esta etapa, o DNA genômico foi quantificado à 260 nm em biofotômetro (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Para proceder a eletroforese, três microgramas de DNA genômico foram aplicados em cada poço no gel de 1,2% de agarose e a eletroforese realizada à 60 V por uma hora e meia. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio (50µg/100 ml) e analisado sobre luz ultravioleta utilizando o sistema *Image Master VDS-CL* (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

4.2.7 Extração de RNA e confecção do DNA complementar

A extração de RNA do fígado dos camundongos foi realizada utilizando-se o kit *RNA Perfect Mini Kit* (Eppendorf, Alemanha), seguindo-se as instruções do fabricante. Então o RNA foi quantificado à 260 e 280 nm, sendo que as amostras que não tivessem razão A260/A280 por volta de 2,0 foram consideradas degradadas e excluídas da análise no gel de agarose-formamida. As amostras selecionadas foram então tratadas com enzima DNase (livre de RNases, Roche Applied Science, Indianápolis, EUA) e transcritas reversamente (Superscript II, Invitrogen, Califórnia, EUA) utilizando-se primers Oligo-DT (Invitrogen), para uma concentração final de 45 ng/μl.

4.2.8 Análise da expressão gênica semi-quantitativa

As reações de Polimerase em cadeia (PCR) em tempo real (qPCR) foram conduzidas para os seguintes genes, com primers específicos:

Hipoxantina ribosil-transferase (HPRT, NM_013556), produto estimado de 259 pares de bases (pb):

5' TGTGTGTTGGATATGCCCTTG 3'

5' AATGTCAGTTGCTGCGTCC 3'

CYP1A2 (NM_009993), produto estimado de 440pb:

5' GGTGGCTAACGTCATTGGTG 3'

5' TCTTCCTCTGCACGTTAGGC 3'

CYP2A5 (NM_007812), produto estimado em 163pb:

5' TGGGAAGGGGAAGAGAGTTT 3'

5' AATCTACCCAAGGCCAAAGC 3'

CYP2B10 (NM_009999), produto estimado em 244pb:

5' CCTGTGGTTATGCTGTGTGG 3'

5' CCACTAAACATTGGGCTTCC 3'

CYP2E1 (NM_021282), produto estimado de 220pb:

5' CATGGCTACAAGGCTGTCAA 3'

5' GGAAGTGTGCCTCTCTTTGG 3'

CYP3A11 (NM_984519), com produto estimado de 114pb:

5' AGGGAAGCATTGAGGAGGAT 3'

5' CCCAGGTTTCCAGTGAGAGA 3'

Catalase (NM_009804.1), produto estimado de 305pb:

5' GTCCTCAGGTGCGGACATT 3'

5' TCCATCCAGCGTTGATTACA 3'

Superóxido-dismutase (NM_011434.1), produto estimado de 142pb:

5' GCCAATGTGTCCATTGAAGA 3'

5' GTTTACTGCGCAATCCCAAT 3'

Glutathione-peroxidase-1 (NM_008160.2), produto estimado de 184pb:

5' CGGGACTACACCGAGATGAA 3'

5' AAGGTAAAGAGCGGGTGAGC 3'

Glutathione-reductase (NM_010344.3), produto estimado de 380 pb:

5' AAAACCAACCCCGGATTAAC 3'

5' AAAACCAACCCCGGATTAAC 3'

MDM2 (NM_010786.2), produto estimado de 1278pb:

5' GCCAATGTGCAATACCAACA 3'

5' GATCACACATGGTTCGATGG 3'

O gene MDM2 apresenta duas isoformas descritas após o estresse genotóxico (CHANDLER et al., 2006), sendo que este par de primers quantifica ambas isoformas. Todos estes primers (IDT Technologies, Coralville, EUA) foram desenhados seguindo as normativas para análise por PCR em tempo real, sendo utilizados os programas *Primer-3* (ROZEN; SKALETSKY, 2006) para confecção, o programa *Autodimer* (VALLONE; BUTLER, 2004) para verificação de auto-dímeros e *hairpins* e posteriormente foram analisados no programa BLAST para verificar a ausência de alinhamentos locais com DNA ou outras sequências de RNA mensageiro (ALTSCHUL et al., 1990). Para todas as análises de expressão gênica, juntou-se igualmente o DNA complementar (cDNA) de três animais diferentes do mesmo grupo experimental sendo que estas análises foram realizadas em duplicata. Utilizou-se a técnica para PCR em tempo real com SYBR green (SYBR greener, Invitrogen) sendo realizada no sistema ABIPrism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, EUA), seguindo-se as indicações dos fabricantes. O controle endógeno para estas reações foi o gene HPRT, considerado por outros como o melhor gene único para se utilizar como referência (DE KOK et al., 2005). Por fim, as análises de expressão gênica foram realizadas pelo método de $\Delta\Delta CT$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.2.9 Avaliação do splicing alternativo de MDM2

De acordo com Chandler et al. (2006), após o estresse genotóxico em camundongos, o gene MDM2 apresenta duas isoformas oriundas de splicing alternativo denominadas MS1 (803pb) e MS2 (580pb). O transcrito MDM2 completo (1318pb) é oriundo do produto dos exons 3 ao 12. Por outro lado, MS1 não apresenta os exons 5, 6, 8, 10 e 11; e MS2 não tem desde o exon 5 ao 11. Devido ao desenho dos primers utilizados neste experimento, foi possível detectar as três variantes expressas do gene MDM2. Para isto, utilizou-se 1 μ g de cDNA de três animais diferentes do mesmo grupo para a reação de PCR que ocorreu com os seguintes parâmetros:

- 1 ciclo de 2 minutos a 94°C para abrir as fitas de DNA;
- 45 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C (para anelamento dos primers) e 1 minuto a 72°C (para extensão do produto)

- 1 ciclo de 4 minutos a 72°C (para extensão final)

Foram realizados 45 ciclos porque considerou-se esta técnica meramente qualitativa, já que a expressão de MDM2 é geralmente baixa e sua quantificação já fora realizada pela técnica de PCR em tempo real.

4.2.10 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Para a análise de mais de dois grupos, foi utilizada a ANOVA de uma via e o teste T não pareado para comparações entre dois grupos apenas. Diferenças significativas foram consideradas com $p < 0,05$.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Caracterização da hepatotoxicidade da dietilnitrosamina

A exposição à DEN induziu severas alterações no que condiz a fisiologia hepática apenas 4 horas após a administração. Conforme publicado previamente por nosso grupo, a dose de 160mg/kg induz alterações histopatológicas as quais incluem degeneração vacuolar dos hepatócitos. Neste trabalho, demonstramos novamente que a administração da DEN leva a um extenso dano de DNA (Figura 4.1). A análise sérica de GGT (como um indicador de dano ao parênquima hepático) corrobora com este resultado ($p < 0,0001$, Figura 4.2), porém os níveis de ALT não foram diferentes significativamente após 4 horas da exposição à DEN ($p = 0,1587$, Figura 4.3). É sabido que o dano de DNA induzido por carcinógeno ativa a maquinaria de reparo de DNA e conseqüentemente o fator de transcrição p53 (STIEWE, 2007). A proteína MDM2 é um transcrito direto de p53 e neste experimento nós demonstramos que ocorre um aumento exponencial da expressão de MDM2 (1970%) após 4 horas da administração da nitrosamina (Figura 4.4).

Figura 4.1 – Análise do dano de DNA induzido pela Dietilnitrosamina e parcialmente prevenido pelo tratamento prévio com guaraná. (A) amostra de animal do grupo controle sem receber a DEN; (A') amostra de animal do grupo controle que recebeu a DEN (160mg/kg, I.P.) e foi eutanasiado 4 horas depois; (B', C', D') respectivamente amostras de animais que foram tratados com 100, 1000 e 2000 mg/kg de guaraná e receberam a DEN (160mg/kg, I.P.), sendo eutanasiados após 4 horas. Esta análise foi realizada em três animais por grupo, sendo esta imagem representativa do efeito observado

Figura 4.2 – Análise dos níveis de GGT no soro dos animais tratados com Dietilnitrosamina. Os animais foram tratados por 15 dias com água por gavagem diariamente. A DEN foi administrada e após 4 horas os animais foram eutanasiados. (A) os animais receberam uma injeção de solução salina apenas; (A') os animais receberam a DEN (160 mg/kg, I.P.); * - $p < 0,0001$

Figura 4.3 – Análise dos níveis de ALT no soro dos animais tratados com Dietilnitrosamina. Os animais foram tratados por 15 dias com água por gavagem diariamente. A DEN foi administrada e após 4 horas os animais foram eutanasiados. (A) os animais receberam uma injeção de solução salina apenas; (A') os animais receberam a DEN (160 mg/kg, I.P.)

Figura 4.4 – Análise da expressão de MDM2 e de suas isoformas após o estresse genotóxico induzido pela Dietilnitrosamina. Figura 4A representa a análise da expressão de MDM2 por PCR em tempo real. Figura 4B representa a análise das isoformas de MDM2 por PCR transcriptase reversa. Os animais foram administrados diariamente por gavagem com 100mg/kg (B), 1000 mg/kg (C) e 2000 mg/kg (D) de guaraná, sendo que os animais do grupo controle (A) receberam apenas água. Posteriormente 13 animais de cada grupo receberam a DEN (160 mg/kg; I.P.) e foram eutanasiados 4 horas depois (A';B';C';D'). * - $p < 0,001$; ** - $p < 0,05$

4.3.2 Hepatotoxicidade da *P.cupana* na dose de 2000 mg/kg

O ganho de peso corpóreo foi avaliado durante o experimento, sendo que o tratamento com guaraná não levou a alterações significativas nas três doses testadas (Figura 4.5). Por outro lado, o tratamento com o guaraná levou a um aumento no peso relativo do fígado ($p < 0,0001$; Figura 4.6) nas doses de 1000 e 2000 mg/kg (grupos C e D respectivamente), além de levar a um aumento significativo em ALT ($p = 0,0206$, Figura 4.7) e GGT ($p = 0,0145$; Figura 4.8) na dose de 2000 mg/kg. Em resumo, estas observações nos indicam que a dose mais alta de guaraná induziu efeito hepatotóxico neste modelo experimental. Após determinar que a dose de 2000 mg/kg foi tóxica neste experimento, nós realizamos as análises subseqüentes apenas com as doses de 100 e 1000 mg/kg.

Figura 4.5 – Ganho de peso corpóreo após 15 dias de tratamento com guaraná. Os animais foram administrados diariamente por gavagem com de 100mg/kg (B), 1000 mg/kg (C) e 2000 mg/kg (D) de guaraná, sendo que os animais do grupo controle (A) receberam apenas água. Foram utilizados 25 animais por grupo. Não há diferença significativa entre os grupos

Figura 4.6 – Peso Relativo do Fígado após tratamento com guaraná. Os animais foram administrados diariamente por gavagem com de 100mg/kg (B), 1000 mg/kg (C) e 2000 mg/kg (D) de guaraná, sendo que os animais do grupo controle (A) receberam apenas água. Foram utilizados 12 animais por grupo. “a” – $p < 0,01$ em relação ao grupo controle

Figura 4.7 – Análise dos níveis de ALT no soro dos animais tratados com guaraná. Os animais foram administrados diariamente por gavagem com de 100mg/kg (B), 1000 mg/kg (C) e 2000 mg/kg (D) de guaraná, sendo que os animais do grupo controle (A) receberam apenas água. Foram utilizados 12 animais por grupo. “a” – $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

Figura 4.8 – Análise dos níveis de GGT no soro dos animais tratados com guaraná. Os animais foram administrados diariamente por gavagem com de 100mg/kg (B), 1000 mg/kg (C) e 2000 mg/kg (D) de guaraná, sendo que os animais do grupo controle (A) receberam apenas água. Foram utilizados 12 animais por grupo. “a” – $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

4.3.5 O guaraná diminui o dano de DNA e a expressão de MDM2 induzidos pela dietilnitrosamina

O tratamento com guaraná por 15 dias diminuiu o dano de DNA induzido pela administração da DEN (Figura 4.1 e FUKUMASU et al., 2006a). Além disso, o aumento na expressão de MDM2 induzida pela exposição a este carcinógeno foi menor nos animais tratados previamente com 100 e 1000 mg/kg de guaraná (Figura 4.4; CT+DEN (A') = $7190,98 \pm 373,43$; 100mg/kg+DEN (B') = $185492 \pm 186,06$; 1000mg/kg+DEN (C') = $4524,45 \pm 338,97$; $p < 0.001$), indicando um efeito protetor do guaraná contra o dano de DNA induzido pela DEN. Adicionalmente, as isoformas alternativas expressas de MDM2, MS1 e MS2 (CHANDLER et al., 2006) foram notadas em todos animais tratados com a DEN, sendo que aparentemente as bandas das isoformas são menos evidentes nos animais tratados com guaraná (Figura 4.4). Além disso, o tratamento com guaraná teria efeito sobre o aumento dos níveis de ALT ($p = 0,0787$) e GGT ($p = 0,0758$) no soro, já que se observa uma tendência dose-dependente (valores $p < 0,1$; Figura 4.9).

Figura 4.9 – Alteração dos níveis de ALT e GGT séricos após a administração da Dietilnitrosamina em animais pré-tratados com guaraná. Os animais foram administrados diariamente por gavagem com 100mg/kg (B) e 1000 mg/kg (C) de guaraná, sendo que os animais do grupo controle (A) receberam apenas água. Posteriormente 13 animais de cada grupo receberam a DEN (160 mg/kg; I.P.) e foram eutanasiados 4 horas depois

4.3.6 A capacidade antioxidante do guaraná aumenta a atividade da superóxido dismutase e glutathione-redutase

Após 15 dias tratando os animais com guaraná uma vez ao dia, os camundongos tratados com 1000mg/kg apresentaram um aumento na atividade da SOD hepática ($p=0,0362$; Figura 4.10) além de ter sua expressão diminuída ($p=0,0025$; Figura 4.10), indicando que o guaraná possui substâncias antioxidantes que degradam os radicais superóxido (O_2^-). Acompanhando estes resultados, foi notada também uma tendência ao aumento na expressão da GRED na maior dose de guaraná ($p=0,0727$; Figura 4.10) além de observarmos uma diminuição da expressão da glutathione redutase após o tratamento com ambas as doses de guaraná ($p=0,0014$; Figura 4.10). Por outro lado, o guaraná não alterou nem a expressão nem a atividade da Catalase (Figura 4.10).

Figura 4.10 – Atividade e expressão de Superóxido Dismutase, Glutathiona Redutase e Catalase no fígado de camundongos tratados com guaraná. Os animais foram administrados diariamente por gavagem com 100mg/kg (B) e 1000 mg/kg (C) de guaraná, sendo que os animais do grupo controle (A) receberam apenas água. Foram injetados com solução salina e passadas 4 horas, foram eutanasiados. * - $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.3.7 O guaraná altera a expressão de enzimas do citocromo p450

Mesmo tendo sido demonstrado que o tratamento com guaraná protege contra o dano de DNA provavelmente pelo seu efeito antioxidante, seria interessante avaliar o padrão de expressão de algumas das diferentes enzimas do citocromo p450 (Figura 4.11) pois a biotransformação da DEN poderia estar alterada. Notamos um aumento na expressão da CYP1A2 de 778% na dose de 1000 mg/kg ($p=0,0077$), o qual ocorreu provavelmente pelo conteúdo de cafeína no guaraná. Também foi observado um aumento na expressão da CYP3A11 (258%; $p=0,0001$) na mesma dose. Porém, quanto à CYP2A5, observamos efeitos contraditórios, pois na dose de 100 mg/kg ocorreu um aumento e na dose de 1000 mg/kg uma diminuição da expressão ($p=0,004$). Nas outras duas enzimas avaliadas, CYP2B10 e CYP2E1, não observamos alterações quanto a expressão de seus mRNAs. Vale lembrar que nós não realizamos até o momento a análise da atividade destas enzimas do citocromo p450, logo, não se pode assegurar que estas alterações nos níveis de expressão tenham algum valor quanto à proteção ao dano de DNA induzido pela DEN.

Figura 4.11 – Expressão das enzimas do citocromo p450 em fígado de camundongos tratados com guaraná. Os animais foram administrados diariamente por gavagem com 100mg/kg (B) e 1000 mg/kg (C) de guaraná, sendo que os animais do grupo controle (A) receberam apenas água. Foram injetados com solução salina e passadas 4 horas, foram eutanasiados. * - $p < 0,05$; ** $P < 0,01$

4.4 DISCUSSÃO

Desde 1775 quando Percival Pott publicou seu trabalho pioneiro sobre câncer de escroto em limpadores de chaminé ingleses (POTTER, 1963), mais tarde sendo demonstrado que estes efeitos ocorreram devido à intensa exposição a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), diversas evidências indicam que a exposição prolongada aos carcinógenos químicos induz o câncer (POIRIER, 2004b). Estas substâncias geralmente são biotransformadas por enzimas do citocromo p450 em derivados mais eletrofílicos, levando ao intenso desregulamento da homeostase celular. Deve se levar em conta, também, que as enzimas antioxidantes como a SOD, CAT ou as enzimas do complexo glutaciona são responsáveis por degradar as espécies reativas de oxigênio formadas durante a biotransformação dos carcinógenos químicos. Aqui, nós reportamos que o efeito antioxidante do guaraná *in vivo*, é principalmente pelo aumento da atividade da SOD e sugerimos que esta propriedade é pelo menos em parte responsável pelo efeito protetor do guaraná sobre a hepatotoxicidade da DEN em camundongos.

A quimioprevenção do câncer, primeiramente estabelecida por Michael Sporn no início dos anos 80 (SPORN, 1980), consiste nos meios para controlar o câncer nos quais a ocorrência da doença é prevenida pela administração de um ou mais compostos químicos. De acordo com este conceito, as plantas são fontes valiosas para este propósito, já que diversos trabalhos vêm demonstrando que diferentes plantas são quimiopreventivas ou mesmo quimioterápicas para o câncer (SURH, 2003a). Trabalhos prévios do nosso laboratório indicaram que o guaraná tem efeito quimiopreventivo na hepatocarcinogênese química induzida pela DEN, diminuindo a proliferação celular (FUKUMASU et al., 2006b). Relacionado à terapia do câncer, o guaraná diminuiu a proliferação celular e aumentou a apoptose de metástases pulmonares de melanoma (FUKUMASU et al., 2008). Além disto, demonstramos que o guaraná aumenta a sobrevivência dos animais com o tumor Ascítico de Ehrlich devido a aumentar a porcentagem das células do tumor de Ehrlich Ascítico na fase G0/G1 do ciclo celular. Este controle da proliferação celular foi correlacionado com a expressão protéica aumentada de p27 (um inibidor universal do ciclo celular) e menor de ciclina D1 (Capítulo 8). Recentemente, demonstramos que o guaraná diminui o dano de DNA

induzido pela DEN (FUKUMASU et al., 2006a) numa dose maior que a usada aqui (2000 mg/kg). No entanto, os mecanismos associados com este fenômeno não eram claros e remanesciam desconhecidos. Neste trabalho, nós demonstramos que a dose de 2000 mg/kg é hepatotóxica para as fêmeas de camundongos da linhagem BALB/c, porém é importante comentar que no trabalho publicado anteriormente, não foi observada qualquer alteração que sugerisse efeito tóxico da dose de guaraná. Além disso, em fêmeas da linhagem C57Bl/6 não se verificou quaisquer efeito tóxico utilizando a mesma dose de guaraná (FUKUMASU et al., 2007). Para explicar estes efeitos, podem ser implicadas duas hipóteses: a primeira é que possivelmente os níveis de algumas substâncias entre as duas partidas de guaraná foram diferentes; a segunda é que este efeito seja variável e possa ocorrer dependendo dos (das linhagens utilizadas) animais utilizados no experimento. Entretanto, evitamos utilizar os animais do grupo 2000 mg/kg, sendo que grande parte das análises foram então realizadas nas duas doses menores. Além disso, é importante salientar que a dose de 1000 mg/kg é possível de ser ingerida por uma pessoa que consuma café avidamente durante o dia, conforme demonstrado na seção de Material e Métodos deste capítulo.

O dano oxidativo nas células apenas ocorre se as espécies reativas de oxigênio (O_2^- , H_2O_2 , OH^-) estiverem em um nível maior que as enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, complexo glutatona, etc) consigam degradar (SIES, 1997). Estudos *in vitro* evidenciaram que o guaraná tem importante capacidade antioxidante (MATTEI et al., 1998a; BASILE et al., 2005). No entanto, ao melhor do nosso conhecimento, nenhum estudo até hoje foi publicado sobre os efeitos antioxidantes do guaraná *in vivo*. Logo, este trabalho demonstrou pela primeira vez que o guaraná apresenta atividade antioxidante em animais, principalmente por aumentar os níveis da SOD (Figura 4.10). Este dado indica que o guaraná possui fitoquímicos que têm ação direta sobre radicais superóxido (O_2^-) degradando-os e desta maneira, diminuí a necessidade da SOD hepática e conseqüentemente aumenta a atividade da SOD no fígado de camundongos. Somando-se a este efeito, é possível inferir que o efeito “anti-superóxido” do guaraná é tão potente que pode até diminuir a expressão do mRNA da SOD, como visto na dose de 1000 mg/kg. De fato, o guaraná aumenta a atividade da SOD, a qual, junto com a catalase, são a primeira defesa contra a toxicidade dos radicais de oxigênio formados pela biotransformação da DEN (KUMAR, R. S. et al., 2007).

A Dietilnitrosamina é um carcinógeno indireto porque precisa ser biotransformada pelo sistema monooxigenase citocromo p450, principalmente por duas enzimas as CYP2E1 e

CYP2A5/6 (YAMAZAKI et al., 1992; CAMUS et al., 1993). Os produtos carcinogênicos são gerados e formam adutos no DNA, levando a mutações pontuais ou quebra do DNA, e conseqüentemente, a instabilidade cromossômica. Nossos resultados corroboram em parte com estes dados, já que o tratamento com guaraná (1000 mg/kg) diminuiu a expressão da CYP2A5. No entanto, é importante salientar que não foi avaliada a atividade de nenhuma monoxigenase neste trabalho, tornando quase impossível para nós afirmar que estes resultados ocorreram devido a alterações na biotransformação da DEN pelas enzimas do citocromo p450. Fica mais interessante escrever aqui que os próximos passos então serão analisar a atividade enzimática e quantificar a expressão destas proteínas com o intuito de melhor entender o mecanismo pelo qual o guaraná induz tal efeito.

O estresse genotóxico leva a diversas alterações na homeostase celular, sendo o dano de DNA uma das mais problemáticas já que pode gerar mutações em genes relacionados ao desenvolvimento de câncer como proto-oncogenes ou genes supressores de tumor. O dano de DNA ativa a maquinaria dependente de p53, estabilizando p53 no núcleo e permitindo que o ciclo celular seja interrompido ou induza a apoptose. Como a ativação ou inativação de p53 regula decisões de vida ou morte celular, um mecanismo muito interessante está envolvido na prevenção de sua ativação errante ao mesmo tempo em que permite respostas rápidas ao estresse (TOLEDO; WAHL, 2006). Aparentemente os fatores centrais nesta regulação, são os efeitos opostos executados pelos inibidores essenciais de p53, como MDM2 e MDM4 (TOLEDO; WAHL, 2006). A proteína MDM2 é uma ubiquitina-ligase responsável por degradar p53 nas células normais, e já foi demonstrada ter sua expressão alterada em diversos tipos de cânceres (BARTEL et al., 2004). O p53 quando induzido pelo estresse genotóxico funciona como um fator de transcrição, que acaba por induzir a expressão de MDM2 também. Porém, neste processo ocorrem alguns splicings alternativos que levam a formação de isoformas como MS1 e MS2 caracterizados por Chandler et al. (2006). Ambos transcritos não têm o domínio de ligação em p53, mas mantêm o domínio COOH-terminal em anel, e são correlacionados com a localização citoplasmática de MDM2. Em nosso trabalho, devido ao desenho dos primers escolhidos por nós, foi possível notar a presença de uma nova isoforma, chamada aqui de “Nova Isoforma” (NI; Figura 4.1). Entretanto, com os primers utilizados é impossível detectar qual ou quais éxons estão ausentes nesta isoforma. Foi interessante notar também que o tratamento com guaraná controlou o aumento na expressão de MDM2 induzida pela administração da DEN.

Com nossos dados, ainda é possível sugerir que o tratamento prévio com a planta diminuiu o splicing alternativo de MDM2, que é causado devido ao estresse genotóxico induzido pela DEN, e isto se correlaciona com o menor dano de DNA demonstrado nos animais tratados previamente com o guaraná.

Levando-se em consideração todos estes dados, é possível concluir que o guaraná tem efeito protetor quando do dano de DNA induzido pela DEN no fígado de camundongos. Este efeito é devido pelo menos em parte pela atividade antioxidante do guaraná, principalmente por degradar os radicais superóxido que são formados durante a biotransformação da DEN. Agora nossos esforços se concentraram na caracterização detalhada destes efeitos gerados pelo guaraná, verificando as possíveis alterações na expressão dos receptores nucleares de metabolismo, como o CAR, PXR, NRF2, AhR e PPAR.

Capítulo 5

Efeito quimiopreventivo do guaraná sobre a carcinogênese pulmonar

A ser publicado sob o título: “Guarana (*Paullinia cupana*) controls the progression of NNK-induced lung carcinogenesis in mice: a role for inhibition of CREB/ATF-1 activation”

- 5 O Guaraná (*Paullinia cupana*) controla a progressão da carcinogênese pulmonar induzida pela 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona em camundongos: um papel para a inibição da ativação de CREB/ATF-1**

Heidge Fukumasu^a, Maria Lucia Zaidan-Dagli^a

^a Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

A necessidade de novas substâncias é urgente no que concerne ao tratamento e prevenção do câncer. Neste sentido, já fora demonstrado que o guaraná (*Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*) apresenta tais efeitos, sendo o efeito quimiopreventivo demonstrado em um modelo de hepatocarcinogênese e o controle do crescimento tumoral demonstrado tanto em metástases de Melanoma B16/f10 como no tumor de Ehrlich em sua forma ascítica *in vivo*. Porém, o câncer de pulmão é o que mais mata pessoas pelo mundo anualmente, sendo que o consumo de tabaco é considerado a maior causa para seu desenvolvimento. Logo, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos quimiopreventivos do guaraná também sobre a carcinogênese pulmonar espontânea e induzida pelo NNK, uma nitrosamina presente no tabaco. Para tal, utilizaram-se fêmeas de camundongo da linhagem A/J com 42 dias de vida as quais foram injetadas com o carcinógeno em dose única (100 ou 200 mg/kg, I.P.) ou apenas solução salina e separadas em três grupos. No dia seguinte e por 20 (modelo espontâneo), 18 (NNK 100mg/kg) ou 52 semanas subseqüentes (NNK 200 mg/kg), os animais receberam o guaraná em pó misturado na ração nas doses de 100 (GA) e 2000 (GB) mg/kg ou apenas a ração em pó (CT). Ao término do período experimental, os animais foram eutanasiados, as lesões pulmonares macroscópicas medidas e contadas, retiradas e fixadas. Foram realizadas as análises histopatológica e morfométrica além das reações de imunoistoquímica para o PCNA e para o fator de transcrição CREB fosforilado na Serina 133 (Fosfo-CREB Ser133) pelo método do DAB-LSAB. Assim, pôde-se observar que o tratamento com guaraná não alterou o ganho de peso dos animais em nenhum dos três experimentos. Da mesma maneira, no experimento de carcinogênese espontânea e no induzido com 100 mg/kg de NNK e tratados por 18 semanas não foram observadas quaisquer diferenças devido ao tratamento com guaraná. Por outro lado, no experimento mais longo, de 52 semanas, todos os animais tratados com NNK apresentaram lesões macroscópicas (CT = $9,3 \pm 5,1$; GA = $12,3 \pm 3,5$; GB = $11,3 \pm 4,0$; $p=0,0604$), sendo que se notou redução na porcentagem das lesões com tamanho maior que 2,5mm no grupo tratado com guaraná (CT = $45,5 \pm 19,6\%$; GA = $38,1 \pm 18,4\%$; GB= $14,5 \pm 9,5\%$; $p<0,0001$). Já as análises histopatológica e morfométrica indicaram que o tratamento com guaraná não alterou o número de lesões microscópicas (lesões/mm²) mas, reduziu a malignidade das lesões pulmonares (CT =

1,7±0,4; GA = 1,6±0,3; GB = 1,5±0,3; p = 0,0424), e o tamanho médio das lesões microscópicas (CT = 0,018 ± 0,013; GA = 0,010 ± 0,003; GB = 0,009 ± 0,005; p = 0,003), corroborando com os efeitos do guaraná sobre as lesões macroscópicas. Além disto, o tratamento com guaraná demonstrou reduzir o número de células PCNA-positivas nas lesões pulmonares, indicando menor estado proliferativo nas lesões presentes nos animais tratados com a planta (CT = 29,95 ± 11,15%, n = 6; GB = 16,61 ± 6,21%, n = 7; p = 0,0221). De acordo com este dado, fomos estudar a ativação do fator de transcrição CREB por imunistoquímica para o CREB/ATF-1 em sua forma fosforilada na Ser133, a qual indica ativação deste fator de transcrição. Foi possível notar que as lesões dos animais tratados com guaraná apresentaram menor quantidade de células positivas para o Fosfo-CREB (CT = 63,9 ± 5,6%, n = 4; GB = 47,0 ± 5,2%, n = 4; p = 0,0286), o que condiz com a menor proliferação celular observada nestes tumores e possivelmente foi responsável por controlar a progressão da carcinogênese induzida pelo NNK. Agora, nossos experimentos irão avaliar quais proteínas fosforilam o CREB nestes tumores de pulmão como p38/MAPK, ERK1/2 e SAPK/JNK 1, 2, 3 e identificar quais destas é/são o(s) alvo(s) responsável(is) por estes efeitos do guaraná.

5.1 INTRODUÇÃO

O câncer de uma forma geral pode ser considerado o maior desafio da medicina atualmente, levando-se em conta que possivelmente esta doença é a que mais mata pessoas no mundo todo e ainda não tem cura na grande maioria das vezes. Nos Estados Unidos, uma em cada quatro pessoas com menos de 85 anos de idade morrem de câncer atualmente (JEMAL et al., 2008). Dentre os diversos tipos de cânceres, o que mais chama a atenção é o de pulmão já que esta neoplasia é a mais freqüente mundialmente, com cerca de 1.200.000 mortes por ano (KAMANGAR; DORES; ANDERSON, 2006). A fumaça do cigarro é considerada o maior fator de risco para este tipo de tumor (ALBERG; BROCK; SAMET, 2005), tendo em vista que os fumantes apresentam cerca de 20 vezes mais chance de desenvolver este câncer que pessoas não fumantes (WARNER, 2005). Mesmo com os avanços no tratamento do câncer nos últimos 30 anos, o ganho na sobrevivência de pacientes com tumor de pulmão foi de apenas 15%, considerado muito baixo (KAMANGAR; DORES; ANDERSON, 2006). Portanto, a terapia convencional é um método insatisfatório para controlar as mortes por câncer de pulmão (KAMANGAR; DORES; ANDERSON, 2006). Desta maneira, a quimioprevenção do câncer de pulmão primário teoricamente seria uma boa opção, porém os ensaios clínicos com diversas substâncias como o Beta-caroteno e o retinol não foram satisfatórios, por vezes até aumentando a incidência em populações de risco como fumantes (OMENN et al., 1994). Logo, a busca por novos agentes quimiopreventivos é de grande importância, sendo as substâncias derivadas de plantas ou outros produtos naturais consideradas uma boa fonte para este propósito.

O guaraná, *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, é um arbusto originário da Amazônia sendo muito utilizado atualmente tanto em refrigerantes como também em medicamentos naturais para perda de peso e estimulantes. Nosso laboratório já demonstrou que o pó obtido de seus frutos apresentou efeito quimiopreventivo em modelo de hepatocarcinogênese (FUKUMASU et al., 2006b) e efeito antitumoral em metástases de melanoma B16/f10 quando estas cresciam no pulmão de camundongos (FUKUMASU et al., 2008). Até o presente momento, fora demonstrado que grande parte destes efeitos se deve a menor taxa de proliferação celular em ambos os modelos, além do aumento na taxa de

apoptose nas metástases pulmonares. Uma das principais vias descritas para controlar o ciclo celular e que conseqüentemente controla os níveis das proteínas importantes para as segundas fases do ciclo celular, como as ciclinas, e os inibidores de kinases dependentes de ciclina é a via de sinalização das MAPK (kinases ativadas por mitógenos) como p38/MAPK, ERK1/2 e SAPK/JNK 1, 2 e 3. Algumas destas kinases têm efeito de aumentar a proliferação celular por fosforilar o fator de transcrição CREB, evento que ativa este fator de transcrição. O CREB é um efector de uma gama diversa de receptores, como os de fatores de crescimento, retinóides, citocinas e prostaglandinas (AGGARWAL et al., 2008). Recentemente, demonstrou-se que o CREB é constitutivamente ativado em diversas linhagens de tumores de pulmão e que tem um papel importante no crescimento e sobrevivência para tumores de pulmão (AGGARWAL et al., 2008). Logo, analisar a expressão desta proteína se torna importante tanto para o tratamento como para a prevenção do câncer de pulmão.

O tabaco, principal constituinte do cigarro, apresenta cerca de 4800 substâncias identificadas, sendo 69 reconhecidamente carcinogênicas (HOFFMANN; HOFFMANN; EL-BAYOUMY, 2001). Dentre estas, as nitrosaminas derivadas de alcalóides do tabaco (nitrosaminas específicas do tabaco, NET) formadas a partir da nicotina (HOFFMANN; LAVOIE; HECHT, 1985), demonstraram ser carcinogênicas em mais de 30 espécies diferentes (HECHT, 1998). Estima-se que a exposição a estas NET é de cerca de 20 µg diariamente em fumantes, sendo importante salientar que esta quantidade é similar a que gera adenocarcinomas em camundongos e outros animais de laboratório (HECHT, 1998). Dentre estas nitrosaminas, a de maior potencial carcinogênico é o NNK (do inglês *Nitrosamine-derived nitrosaminoketone*), o qual é formado durante a cura e processamento do tabaco (HOFFMANN; HECHT, 1985). Em camundongos, o NNK induz lesões pulmonares tanto em linhagens suscetíveis quanto resistentes, com diferenças no número de lesão e no tempo necessário para se desenvolverem (HECHT, 1998). Neste experimento, utilizamos o modelo de aplicação única de NNK aos 42 dias de vida, com algumas modificações (HECHT et al., 1989) e tratamos os animais com duas doses de guaraná por 18 e 52 semanas de vida dos animais. Nosso objetivo foi avaliar se o guaraná teria efeito sobre a carcinogênese pulmonar, principalmente sobre as fases de promoção e progressão e definir quais seriam as vias metabólicas alteradas responsáveis por tal efeito.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Animais

Foram utilizados camundongos A/J fêmeas com 42 dias de vida, que foram criados e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP durante o estudo. Estes foram mantidos num ciclo de claro-escuro de 12 horas, com condições controladas de temperatura ($20 \pm 4^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa ($55 \pm 10\%$). Todos os animais tiveram acesso livre à ração (NUVILAB – CR1®, Nuvital Nutrientes LTDA) em pó e água filtrada. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram realizados seguindo as diretrizes internacionais (NIH, 1985) de bem-estar animal e foram revisados e aprovados pelo comitê de Bioética da FMVZ-USP.

5.2.2 *Paullinia cupana*, moagem e mistura da ração

O pó de guaraná foi gentilmente cedido pela EMBRAPA Amazônia Ocidental, na figura do pesquisador André Atroch. Após sua chegada, este foi acondicionado a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ até sua utilização. Foram usadas duas doses de *P.cupana*: 100 e 2000mg/kg de peso vivo, sendo estas baseadas em outros experimentos previamente realizados pelo nosso grupo. A ração comercial foi adquirida já moída pelo fabricante (Nuvilab®, Nuvital, São Paulo) apresentando granulação aproximada a do pó de guaraná o que impediu os animais de selecionar após a mistura com o guaraná. A mistura foi feita manualmente por cerca de 5 minutos com as respectivas concentrações de *P.cupana*. A ração foi fornecida em comedouros de metal apropriados para ração em pó seguindo modelo já utilizado em nosso laboratório em experimento anterior (FUKUMASU et al., 2006b). Esta era trocada semanalmente independente do consumo dos animais.

5.2.3 Protocolos experimentais

5.2.3.1 Protocolo experimental 1: avaliação dos efeitos do guaraná sobre modelo de carcinogênese espontânea em camundongos A/J: 20 semanas

Neste experimento, foram utilizados 31 camundongos, os quais foram submetidos a um modelo de carcinogênese pulmonar espontânea, já que os animais da linhagem A/J são considerados suscetíveis a este tipo de tumor. Para isto, os animais foram divididos em três grupos iguais? e receberam ração com guaraná após o 42º dia de vida por 20 semanas. Os grupos foram denominados da seguinte maneira (Figura 5.1): “**CT**” que recebeu apenas ração em pó; “**GA**” (100mg/kg *P.cupana*) e “**GB**” (2000mg/kg *P.cupana*) que receberam ração em pó com *P.cupana* nas doses especificadas desde o dia 42 até a eutanásia dos animais, totalizando 20 semanas de tratamento. Após o término do tratamento os animais foram eutanasiados com barbitúrico (Tiopental - 250mg/kg i.p.) sendo a artéria aorta abdominal seccionada, posteriormente os pulmões foram insuflados com fixador apropriado (metacarn – metanol, clorofórmio, ácido acético – 60:30:10) após pinçamento da traquéia. Após a retirada dos pulmões de cada animal, rapidamente foram avaliadas as lesões macroscópicas quanto ao número e ao tamanho. Em seguida, os pulmões foram fixados em metacarn por 8 horas e processados em parafina.

Figura 5.1 – Protocolo experimental de carcinogênese espontânea em camundongos tratados com *P.cupana*. “s” - semanas; “D” - desmame; “E” eutanásia; “CT” – controle. O número entre parênteses é o número de animais por grupo. O grupo **CT** recebeu apenas ração em pó. Os grupos tratados, **GA** (100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e **GB** (2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo) receberam ração em pó com *P.cupana* nas doses especificadas durante todo período experimental

5.2.3.2 Protocolo experimental 2: avaliação dos efeitos do guaraná sobre modelo de carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK em camundongos A/J: 18 semanas

Neste experimento, utilizou-se 61 camundongos, os quais foram submetidos a um modelo de carcinogênese pulmonar baseado em modelo descrito anteriormente (HECHT et al., 1989). Todos os animais foram injetados pela via intraperitoneal com NNK (100mg/kg, 0,05ml salina) aos 42 dias de vida e foram divididos em três grupos. Os grupos foram denominados (Figura 5.2): “**CT**” o qual foi submetido ao NNK e recebeu apenas ração em pó; “**GA**” (100mg/kg *P.cupana*) e “**GB**” (2000mg/kg *P.cupana*) foram submetidos ao NNK e receberam ração em pó com *P.cupana* nas doses especificadas desde a aplicação do NNK até a eutanásia dos animais, totalizando 18 semanas de tratamento. Os animais foram pesados quando receberam o NNK e ao final do experimento, para calcular o ganho de peso total. Ao fim das 24 semanas, os animais foram eutanasiados com barbitúrico (Tiopental - 250mg/kg i.p.) e após seccionando-se a artéria aorta abdominal. Após a retirada dos pulmões de cada animal, rapidamente foram avaliadas as lesões macroscópicas quanto ao número e o

tamanho. Em seguida os pulmões foram fixados em metacarn por 8 horas e processados em parafina.

Figura 5.2 – Protocolo experimental de carcinogênese induzida por NNK em camundongos tratados com *P.cupana*. “s” - semanas; “D” - desmame; “E” eutanásia; “NNK” - injeção intraperitoneal do carcinógeno; “CT” - controle; NNK - 4-(Metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (100mg/kg). O número entre parênteses é o número de animais por grupo. O grupo CT foi submetido ao NNK (100mg/kg; i.p. 0.05ml) e recebeu apenas ração em pó. Os grupos tratados, **GA** (100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e **GB** (2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo) foram injetados com NNK (100 mg/kg; i.p. 0.05ml) e receberam ração em pó com *P.cupana* nas doses especificadas durante todo período experimental

5.2.3.3 Protocolo experimental 3: avaliação dos efeitos do guaraná sobre modelo de carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK em camundongos A/J: 52 semanas

Os 60 animais foram submetidos a um modelo de carcinogênese pulmonar baseado em modelo descrito anteriormente (HECHT et al., 1989), com algumas alterações. Neste experimento, foi utilizado o dobre da dose de NNK e os animais foram mantidos por 52 semanas recebendo os tratamentos, com a finalidade de encontrarmos lesões mais agressivas que nos protocolos descritos acima. Todos os animais foram injetados pela via intraperitoneal com NNK (200mg/kg, 0,05ml salina) aos 42 dias de vida e foram divididos em três grupos. Os grupos foram denominados (Figura 5.3): “**CT**” o qual foi submetido ao NNK e que recebeu apenas ração em pó; “**GA**” (100mg/kg *P.cupana*) e “**GB**” (2000mg/kg *P.cupana*) foram submetidos ao NNK e receberam ração em pó com *P.cupana* nas doses especificadas desde a aplicação do NNK até a eutanásia dos animais, totalizando 52 semanas de

tratamento. Os animais foram pesados ao final do experimento. Ao fim das 58 semanas, os animais foram eutanasiados em anestesia profunda com barbitúrico (Tiopental - 250mg/kg i.p.) e, em seguida, seccionou-se a artéria aorta abdominal. Ambos os pulmões foram avaliados macroscopicamente quanto ao número e tamanho das lesões e posteriormente fixados em formol 4% por 72 horas e processados para inclusão em parafina.

Figura 5.3 – Protocolo experimental de carcinogênese induzida por NNK em camundongos tratados com *P.cupana*. “s” - semanas; “D” - desmame; “E” eutanásia; “NNK” - injeção intraperitoneal do carcinógeno; “CT” - controle; NNK - 4-(Metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (200mg/kg). O número entre parênteses é o número de animais por grupo. O grupo CT foi submetido ao NNK (200mg/kg; i.p. 0.05ml) e recebeu apenas ração em pó. Os grupos tratados, **GA** (100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e **GB** (2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo) foram injetados com NNK (200 mg/kg; i.p. 0.05ml) e receberam ração em pó com *P.cupana* nas doses especificadas durante todo período experimental

5.2.4 Análise histopatológica

Cortes histológicos significativos dos pulmões de cada animal foram realizados e corados por Hematoxilina-eosina. Mensurou-se a área total do corte, o número de lesões e o tamanho destas, com auxílio de Sistema de análise de Imagens Image-Pro Plus, em microscópio Nikon Eclipse E-800. A seguir, calculou-se o número de lesões microscópicas por área, o tamanho médio de cada lesão microscópica e a área pulmonar acometida por lesão

microscópica (*tumor burden*). Foram também quantificadas a área total dos cortes histológicos acometida por lesão e o grau de malignidade destas lesões, levando-se em consideração a classificação já utilizada em nosso laboratório anteriormente (AVANZO et al., 2004) e seguindo as recomendações do Consórcio de Estudos sobre Modelos Animais para Cânceres Humanos (NIKITIN et al., 2004). Para quantificarmos o grau de malignidade, fizemos uma média ponderada das lesões de todos animais, admitindo os seguintes valores para cada tipo de lesão: “1” – lesões sólidas; “2” – lesões mistas e; “3” – lesões papilíferas.

5.2.5 Imunoistoquímica para PCNA e fosfo-CREB

As reações de imunoistoquímica foram realizadas conforme previamente descrito (FUKUMASU et al., 2008). Brevemente, os fragmentos de órgãos obtidos de camundongos imediatamente após o sacrifício foram fixados em formol 4%, processados e incluídos em parafina. As seções foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em diferentes concentrações de etanol. Então as lâminas foram lavadas e incubadas por 30 minutos em solução 3% H₂O₂ em metanol. O bloqueio antigênico foi realizado durante 1 hora em soro de coelho ou leite desnatado a 5% dependendo do anticorpo primário utilizado. Posteriormente, as lâminas foram lavadas e incubadas durante uma noite, a 4°C, com anticorpo monoclonal contra PCNA e policlonal contra CREB-P (fosforilado). Em seguida, anticorpos secundários, feitos em cabra, anti-imunoglobulinas de coelhos ou de camundongos biotinilados (Dako) foram aplicados. Seguiu-se a conjugação com o complexo estreptavidina-peroxidase, obtendo-se então marcação após a utilização de Diaminobenzidina (DAB). O material foi fotografado em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fotomicrografia e as células positivas foram contadas com auxílio de Sistema de análise de imagem (Image-Pro Plus). Contamos 1000 células totais, diferenciando-as em positivas ou negativas.

Como observamos diferença significativa no número de lesões maiores que 2,5 mm, no grau de malignidade e área acometida por lesão (*tumor burden*) das lesões apenas no grupo tratado com 2000mg/kg de guaraná, realizamos as análises tanto do PCNA quanto do fosfo-CREB nos animais do grupo controle e do grupo 2000mg/kg.

5.2.6 Análise estatística

Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão e foram analisados com o programa Graphpad Prism 3.0. Utilizamos ANOVA de 1 via com pós-teste de Dunnet para dados paramétricos e teste exato de Fisher para análise da incidência de lesões. Além disso, utilizamos o teste de Mann-Whitney não paramétrico para a análise dos dados das reações de imunoistoquímica.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Efeitos do guaraná sobre o ganho de peso

Observamos que quando apenas o guaraná nas duas doses testadas nestes experimentos é fornecido às fêmeas A/J por 20 semanas, não há interação entre o ganho de peso durante as 20 semanas e o consumo de guaraná ($p = 0,99$; Figura 5.4). Além disso, não se observou diferença significativa entre o ganho de peso quando estes consumiram o guaraná independentemente da dose ($p = 0,32$; Figura 5.5). No segundo experimento observamos que quando os animais recebem o NNK e posteriormente o guaraná por 18 semanas pelo mesmo período o resultado quanto à variação de peso é semelhante ao encontrado no experimento de tumorigênese espontânea ($p = 0,77$; Figura 5.6), assim como o ganho de peso ($p = 0,09$; Figura 5.7). Como não havíamos observado diferença nestes dois experimentos prévios, não houve a necessidade de avaliar a variação de peso no experimento de 59 semanas.

Ao avaliarmos apenas o peso corpóreo final dos animais nos três experimentos, pôde-se observar que não existe uma congruência quanto ao efeito do guaraná pois apenas observou-se diferença estatística no grupo GA em relação ao controle no experimento 1 ($p < 0,05$; Figura 5.8), ou seja, nos animais que não receberam carcinógeno e foram tratados por 20 semanas. Nos outros experimentos, não se observou diferença significativa entre os tratamentos com guaraná e o grupo controle (Figura 5.9 e 5.10).

Figura 5.4 – Variação de peso dos camundongos submetidos ao modelo de carcinogênese espontânea em animais A/J. Tratamento se iniciou a partir de 42 dias de vida e os animais foram eutanasiados após 20 semanas de tratamento, “CT” recebeu apenas ração em pó; “GA” recebeu ração em pó adicionada de 100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo). $p = 0,9957$

Figura 5.5 – Ganho de peso dos camundongos submetidos ao modelo de carcinogênese espontânea em animais A/J. Tratamento se iniciou a partir de 42 dias de vida e os animais foram eutanasiados após 20 semanas de tratamento, “CT” recebeu apenas ração em pó; “GA” recebeu ração em pó adicionada de 100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo); $p = 0,32$

Figura 5.6 – Variação de peso dos camundongos submetidos ao modelo de carcinogênese induzida pelo NNK. Todos os animais receberam 100mg/kg de NNK aos 42 dias de vida e foram eutanasiados após 18 semanas de tratamento. “CT” recebeu apenas ração em pó; “GA” recebeu ração em pó adicionada de 100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo). $p = 0,77$

Figura 5.7 – Ganho de peso dos camundongos submetidos ao modelo de carcinogênese espontânea em animais A/J. Todos os animais receberam 100mg/kg de NNK aos 42 dias de vida e foram eutanasiados após 18 semanas de tratamento. “CT” recebeu apenas ração em pó; “GA” recebeu ração em pó adicionada de 100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo); $p = 0,09$

Figura 5.8 – Peso corpóreo final dos camundongos do Experimento 1. Tratamento se iniciou a partir de 42 dias de vida e os animais foram eutanasiados após 20 semanas de tratamento, “CT” recebeu apenas ração em pó; “GA” recebeu ração em pó adicionada de 100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo); * $p < 0,05$

Figura 5.9 – Peso corpóreo final dos camundongos do Experimento 2. Todos os animais receberam 100mg/kg de NNK aos 42 dias de vida e foram eutanasiados após 18 semanas de tratamento. “CT” recebeu apenas ração em pó; “GA” recebeu ração em pó adicionada de 100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo)

Figura 5.10 – Peso corpóreo final dos camundongos do Experimento 3. Todos os animais receberam 200mg/kg de NNK aos 42 dias de vida e foram eutanasiados após 52 semanas de tratamento. “CT” recebeu apenas ração em pó; “GA” recebeu ração em pó adicionada de 100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo)

5.3.2 O guaraná não influencia a carcinogênese espontânea em camundongos A/J

5.3.2.1 Número de lesões macroscópicas

Observamos após 26 semanas de vida dos animais incidência de 20% (2/10) no grupo CT, 20% (2/10) no grupo GA e 18,18% (2/11) no GB, não havendo diferença estatística entre os grupos no que concerne à incidência das lesões macroscópicas (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Incidência das lesões encontradas ao exame macroscópico em Modelo de Carcinogênese Pulmonar espontâneo em Camundongos A/J

Grupos	Incidência (%)
CT (10)	2/10 (20%)
GA (10)	2/10 (20%)
GB (11)	2/11 (18.2%)

5.3.2.2 Número de lesões histológicas

Foi observada a presença de lesões microscópicas classificadas como adenomas em todos os grupos, porém sem diferença significativa entre estes (Tabela 5.2). O grupo controle apresentou 1 animal acometido por lesão, assim como o grupo GA e GB apresentaram dois animais com lesão ao exame histológico.

Tabela 5.2. Lesões encontradas ao exame microscópico em Modelo de Carcinogênese Pulmonar espontâneo em Camundongos A/J

Animais	Área lesão (mm ²)	Área total (mm ²)	Área lesão/Área total
CT	0,476126	75,16014	0,006335
0.1g/kg	0,065009	73,23223	0,000888
0.1g/kg	0,194461	53,68352	0,003622
2.0g/kg	0,222502	41,55975	0,005354
2.0g/kg	0,652113	65,45274	0,009963

Apenas 1 animal do grupo CT, e 2 animais de cada grupo 0.1g/kg e 2.0g/kg desenvolveram lesão

Portanto, é possível concluir que neste modelo experimental o guaraná nestas doses testadas, não apresenta qualquer efeito na tumorigênese pulmonar espontânea em camundongos A/J fêmeas, quando avaliados às 26 semanas de vida.

5.3.3 Efeitos do guaraná sobre a carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK e avaliada após 18 semanas de tratamento

5.3.3.1 Número de lesões macroscópicas

Neste experimento onde os animais foram injetados com 100 mg/kg NNK em dose única no dia 42 e tratados por 18 semanas com o guaraná, pretendíamos analisar a ação do guaraná principalmente na fase de promoção da carcinogênese pulmonar. Notamos que após 24 semanas de vida, a incidência das lesões macroscópicas (Figura 5.11) foi de 100, 89,5 e 95% respectivamente nos grupos CT, GA e GB, não havendo diferença nesta variável. Quanto ao número de lesões macroscópicas, também não foi observada diferença significativa após o tratamento com ambas as doses de guaraná utilizadas neste experimento (CT = $3,00 \pm 1,52$ n = 22; GA = $2,39 \pm 1,75$ n=19; GB = $2,95 \pm 1,73$; p = 0,46; Figura 5.12). Além disso, o tratamento com guaraná neste experimento não alterou o tamanho das lesões já que a porcentagem de lesões maiores que 1 mm foi semelhante entre os grupos (p = 0,34; Figura 5.13).

Figura 5.11 – Lesões pulmonares macroscópicas encontradas após 18 semanas da aplicação do NNK. Os animais receberam uma única injeção de NNK (100mg/kg) aos 42 dias de vida

Figura 5.12 – Número de lesões macroscópicas totais dos camundongos do Experimento 2. Todos os animais receberam 100mg/kg de NNK aos 42 dias de vida e foram eutanasiados após 18 semanas de tratamento. “CT” recebeu apenas ração em pó; “GA” recebeu ração em pó adicionada de 100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo)

Figura 5.13 – Porcentagem de lesões maiores que 1 mm dos camundongos do Experimento 2. Todos os animais receberam 100mg/kg de NNK aos 42 dias de vida e foram eutanasiados após 18 semanas de tratamento. “CT” recebeu apenas ração em pó; “GA” recebeu ração em pó adicionada de 100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo)

5.3.3.2 Análise histopatológica

A análise histopatológica dos pulmões de todos os animais foi realizada em cortes com cinco micrômetros de espessura e corados com Hematoxilina e Eosina. Desta maneira, classificamos as lesões em Hiperplasias (Figura 5.14 A) e Adenomas podendo classificá-los como: tipo Sólido (Figura 5.14 B), Papilífero e Misto (Sólido/Papilífero) (Figura 5.14 C). Todos os adenomas encontrados neste experimento foram do tipo sólido ou misto, independente do tratamento com guaraná.

Figura 5.14 – Lesões microscópicas encontradas nos camundongos do experimento 2. (A) lesão hiperplásica; (B) adenoma do tipo sólido; (C) adenoma do tipo misto. Aumento de 40x em ambas fotomicrografias

Além disto, observamos também que a ocorrência de hiperplasias foi maior nos camundongos dos grupos tratados com guaraná que no grupo CT, assim como foi menor a incidência de adenomas nestes grupos, cerca de metade do observado no grupo CT (Tabela 5.3). Admitindo que as lesões pulmonares induzidas neste modelo experimental progridam de hiperplasias, para adenomas e conseqüentemente adenocarcinomas, este dado indica que o guaraná pode estar diminuindo a velocidade do processo carcinogênico pulmonar induzido pelo NNK nos animais tratados com a planta.

Tabela 5.3. Incidência das lesões encontradas ao exame histológico em Modelo de Carcinogênese Pulmonar induzido pelo NNK

Grupos	Hiperplasias (%)	Adenomas (%)
CT	0/9 (0%)	9/9 (100%)
GA	3/6 (50%)	3/6 (50%) ^a
GB	2/10 (20%)	8/10 (80%)

^a - diferença significativa em relação grupo CT, $p=0,044$, pelo Teste Exato de Fisher

O número de lesões por mm^2 , assim como a área média por lesão e a área total histológica acometida pelas lesões não foram diferentes após o tratamento com as duas doses de guaraná (respectivamente Figuras 5.15, 5.16 e 5.17).

Figura 5.15 – Número de lesões microscópicas por mm² de pulmão nos camundongos do Experimento 2. Todos os animais receberam 100mg/kg de NNK aos 42 dias de vida e foram eutanasiados após 18 semanas de tratamento. “CT” recebeu apenas ração em pó; “GA” recebeu ração em pó adicionada de 100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo)

Figura 5.16 – Área média por lesão pulmonar microscópica dos camundongos do Experimento 2. Todos os animais receberam 100mg/kg de NNK aos 42 dias de vida e foram eutanasiados após 18 semanas de tratamento. “CT” recebeu apenas ração em pó; “GA” recebeu ração em pó adicionada de 100 mg

P.cupana/kg peso vivo) e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo)

Figura 5.17 – Área pulmonar total acometida por lesão microscópica dos camundongos do Experimento 2. Todos os animais receberam 100mg/kg de NNK aos 42 dias de vida e foram eutanasiados após 18 semanas de tratamento. “CT” recebeu apenas ração em pó; “GA” recebeu ração em pó adicionada de 100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo)

5.3.4 Efeitos do guaraná sobre a carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK e avaliada após 52 semanas de tratamento

5.3.4.1 Análise macroscópica

Na análise macroscópica deste experimento observamos que todos os animais, independente do tratamento com guaraná apresentaram lesões macroscópicas de tamanhos variados desde menores que 1 mm até maiores que 2,5 mm. Também foi possível notar que ao dobrar a dose do carcinógeno e esperar 52 semanas ao contrário das 18, foi possível encontrar um número maior de lesões nos animais ($p < 0,001$; Figura 5.18).

Figura 5.18 – Número de lesões pulmonares macroscópicas nos camundongos do grupo controle dos três experimentos. Os animais foram injetados aos 42 dias de vida com: solução salina e eutanasiados após 20 semanas (Sem NNK); 100 mg/kg NNK e eutanasiados após 18 semanas (NNK 18'); 200 mg/kg NNK e eutanasiados após 52 semanas (NNK 52'). *- $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$

Neste experimento, quando tratamos os animais com guaraná não observamos diferença no número de lesões macroscópicas totais (CT = $9,3 \pm 5,1$; GA = $12,3 \pm 3,5$; GB = $11,3 \pm 4,0$; $p = 0,0604$; Figura 5.19), porém foi possível reparar que os animais do grupo GB apresentaram menor porcentagem de lesões maiores que 2,5 mm em relação aos animais que receberam apenas o NNK (CT = $45,5 \pm 19,6\%$; GA = $38,1 \pm 18,4\%$; GB = $14,5 \pm 9,5\%$; $p < 0,0001$; Figura 5.20). Logo, estes dados em conjunto nos dizem que o efeito do guaraná (GB) não foi sobre o número de lesões neste modelo, mas sim sobre o tamanho das lesões tumorais, que se mostraram diminuídas, sendo caracterizado então um efeito de controle do crescimento tumoral.

Figura 5.19 – Número de lesões pulmonares macroscópicas totais dos animais do Experimento 3. Todos os animais receberam 200mg/kg de NNK aos 42 dias de vida e foram eutanasiados após 52 semanas de tratamento. “CT” recebeu apenas ração em pó; “GA” recebeu ração em pó adicionada de 100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo)

Figura 5.20 – Porcentagem de lesões pulmonares maiores que 2,5 mm dos camundongos do Experimento 3. Todos os animais receberam 200mg/kg de NNK aos 42 dias de vida e foram eutanasiados após 52 semanas de tratamento. “CT” recebeu apenas ração em pó; “GA” recebeu ração em pó adicionada de 100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo). ** - $p < 0,01$

5.3.4.2 Análise histológica

A análise dos dados macroscópicos obtidos neste experimento referente aos efeitos quimiopreventivos do guaraná inspirou uma análise histopatológica detalhada dos pulmões de todos os animais submetidos a este modelo experimental. Primeiramente avaliamos o número de lesões por área pulmonar avaliada histologicamente e de acordo com o dado macroscópico, não observamos diferença entre os grupos nesta variável ($p = 0,1719$; Figura 5.21). Já, ao analisarmos a área média destas lesões, notamos que ambos os tratamentos com guaraná (GA e GB) diminuíram a área média destas lesões, dado que corrobora com a análise macroscópica ($p = 0,003$; Figura 5.22). Desta forma, foi possível notar que o tratamento com guaraná reduziu a porcentagem da área total acometida por lesão nos pulmões ($p = 0,0307$; Figura 5.23).

Figura 5.21 – Número de lesões pulmonares microscópicas dos camundongos do Experimento 3. Todos os animais receberam 200mg/kg de NNK aos 42 dias de vida e foram eutanasiados após 52 semanas de tratamento. “CT” recebeu apenas ração em pó; “GA” recebeu ração em pó adicionada de 100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo)

Figura 5.22 – Área média das lesões pulmonares microscópicas dos camundongos do Experimento 3. Todos os animais receberam 200mg/kg de NNK aos 42 dias de vida e foram eutanasiados após 52 semanas de tratamento. “CT” recebeu apenas ração em pó; “GA” recebeu ração em pó adicionada de 100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo). ** - $p < 0,01$

Figura 5.23 – Área total pulmonar acometida por lesão (*Tumor Burden*) dos camundongos do Experimento 3. Todos os animais receberam 200mg/kg de NNK aos 42 dias de vida e foram eutanasiados após 52 semanas de tratamento. “CT” recebeu apenas ração em pó; “GA” recebeu ração em pó adicionada de 100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo). * - $p < 0,05$

Por fim nesta parte do trabalho analisamos o grau histológico das lesões pulmonares encontradas e já quantificadas. Interessantemente, notamos que o tratamento com guaraná reduziu a malignidade das lesões encontradas nos animais tratados com 2000 mg/kg ($p = 0,0279$; Figura 5.24). Este dado, em conjunto com a análise morfométrica das lesões corroboraram com o tamanho reduzido das lesões macroscópicas encontradas nestes animais. Todos estes resultados nos indicaram um efeito quimiopreventivo do guaraná neste modelo, com ação principal sobre as fases de promoção e progressão já que claramente o processo carcinogênico se deu mais vagarosamente nos animais tratados com guaraná. Desta forma, o passo seguinte foi avaliar o índice de proliferação celular destes tumores para confirmarmos esta hipótese.

Figura 5.24 – Malignidade das lesões pulmonares dos camundongos do Experimento 3. Todos os animais receberam 200mg/kg de NNK aos 42 dias de vida e foram eutanasiados após 52 semanas de tratamento. “CT” recebeu apenas ração em pó; “GA” recebeu ração em pó adicionada de 100 mg *P.cupana*/kg peso vivo) e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo). * - $p < 0,05$

5.3.4.3 Análise da proliferação celular nos tumores

A taxa de proliferação celular foi realizada pela análise da presença do antígeno PCNA apenas nas lesões tumorais dos animais do grupo controle e GB. Assim, verificamos que o efeito de controle sobre o crescimento e desenvolvimento tumoral exercido pela administração de guaraná se deve em parte pelo menor estado proliferativo dos tumores presentes nos animais tratados com a planta. A administração do guaraná reduziu em aproximadamente 45% a proliferação das células tumorais (CT = $29,95 \pm 11,15\%$, $n = 6$; GB = $16,61 \pm 6,21\%$, $n = 7$; $p = 0.0221$; Figura 5.25). Após confirmarmos que os tumores dos animais tratados com guaraná eram menores por apresentar menor grau histológico e menor índice de proliferação celular, nossos esforços se direcionaram para verificar a expressão do fator de transcrição CREB em sua forma ativa.

Figura 5.25 – Quantificação da proliferação celular dos tumores pulmonares dos camundongos do Experimento 3. Apenas avaliamos o grupo GB em relação ao controle, pois foi neste grupo que os efeitos antitumorais foram mais evidentes. Todos os animais receberam 200mg/kg de NNK aos 42 dias de vida e foram eutanasiados após 52 semanas de tratamento. “CT” recebeu apenas ração em pó e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo). * - $p < 0,05$

5.3.4.4 Análise do grau de atividade de CREB

Conforme descrito acima, analisamos o número de células tumorais que apresentavam o fator de transcrição CREB em sua forma ativada, já que o anticorpo utilizado apenas detecta o CREB quando fosforilado na Serina 133. Para nossa surpresa, foi possível detectar uma diferença significativa após o tratamento com guaraná (GB; Figura 5.26), onde se observou menor quantidade de células positivas para o Fosfo-CREB (CT = $63,9 \pm 5,6\%$, n = 4; GB = $47,0 \pm 5,2\%$, n = 4; p = 0,0286; Figura 5.27).

Figura 5.26 – Imunodeteção do fator de transcrição CREB em sua forma ativada. Todos os animais receberam 200mg/kg de NNK aos 42 dias de vida e foram eutanasiados após 52 semanas de tratamento. (A e C) fotomicrografias representativas de tumores de animais do grupo “CT”, respectivamente aumento de 40 e 2000x; (B e D) fotomicrografias representativas de tumores de animais do grupo GB, respectivamente aumento de 40 e 2000x

Figura 5.27 – Quantificação da ativação do fator CREB nos tumores pulmonares dos camundongos do Experimento 3. Apenas avaliamos o grupo GB em relação ao controle, pois foi neste grupo que os efeitos antitumorais foram mais evidentes. Todos os animais receberam 200mg/kg de NNK aos 42 dias de vida e foram eutanasiados após 52 semanas de tratamento. “CT” recebeu apenas ração em pó e; “GB” recebeu ração em pó adicionada de 2000 mg *P.cupana*/kg peso vivo). * - $p < 0,05$

5.4 DISCUSSÃO

Dados norte americanos estimam que 45% dos homens e 38% das mulheres sejam diagnosticados com um câncer invasivo durante suas vidas (JEMAL et al., 2008). Dentre estes cânceres, o de pulmão é o que apresenta a maior mortalidade entre todos os outros tipos. Logo, estudar, entender e poder descobrir novas drogas que tenham ação terapêutica e principalmente preventiva é extremamente necessário. Além disso, o tabaco é considerado a maior causa evitável de câncer atualmente, porém mesmo com as diretrizes e política anti-tabagista adotada por diversos países a Organização Mundial de Saúde estimou que em 2025 o número de tabagistas aumentou de 1.2 bilhões para 1.6 bilhões. Estas pessoas estavam principalmente em países em desenvolvimento, gerando o número assustador de mais de 1 bilhão de mortes durante o século 21 devido ao cigarro (PREVENTION, 2004). Como a maior parte destas mortes ocorreu em países em desenvolvimento, procurar alternativas baratas e que possam prevenir tantas mortes é o enfoque principal da quimioprevenção do câncer com agentes da dieta. Desta forma, neste estudo avaliaram-se os efeitos do consumo de uma planta nativa do Brasil, o guaraná, como agente quimiopreventivo do câncer de pulmão induzido pelo principal carcinógeno presente no tabaco. Mostramos neste trabalho que o consumo desta planta reduz o desenvolvimento da carcinogênese pulmonar em camundongos, pois ao final das 52 semanas, as quais os camundongos foram tratados diariamente com o guaraná, estes animais apresentaram lesões menores e com grau histológico menos agressivo que os animais controle.

Primeiramente avaliamos apenas os efeitos do guaraná sobre os camundongos A/J, reconhecidamente susceptíveis a carcinogênese pulmonar. Foi possível notar que o ganho de peso destes animais não foi alterado e apenas o grupo GA apresentou peso final menor que os animais do grupo CT e GB. Como pôde ser visto o grupo GA apresentou sempre menor peso vivo em relação aos outros grupos sendo que não consideramos esta diferença importante. Além disso, não foram observados quaisquer outros sinais de toxicidade na dose 20 vezes maior de guaraná, o que condiz com nosso raciocínio. Nos demais experimentos, apesar da administração do NNK também não foram observados alterações sobre o peso final dos animais. Apenas em um experimento onde fornecemos o guaraná por gavagem

(2000mg/kg) por 15 dias na linhagem BALB/c foi notado efeito hepatotóxico (FUKUMASU et al., 2007), mas não na linhagem C75Bl/6. Tendo em vista os dois trabalhos, podemos dispor que o efeito tóxico do guaraná é dependente da linhagem utilizada e da forma que se administra a planta, já que nos experimentos longos a administração é na ração e nos de 15 dias por gavagem uma vez ao dia.

Ao analisarmos as lesões pulmonares macroscópicas nos três experimentos, notamos que apenas ao utilizar uma dose maior de NNK por um tempo de tratamento mais longo (52 semanas) é que foi possível detectar o efeito quimiopreventivo do guaraná. Acreditamos que isto possa ter acontecido pelo fato que o efeito do guaraná ocorrer apenas nas fases mais tardias da carcinogênese pulmonar, sendo apenas perceptível quando é estudado em um modelo mais agressivo, no qual seja mais fácil analisar o desenvolvimento do processo carcinogênico. Isto é notado já que no modelo espontâneo e no de 18 semanas apenas encontramos poucas lesões tumorais, pequenas e de grau histológico menos agressivo, como adenomas do tipo sólido. Os dados que condizem com esta hipótese são que em nenhum dos três modelos o guaraná reduziu o número das lesões detectadas. Além disso, notamos que o principal efeito do guaraná foi reduzir o tamanho das lesões tanto macro quanto microscópicas. Por fim, o efeito do tratamento com a planta levou a um grau histológico das lesões menos agressivo quando comparado com as lesões dos animais do grupo controle. Este dado é de extrema importância ao admitirmos que neste modelo experimental de injeção única do carcinógeno NNK as lesões pulmonares progridem de hiperplasias para adenomas e carcinomas. Somando-se a isto é bem aceito que os adenomas do tipo misto e papilífero são mais agressivos que do tipo sólido e progridem para carcinomas (NIKITIN et al., 2004). Nas condições utilizadas neste experimento encontramos hiperplasias e adenomas dos três tipos, ou seja, sólido, papilífero e misto; por isso utilizamos a classificação proposta no material e métodos para avaliar o grau de malignidade das lesões.

Tendo em vista que as lesões do grupo tratado com guaraná (GB) foram menores e apresentaram menor grau de malignidade, estudamos também a taxa de proliferação das células destes tumores, tanto dos animais tratados quanto dos não tratados com guaraná, sendo feita pela contagem do número de células positivas para o PCNA no total de células tumorais. Este tipo de análise é bem difundida no meio acadêmico, principalmente para se comparar a taxa de proliferação celular entre grupos experimentais. Evidentemente existem

outros marcadores de proliferação como o KI-67 que está presente em todas as fases do ciclo celular (SCHOLZEN; GERDES, 2000) e o teste de incorporação de BrDU o qual marca principalmente a fase de síntese de DNA (S). Já o PCNA tem suas funções bem descritas e pode ser considerado o maestro da forquilha de replicação do DNA (MOLDOVAN; PFANDER; JENTSCH, 2007). Isto porque ele possui diversos co-fatores que se ligam de forma bem regulada dependendo da fase do ciclo celular, principalmente por alterações na afinidade e outras alterações pós-traducionais como proteólise, fosforilação ou ubiquitinação. Neste trabalho demonstramos que as lesões dos animais tratados com guaraná apresentaram menor marcação para o PCNA do que as lesões dos animais do grupo controle. Fato este que corrobora com outros resultados obtidos previamente pelo nosso grupo em experimentos de hepatocarcinogênese (FUKUMASU et al., 2006b) e de metástases pulmonares de melanoma B16/f10 (FUKUMASU et al., 2008). Com base nos dados publicados previamente e nos resultados deste experimento, podemos afirmar que o guaraná apresenta efeito anti-proliferativo que gera como consequência lesões menores e com menor grau de malignidade. Desta maneira, pode-se concluir que o processo carcinogênico é alterado pela administração do guaraná, fato este que possibilita aclamarmos que esta planta apresenta efeito quimiopreventivo neste modelo experimental.

Posteriormente, buscamos avaliar qual seria a via alterada pelo guaraná que resultaria nos efeitos já descritos. Assim, encontramos um fator de transcrição que é efector de diversas vias relacionadas com proliferação e sobrevivência celular, e que recentemente foi demonstrado ter sua expressão aumentada e estar constitutivamente ativo em linhagens de câncer de pulmão em humanos (AGGARWAL et al., 2008). Além disso, foi demonstrado que a supressão direta ou indireta da ativação do CREB inibe a proliferação celular e induz a apoptose, efeitos estes que já foram demonstrados quando da administração do guaraná em modelos animais (FUKUMASU et al., 2006b; FUKUMASU et al., 2008). Outro fato interessante é que já foi demonstrado que o NNK é capaz de aumentar a fosforilação do CREB de maneira dose dependente por ser agonista do receptor Beta-adrenérgico (LAAG et al., 2006). Desta maneira, estudamos os níveis de ativação do fator CREB pela imunodeteção com um anticorpo que detecta o fator CREB fosforilado na Serina 133, nos animais do grupo CT e GB. Encontramos mais de 60% das células tumorais do grupo controle com o fator CREB ativado, fato este que torna possível admitir a importância deste fator neste modelo experimental. Observamos ainda que as lesões dos animais tratados com

guaraná apresentaram 26% menos ativação do CREB em relação aos animais do grupo controle. Logo, o CREB pode ser considerado responsável pelo menos em parte pelo efeito quimiopreventivo do guaraná. Entretanto, devido às limitações do modelo experimental utilizado é complicado afirmar quais seriam as proteínas responsáveis por este efeito já que não possuímos amostras destes tumores congeladas para realização de estudos de expressão gênica e protéica por PCR em tempo real e western blot. Desta forma, procuramos avaliar o mecanismo de ação do guaraná no capítulo 9 onde estudamos os efeitos *in vitro* de extratos mais purificados do guaraná.

Capítulo 6

Efeitos da Conexina43 sobre a carcinogênese pulmonar

A ser publicado sob o título: *"GAP junction alpha-1 (connexin 43) importance during lung carcinogenesis induced by a tobacco-derived nitrosamine"*

6 A importância da proteína da junção GAP alfa-1 durante a carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK, uma nitrosamina derivada do tabaco

Heidge Fukumasu^a, Claudia Cabreira Mori^a, José Luis Avanzo^a, Daniel Soares Sanches^a e Maria Lucia Zaidan Dagli^a.

^a – Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

RESUMO

O NNK é o mais potente carcinógeno do tabaco, induzindo adenocarcinomas em camundongos, ratos e hamsters de forma reprodutível. Durante a carcinogênese, a perda da homeostase tecidual ocorre desde a fase de iniciação (indução) e principalmente durante a fase de promoção e progressão da carcinogênese, sendo correlacionada com alterações da comunicação intercelular por junções GAP, as quais são formadas por conexinas. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o papel da Conexina43 na carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK. Para isto, utilizou-se 30 camundongos machos F1 híbridos do cruzamento entre machos A/J e fêmeas CD1-Conexina43^{+/-}. Estes animais receberam NNK (200mg/kg, 2x IP) ou solução salina, nos dias 15 e 18 de vida. Após 52 semanas, todos os animais foram eutanasiados e seus nódulos pulmonares macroscópicos foram contados, separados e fixados em formalina ou congelados rapidamente em nitrogênio. Então para avaliar a Conexina43 fez-se a genotipagem por PCR dos camundongos (para determinar se eram Conexina43 *wild type* ou Conexina43^{+/-}), realizaram-se também a análise histopatológica das lesões pulmonares, imunoistoquímica e PCR em tempo real quantitativo para a Conexina43. Os camundongos Conexina43^{+/-} apresentaram maior multiplicidade das lesões macroscópicas (Conexina43^{+/-} = 4,18 ± 2,71; WT = 2,33 ± 1,37; p<0,05) e suas lesões apresentaram grau histológico mais maligno que os animais WT (Conexina43^{+/-} = 8,00 ± 1,73, n=7; WT = 3,12 ± 0,76, n=8; p=0,02). Também o tratamento com NNK aumentou a expressão da Conexina43 nos pulmões dos animais WT (84%) e dos Conexina43^{+/-} (316%), assim como nos tumores dos animais Conexina43^{+/-} (340%). O parênquima pulmonar dos animais WT apresentou a Conexina43 localizada nas membranas celulares, onde os animais Conexina43^{+/-} apresentaram menor imunomarcagem para Conexina43. Não obstante, os tumores dos camundongos WT apresentaram a Conexina43 nas membranas celulares e no citoplasma, enquanto os tumores dos animais Conexina43^{+/-} apresentaram a Conexina43 principalmente no citoplasma. Estes dados indicam que a Conexina43 está aumentada nos tumores dos animais Conexina43^{+/-} e que possivelmente esta proteína não formava os conexons adequadamente, conseqüentemente não indo para a membrana citoplasmática e acumulando-se no citoplasma. Nossos resultados sugerem que embora a Conexina43 seja um importante fator para controlar a transformação maligna, tendo como dado o maior

número de lesões nos animais *Conexina43^{+/-}*, ela pode também ter uma função nas fases avançadas da carcinogênese, já que o aumento da sua expressão intra-citoplasmática correlacionou-se com o fenótipo mais maligno das lesões encontradas.

6.1 INTRODUÇÃO

Um estudo publicado recentemente pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) indicou que o câncer de pulmão afetou mais de 27000 pessoas no Brasil no ano de 2006 (INCA, INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER 2005). Da mesma maneira, dados norte-americanos demonstram que o câncer de pulmão, tanto em homens quanto em mulheres, é o maior responsável por mortes causadas por câncer (JEMAL et al., 2008). Sabe-se ainda que o desenvolvimento dessa doença tem sido altamente relacionada com poluição e com o tabagismo excessivo. Entre os inúmeros compostos presentes no tabaco, a “4-(Metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona” (NNK) é reconhecidamente a de maior potencial carcinogênico (HOFFMANN et al., 1982). Este composto é uma nitrosamina carcinogênica derivada da nicotina e, como tal, é biotransformada por enzimas do citocromo P450 presentes principalmente nos pneumócitos do tipo II. Sua biotransformação gera subprodutos ainda mais potentes, com capacidade de formar adutos no DNA de forma randômica podendo atuar em sítios gênicos específicos relacionados à carcinogênese, como os proto-oncogenes e genes supressores de tumor, iniciando-se assim o processo carcinogênico.

A unidade funcional do pulmão é reconhecidamente o alvéolo, estrutura esta responsável pela troca gasosa realizada pelo órgão. O alvéolo é recoberto por pneumócitos do tipo I, que são células achatadas e alongadas que realizam a interface endotélio-ar. Os pneumócitos do tipo II, por outro lado, são células menores, cubóides e que possuem a função de proliferar e restituir os pneumócitos do tipo I que vierem a morrer devido à injúria. Ambos os tipos celulares trocam informações entre si de forma parácrina (via liberação de substâncias com ação em células próximas) ou devido a comunicação intercelular por junções do tipo Gap (ABRAHAM et al., 2001). Junções do tipo Gap são canais de comunicação intercelular entre células adjacentes realizado por unidades chamadas conexons, unidades hexaméricas formadas por proteínas transmembranas chamadas conexinas. Por volta de 20 tipos diferentes de conexinas foram demonstrados em mamíferos, sendo que são geralmente denominadas por Cx seguida do seu peso molecular (WILLECKE et al., 2002). Alterações da comunicação intercelular através de junções do tipo Gap podem causar várias anomalias, levando a diferentes doenças em seres humanos. Deste

modo, muitas mutações em genes das conexinas já foram relatadas como, por exemplo, a Cx26 na surdez neurosensorial não sindrômica (WHITE et al., 1998) e no queratoderma palmoplantar (RICHARD et al., 1998b), a Cx31 na eritroqueratoderma variabilis (RICHARD et al., 1998a) e distúrbios da audição (XIA et al., 1998), a Cx32 na doença de Charcot-Marie-Tooth ligada ao cromossomo X (BERGOFFEN et al., 1993) e a Cx50 na catarata zonular purulenta (SHIELS et al., 1998). Enquanto se acredita que muitas dessas mutações possam ser do tipo perda-de-função, sugere-se ainda que algumas possam ocorrer de forma dominante-negativa (WHITE et al., 1998).

A deleção das junções do tipo GAP leva a uma menor comunicação entre as células, fato este que está intimamente ligado à promoção e progressão do processo carcinogênico. Já se demonstrou que camundongos mutantes para Conexina32, sob protocolo de hepatocarcinogênese, tiveram maior incidência de lesões geradas pela dietilnitrosamina, porém não apresentaram diferença na tumorigênese espontânea (DAGLI et al., 2004). Devido a essas funções observadas no processo carcinogênico, as conexinas podem ser classificadas como genes supressores de tumor já que a deleção de um alelo acarreta em maior incidência no número de lesões, classicamente condizendo com a teoria revisada de Knudson sobre genes supressores de tumor (KNUDSON, 2001). A primeira indicação de que as conexinas atuam como genes supressores de tumor vieram conseqüentemente da descoberta de que células normais em contato com células malignas podem suprimir seu crescimento tumoral (STOKER, 1967). Mais indicações dessa hipótese foram encontradas em uma série de experimentos, nos quais os genes das conexinas foram transfectados para células tumorais malignas deficientes em junções do tipo Gap, diminuindo o crescimento tumoral (ROSE; MEHTA; LOEWENSTEIN, 1993; YAMASAKI et al., 1999b). Experimentos com células HeLa demonstraram que apenas a expressão de Cx26 foi capaz de diminuir o crescimento destas células e gerou reversão na tumorigênese (MESNIL; PICCOLI; YAMASAKI, 1997), provavelmente, pois na cérvix, local de origem dessas células, a Cx26 é a mais abundante.

A conexina43 é de longe a mais expressa e estudada em mamíferos, sendo presente em diversos órgãos como coração, pulmão, fígado etc. No tecido pulmonar, as células endoteliais e as células musculares lisas expressam a Cx37 (WILLECKE et al., 1999) e a Cx40 (HENNEMANN et al., 1992; TRAUB et al., 1994). Porém, a maior parte das células pulmonares expressa a Conexina43, como as células epiteliais de tipos I e II, as células

endoteliais dos grandes vasos sanguíneos e as células musculares lisas da região peribrônquica (KASPER et al., 1996). Quando em cultura primária, as células epiteliais de tipo II expressam mRNAs para as Conexina43, Cx32 e Cx26. Enquanto há um decréscimo dos dois outros tipos de conexinas, a expressão da Conexina43 aumenta cerca de 10 vezes no terceiro dia em cultura (AVANZO et al., 2007). Nosso grupo mostrou que a deleção da Conexina43 aumentava a susceptibilidade à tumorigênese pulmonar induzida pelo uretano (AVANZO et al., 2004), onde os tumores desenvolvidos nos animais deficientes em Conexina43 mostravam maior índice de proliferação celular e expressão aberrante de outras conexinas (AVANZO et al., 2004). Em outro trabalho do grupo, demonstrou-se que adenomas pulmonares induzidos pelo uretano apresentavam expressão diferenciada de outras conexinas como, por exemplo, a perda da expressão de Cx26 e da Conexina43 (AVANZO et al., 2006). Por outro lado, a Cx32 também já foi demonstrada como sendo um gene supressor de tumor para o pulmão (KING; LAMPE, 2004).

Neste trabalho avaliamos a função da Conexina43 sobre a carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK, o carcinógeno mais potente do tabaco em camundongos. Mostramos que a hemi-deleção da Conexina43 realmente tem ação sobre a susceptibilidade a tumores de pulmão induzidos quimicamente, onde camundongos Conexina43^{+/-} apresentaram mais lesões e com grau mais maligno. Por outro lado, demonstramos também que a Conexina43 pode ter função na fase mais avançada da carcinogênese pulmonar, já que se observou um aumento na expressão da Conexina43 nos animais Conexina43^{+/-}, os quais apresentaram lesões mais malignas.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Animais

Os camundongos deficientes em *Conexina43* foram originalmente estabelecidos por Reaume e colaboradores (REAUME et al., 1995) e comprados do Laboratório Jackson (Paris) pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), Lyon, França. Foram gentilmente doados pelo Dr. Hiroshi Yamasaki (Japão) ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em cujo biotério foram alojados no período dos experimentos. Os camundongos nulo-zigotos para *Conexina43* (*Conexina43^{-/-}*) morrem ao nascer devido a malformações cardíacas (REAUME et al., 1995), de forma que foram utilizados camundongos hemizigotos nestes experimentos. Assim, neste experimento foram cruzados fêmeas A/J com machos Cd-1 *conexina43^{+/-}*, obtendo os híbridos F1, os quais foram utilizados. Os referidos animais permaneceram em caixas de policarbonato, sob condições controladas de temperatura ($20 \pm 4^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar (45% - 75%), com ciclo de 12 horas de claro/escuro. Os animais receberam água e ração peletizada (Nuvilab®, Nuvital) *ad libitum* durante todo o experimento.

6.2.2 Protocolo experimental

Os animais foram submetidos a um modelo de carcinogênese pulmonar onde receberam duas doses de NNK (200mg/kg cada uma em 0.1ml salina, I.P.) nos dias 15 e 18 de vida. Estes foram eutanasiados com 52 semanas de vida por anestesia profunda com barbitúrico (Tiopental - 250mg/kg I.P.), e secção da artéria aorta abdominal, sendo rapidamente isolados os pulmões de cada animal. Contaram-se as lesões pulmonares macroscópicas sem insuflá-los com fixador, pois eram precisos fragmentos íntegros, para extração de proteínas e mRNA, que foram congelados rapidamente em nitrogênio. Outros fragmentos sem lesão e algumas lesões foram isolados e fixados em metacarn e formol

tamponado (4%, em PBS) para posterior exame histopatológico e imunoistoquímico. Após o processamento do pulmão descrito acima, realizou-se o exame necroscópico em todos os animais e coletaram-se também fragmentos do fígado para realização da genotipagem por PCR.

6.2.3 Análise macroscópica

Após a retirada dos pulmões de cada animal, rapidamente avaliaram-se as lesões macroscópicas quanto ao número e o tamanho para cada lobo pulmonar.

6.2.4 Exame histopatológico

Os fragmentos dos tecidos foram processados, embebidos em parafina e corados com hematoxilina e eosina. As neoplasias pulmonares foram avaliadas e classificadas seguindo o capítulo *Tumors of the respiratory tract* do livro *Tumors of the Mouse* (REHM; WARD; SASS, 1994). Com a finalidade de se quantificar e avaliar estatisticamente o grau histológico das lesões encontradas no pulmão utilizou-se a classificação determinada na tabela 6.1. Quando o camundongo possuía mais de uma lesão, o valor de cada lesão foi somado.

Tabela 6.1 – Grau histológico e valor determinado para as lesões pulmonares microscópicas encontradas neste experimento

<i>Grau histológico</i>	<i>valor</i>
Hiperplasia	1
Adenoma Sólido	2
Adenoma Misto	3
Adenoma Papilífero	4
Carcinoma Misto	5
Carcinoma Papilífero	6

6.2.5 Genotipagem

Com a finalidade de definir se os animais eram *Conexina43^{+/+}* ou *Conexina43^{+/-}*, cerca de 50mg de fígado previamente congelado em nitrogênio líquido e mantido à -80°C foram digeridos em 0,7 ml de tampão de extração (NaCl 0,1M, tris-HCl 0,05M, EDTA 0,1M, 0,49 mg de protease K por ml, SDS 1%) à 65°C por duas horas para extração do DNA. Após a agitação, 0,25 ml de NaCl 5M foi adicionado, homogeneizado e as amostras centrifugadas a 15000 rpm. Cerca de 0,7 ml da fase aquosa foi transferida para um novo tubo e 0,5 ml de isopropanol foi adicionado afim de precipitar o DNA. Após a centrifugação, o DNA foi lavado com etanol 70% e dissolvido em 0,5 ml de TE. O DNA de cada camundongo foi analisado por PCR com primers para os genes como descrito previamente: *Conexina43* senso 5'CCCCACTCTCACCTATGTCTCC3' e anti-senso 5'ACTTTTGCCGCTAGCTATCCC3'; neo-senso 5'GGCCACAGTCGATGAATCCAG 3' e anti-senso 5' TATCCATCATGGCTGATGCAA 3' (AVANZO et al., 2004). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada durante 1 ciclo, na condição de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30s, 55°C por 1 minuto, 72°C por 4 minutos, 1 ciclo à 72°C por 4 minutos e 1 ciclo à 4°C por 60 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese com 60 V por 1 hora e meia. Os géis de agarose foram então submetidos à solução de brometo de etídio por 10 minutos, lavados em água corrente e

visualizados sob luz ultravioleta onde o produto do gene da Conexina43 era de 520bp e o do gene que confere resistência a neomicina de 294bp.

6.2.6 Imunoistoquímica para conexina43

Os fragmentos de órgãos obtidos de camundongos *Conexina43*^{+/-} e *Conexina43*^{+/+} imediatamente após o sacrifício foram fixados em metacarn, processados e incluídos em parafina. As seções foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em diferentes concentrações de etanol. Então as lâminas foram lavadas e incubadas por 30 minutos em solução 3% H₂O₂ em metanol. O bloqueio antigênico foi realizado durante 1 hora em solução de leite desnatado a 5% em PBS. Posteriormente, as lâminas foram lavadas e incubadas durante uma noite, a 4 °C, com anticorpos policlonais contra a Conexina43. Em seguida, anticorpos secundários, feitos em cabra, anti-imunoglobulinas de coelho biotinilados (Dako) foram aplicados. Seguiu-se a conjugação com o complexo estreptavidina-fluoresceína (FITC), obtendo-se então marcação fluorescente. Esta marcação fluorescente foi amplificada pelo sistema TSA (Tyramide Signal Amplification Nen Life Science Products, Boston, MA, EUA) e foi utilizado reagente para evitar o esgotamento da fluorescência (ProLong antifade kit- Molecular Probes, USA). O material foi imediatamente fotografado em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência e fotomicrografia.

6.2.7 Western blot para conexina43

Os fragmentos de pulmão foram mantidos em gelo durante todo o processo de extração de proteínas. Inicialmente as proteínas totais foram extraídas logo após o sacrifício dos animais com 200 microlitros de *Sample buffer* (Tris 120mM; Glicerol 20%; SDS 4%), homogenização com macerador específico (Tissue tearor, Biospec Products, Wisconsin, USA) e adição de 200 µl de *Working solution* (Tris 120mM; Glicerol 20%; SDS 4%; PMSF 1mM, DTT 100mM). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos e o

sobrenadante coletado, sendo este aliquotado em diversas amostras, que foram conservadas a -80°C até seu uso. A quantificação das proteínas totais se deu pelo método de Bradford (Bio-rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA), conforme descrito a seguir: 10 μl de amostra foram diluídos em 90 μl de *working solution*, sendo então adicionados 10 μl desta solução à 990 μl do reagente de Bradford, já diluído (1:5). Foi realizada uma curva padrão com soro-albumina bovina adicionando reagente de Bradford em diferentes concentrações. As amostras descansaram por 5 minutos e então foram quantificadas em Biofotômetro (Eppendorf, Germany). A absorbância de cada amostra foi anotada e foram calculadas as concentrações de proteínas totais de cada amostra utilizada. Para a separação das proteínas utilizou-se o método de Laemmli (LAEMMLI, 1970) com gel SDS-PAGE a 10 %, porém o gel de superfície foi feito a 4,5%. Carregou-se 150 μg de cada amostra, adicionando-se a cada raia solução de carregamento (Azul de Bromofenol, Glicerol, Trizma, DTT) e o marcador de peso molecular na primeira raia (Rainbow full range, GE Healthcare, Little Chalfont, UK). A eletroforese ocorreu primariamente pelo gel de superfície à 90V e posteriormente à 80V no gel de separação, o que levou cerca de 2 horas e meia. Logo após a eletroforese, o gel foi submerso em tampão de transferência por 10 minutos e o sanduíche da transferência semi-seca foi montado com a membrana na parte de baixo, conforme o fabricante indica (Bio-Rad Laboratories, USA). A transferência ocorreu em 47 mA por 55 minutos, onde verificamos sua eficiência pelo método de coloração com vermelho de Ponceau (Vermelho de Ponceau 0,25%; metanol 40%; ácido acético 15%; qsp 100 ml), lavando a membrana extensivamente com TTBS até a coloração se exaurir. Membranas transferidas que não mostrassem um carregamento igual entre as amostras foram descartadas. Em seguida, colocou-se a membrana em solução de bloqueio antigênico (5% leite desnatado, GIBCO) por 2 horas em agitação suave e constante. Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-Conexina43 (Zymed, Policlonal) durante a noite a 4°C . No outro dia, a membrana foi lavada por 5 vezes durante 5 minutos cada com TTBS e hibridizada com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-coelho por 2 horas em temperatura ambiente com agitação suave e constante. Finalmente a membrana foi lavada 5 vezes com TTBS e exposta à solução contendo DAB e peróxido de hidrogênio. A membrana ficou sobre agitação até as bandas de interesse aparecerem, aproximadamente na altura de 43 KDa, conforme era de se esperar para a Conexina43, com o controle positivo sendo o coração. A membrana foi então lavada com água destilada a fim

de parar a reação com o DAB, foi seca e fotografada para posterior análise densitométrica. O gel foi corado com solução de Comassie Blue a 0,25%, e descorada com solução De-stain composta por metanol e ácido acético.

6.2.8 PCR em tempo real

Extraíu-se o RNA total destas amostras para avaliar a expressão da Conexina43 por PCR em tempo real, utilizando como controle endógeno a expressão do mRNA do 18S ribossomal. Para isto, o RNA foi extraído pelo método de coluna específica (Eppendorf, Alemanha), seguindo os princípios descritos pelo fabricante. Fragmentos de tecido congelado foram macerados rapidamente com auxílio de pistilo com 350µl de solução de lise, sendo centrifugados durante 10 minutos a 14000g a 25 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo que continha 350µl de etanol 70%, homogenizados cuidadosamente e transferidos para um tubo contendo a coluna. Centrifugou-se novamente por 1 minuto a 14000g a 25 °C desprezou-se o filtrado e adicionou-se 700µl de solução de lavagem 1, seguido por outra centrifugação de 1 minuto a 14000g a 25 °C. Em seguida, foram desprezados e filtrados novamente, adicionados de 700µl de solução de lavagem 2 e foram centrifugados por 1 minuto a 14000g a 25 °C, sendo esta etapa repetida novamente. Trocou-se o tubo coletor e foram adicionados 50µl de água ultrapura tratada com DEPC. A coluna foi agitada por 5 segundos para homogenização da membrana da coluna com a água e foram incubadas a 50 °C por 5 minutos, sendo rapidamente centrifugadas à 14000g por 2 minutos e estocadas à -80 °C até sua utilização.

O RNA total foi quantificado pela determinação à 260nm e 280nm. Amostras que não possuísem razão A260/280 em torno de 1,8 e que estivessem degradadas na análise em gel de agarose não foram utilizadas. Para confecção do cDNA, realizamos a transcrição reversa com kit específico (Invitrogen). Para isto, seguimos os passos do fabricante. Cerca de 1µg de RNA total foi tratado com enzima DNase (USB) incubando-se por 15 minutos a temperatura ambiente. Adicionamos então 25 nM de EDTA e incubamos à 65 °C por 10 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 0,5 mg de OligoDT e 10mM de dNTP, incubando por 5 minutos a 65 °C. As amostras foram então tratadas com RNase adicionando 4µl de First Strand Buffer

(5x), 0,1 M de DTT e 5000 U de RNase OUT, incubando por 2 minutos à 42 °C. Por fim, foram adicionados 10.000 U da enzima Superscript II e incubou-se por mais 50 minutos à 42 °C e depois 15 minutos à 70 °C.

A reação de PCR em tempo real foi realizada na plataforma *ABI-prism 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems), com o jogo *Assays on Demand* para a Conexina43 (Mm00439105_m1) e para o RNA mensageiro da proteína ribossômica 18S (4319413E). Montou-se a reação de acordo com indicações do fabricante com 1,25 µl do *Assay*, 12,5 µl do Master Mix, 2 µl de cDNA e 9,25 µl de água ultrapura tratada com DEPC. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas rapidamente, sendo então colocadas no aparelho. A reação foi feita com 1 ciclo de 2 minutos a 50 °C, 1 ciclo de 10 minutos a 95 °C, 50 ciclos de 15 segundos a 95 °C alternadamente com 1 minuto a 60 °C. A análise dos dados se deu pelo método de Livak (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

6.2.9 Análises estatísticas

Os dados foram analisados com o programa Graphpad Prism 3.0 (GraphPad software). Foram utilizados o teste T não paramétrico e teste exato de Fischer para análise da incidência de lesões. Diferenças significativas foram consideradas a partir de $p < 0,05$.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Genotipagem

A genotipagem dos camundongos foi realizada a partir de fragmentos de fígado que foram rapidamente coletados e congelados em nitrogênio líquido logo após o sacrifício. Nesta análise observamos uma frequência de aproximadamente 50% de cada genótipo (Conexina43^{+/+} = 16 animais e Conexina43^{+/-} = 14 animais), conforme esperado (Figura 6.1).

Figura 6.1 – Genotipagem dos camundongos submetidos ao experimento de carcinogênese pulmonar. (A) Fotografia representativa de gel de agarose com os produtos de PCR de camundongos WT e Cx43^{+/-}. (B) Porcentagem de camundongos obtidos do cruzamento de fêmeas A/J com machos Cd-1 conexina43^{+/-}.

6.3.2 A deficiência da conexina43 aumenta a multiplicidade das lesões macroscópicas no pulmão de camundongos tratados com NNK

Observamos que o desenvolvimento das lesões pulmonares ocorreu conforme o esperado, com a maioria dos animais apresentando uma ou mais lesões (Figura 6.2). Verificamos também que o desenvolvimento das lesões foi alterado pelo genótipo, onde os animais hemizigotos (Conexina43^{+/-}) apresentaram maior número de lesões pulmonares que os selvagens (WT) (Conexina43^{+/-} = $3,83 \pm 2,85$; WT = $2,33 \pm 1,37$; $p = 0,1151$; Figura 6.2), porém sem atingir diferença estatística. A diferença estatisticamente significativa foi observada na multiplicidade das lesões, dado este sobre o número de lesões totais nos animais que apresentaram lesões (Conexina43^{+/-} = $4,18 \pm 2,71$; WT = $2,33 \pm 1,37$; $p = 0,049$, Figura 6.2). A localização das lesões aparentemente se deu de forma aleatória por todos os lobos pulmonares.

Figura 6.2 – Lesões pulmonares macroscópicas após 52 semanas da aplicação do NNK (A e B). (C) Número de lesões macroscópicas totais por animal. (D) Multiplicidade das lesões macroscópicas indica o número de lesões nos animais que apresentaram ao menos uma lesão. * - $p < 0,05$

6.3.3 A deficiência da conexina43 aumenta a malignidade das lesões neoplásicas pulmonares

Verificamos com o protocolo experimental utilizado, lesões histológicas de diversos graus e tamanhos. Desde pequenas lesões hiperplásicas até grandes carcinomas foram encontrados nos pulmões dos animais (Figura 6.3). Na análise microscópica ao avaliarmos o número de lesões desenvolvidas nos animais normais, ou deficientes em Conexina43, observamos que a falta da Conexina43 não alterou a quantidade de lesões (WT = $1,000 \pm 0,3015$, n = 12; Conexina43^{+/-} = $1,214 \pm 0,3505$, n = 14; p = 0,6530; Figura 6.4). Da mesma maneira, observamos apenas uma leve tendência dos animais Conexina43^{+/-} apresentarem lesões com maior área que os animais selvagens (WT = $0,04353 \pm 0,01741$, n = 12; Conexina43^{+/-} = $0,08742 \pm 0,02872$, n = 14; p = 0,2014; Figura 6.4).

Por outro lado, ao avaliar o grau histológico das lesões, considerando-as conforme descrito no material e métodos se observou que os animais deficientes em Conexina43 apresentaram maior susceptibilidade ao desenvolvimento da carcinogênese pulmonar, já que estes animais apresentaram lesões de maior grau neoplásico (WT = $3,125 \pm 0,7662$, n = 8; Conexina43^{+/-} = $8,000 \pm 1,732$, n = 7; p = 0,0184; Figura 6.4).

Figura 6.3 – Tipos histológicos encontrados após 52 semanas de vida nos pulmões de camundongos induzidos com NNK. (A e B) – Lesão hiperplásica de Pneumócitos do tipo II. (C e D) - Lesão hiperplásica de células não-ciliadas. (E e F) - Adenoma do tipo sólido. (G e H) - Adenoma do tipo papilífero. (I e J) - Carcinoma pulmonar do tipo misto, com populações caracterizadas histologicamente como sendo do tipo sólido e do tipo papilífero. Barras: azul=40x; preta=100x; vermelha=200x; e amarelo=400x (*Próxima página*)

Figura 6.4 – Análise microscópica do pulmão dos camundongos submetidos ao modelo de carcinogênese pulmonar. (A) - número de lesões microscópicas por animal, sem diferença entre os grupos. (B) – área de lesão por área de pulmão, observa-se uma tendência das lesões dos animais Cx43^{+/-} serem maiores que a dos animais selvagens. (C) – grau histológico das lesões pulmonares, observa-se que a deleção de um alelo da Cx43 gerou lesões com um grau histológico mais grave. * -p=0.0184

6.3.4 Análise semi-quantitativa da proteína conexina43

Para avaliarmos a expressão da Conexina43 por Western blot utilizamos três animais WT e três animais Conexina43^{+/-}. Desta maneira, fizemos a análise densitométrica da Conexina43 e da Alfa-actina com a finalidade de analisar a expressão relativa da Conexina43. A alfa-actina foi utilizada como controle endógeno do carregamento de proteínas. Notamos uma marcação mais forte nos animais *Wild type* em relação aos hemizigotos para a

Conexina43 (Figura 6.5). O coração se mostrou um ótimo controle positivo para Conexina43 e o fígado não, pois expressa pouca Conexina43 em comparação ao coração.

Figura 6.5 – Análise semi-quantitativa da proteína Conexina43. Camundongos Cx43^{+/-} têm menos proteína Cx43 que os animais WT. (A)- Análise densitométrica relativa da Conexina43 no pulmão dos animais WT e Cx43^{+/-}. (B)- Western blot para Cx43 e A-actina, de três animais por grupo. O controle para Cx43 foi o coração. *** - $p < 0,0001$

6.3.5 Imuno-localização da conexina43

Conforme esperado, foi observado que no parênquima pulmonar dos animais normais (Conexina43^{+/+}) a Conexina43 está presente principalmente na membrana citoplasmática, uma vez que, esta proteína tem por função principal ser componente das junções intercelulares do tipo GAP. Claramente, os animais Conexina43^{+/-} (Figura 6.6) apresentaram menos marcação da Conexina43 comparativamente com os animais normais (Figura 6.6). Já com relação ao tecido neoplásico, diferenças em relação a localização da Conexina43 foi observada devido ao genótipo dos animais. Aparentemente nas lesões hiperplásicas de células-não-ciliadas (bronquiolares) ocorre maior marcação da Conexina43 em relação ao parênquima normal (Figura 6.6), sendo que os animais Conexina43^{+/-} apresentaram menor marcação. Nos tumores dos animais normais (Figura 6.6), a Conexina43 foi encontrada principalmente nas membranas celulares e também no citoplasma das células. Por outro lado, nos tumores dos animais Conexina43^{+/-} (Figura 6.6), observamos que a Conexina43 acumulou-se no citoplasma das células tumorais e quase nenhuma marcação foi vista na membrana citoplasmática. Este resultado sugere que durante a conformação dos conéxons no complexo de Golgi ou no direcionamento destes conéxons até a membrana citoplasmática, houveram alterações nas células tumorais que se desenvolveram nos animais Conexina43^{+/-}.

Figura 6.6 – Imunoistoquímica com revelação fluorescente para Cx43. Comparando as figuras (A) e (B) podemos verificar que, conforme o esperado, os animais Cx43^{+/-} apresentaram menor quantidade de Cx43 no parênquima pulmonar. Observamos que as lesões hiperplásicas de células-não-ciliadas apresentaram aparentemente maior expressão de Cx43, com localização citoplasmática, independente do genótipo dos animais (C) e (D). Por outro lado, quando avaliamos os tumores presentes nos animais WT (E), observamos uma marcação forte em membrana, com marcação citoplasmática também. Já os tumores dos animais Cx43^{+/-} (F) apresentaram em sua grande maioria marcação apenas em citoplasma, e relativamente mais forte que os animais WT

6.3.6 Expressão do mRNA da conexina43

Ao avaliar por PCR em tempo real a expressão da Conexina43 utilizamos camundongos não expostos ao NNK para podermos comparar a expressão gênica após o tratamento com NNK e o nível de expressão da Conexina43 nos tumores. Como era esperado, os animais Conexina43^{+/-} apresentaram de fato menor expressão da Conexina43 (WT = $1,08 \pm 0,34$; Conexina43^{+/-} = $0,34 \pm 0,29$; Figura 6.7). Verificamos também que o parênquima pulmonar dos camundongos tratados com NNK e livre de lesões macroscópicas, apresentou um aumento na expressão da Conexina43 tanto nos animais WT (84%) como nos Conexina43^{+/-} (316%). Já nas lesões tumorais, observamos que nos animais WT praticamente não houve diferença em relação ao parênquima pulmonar. Por outro lado, nas lesões tumorais dos animais Conexina43^{+/-} foi notado um grande aumento na expressão da Conexina43 (340%), dado este que corrobora com a aparente maior marcação da Conexina43 por imunoistoquímica nos tumores dos animais Conexina43^{+/-} (Figura 6.6).

Figura 6.6 – Análise da expressão do mRNA da Cx43 por PCR em tempo real quantitativo. Observou-se que o parênquima pulmonar de animais Cx43^{+/-} apresentou menor expressão de Cx43 que o dos animais Cx43^{+/+} (-77%). A aplicação do NNK elevou a expressão da Cx43 no parênquima pulmonar de ambos os genótipos (Cx43^{+/+}=84%; Cx43^{+/-}=316%). Por outro lado, nos tumores isolados dos pulmões observou-se um aumento intenso na expressão da Cx43 nos tumores dos animais Cx43^{+/-} (340%)

6.4 DISCUSSÃO

Estudos que indiquem novos marcadores tumorais de malignidade e/ou sobrevida continuam sendo necessários para capacitar o oncologista a tomar a melhor decisão a respeito de como tratar os cânceres. Da mesma maneira, a descoberta de novos indícios que facilitem o entendimento de como se desenvolve o processo carcinogênico pulmonar trará novas alternativas para estudo da terapêutica e prevenção do câncer de pulmão. Deste modo, nosso estudo tem fundamental importância já que mostramos que a simples deleção de um alelo da *Conexina43* em camundongos leva ao aumento da susceptibilidade à carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK, o mais potente carcinógeno presente no tabaco. Estes dados condizem com a teoria revisada de Knudson sobre genes supressores de tumor, podendo-se então classificar a *Conexina43* como um gene supressor de tumor para o pulmão (KNUDSON, 2001).

Em um estudo prévio de carcinogênese pulmonar em camundongos *Conexina43*^{+/-} demonstrou-se este efeito com o carcinógeno uretano (AVANZO et al., 2004), muito utilizado em modelos animais, porém esta droga não está presente no tabaco, reconhecidamente o maior fator predisponente para o tumor de pulmão. Assim, ao escolhermos o modelo experimental, utilizamos uma nitrosamina (NNK), que está presente no tabaco, pela sua especificidade como agente carcinogênico para o pulmão. Naquele experimento publicado anteriormente (AVANZO et al., 2004), os animais *Conexina43*^{+/-} também apresentaram mais lesões macroscópicas que os selvagens, porém apenas foram avaliadas a presença de adenomas pulmonares, já que o tempo de avaliação foi após 24 e não 52 semanas como no presente estudo. Além disto, no presente estudo, os dados demonstraram que estes animais *Conexina43*^{+/-} apresentaram além de mais lesões pulmonares, lesões com maior grau de malignidade. Observar ainda desde lesões hiperplásicas até adenocarcinomas. Estas foram classificadas conforme seu grau histológico, seguindo os parâmetros estabelecidos por Rehm e colaboradores (REHM; WARD; SASS, 1994) para classificação de lesões neoplásicas em pulmão de camundongos. Um tipo de lesão que chamou a atenção neste experimento foi a hiperplasia de células não-ciliadas (figura 6.3), não observada em nenhum outro experimento até o presente momento em nosso laboratório. Esta lesão é caracterizada pelo acúmulo intracelular de uma substância

cristalina eosinofílica, sendo similar às células eosinofílicas e cristais vistos na cavidade nasal (REHM; WCISLO; DEERBERG, 1985).

Conforme era esperado, o tecido pulmonar não tumoral dos animais *Conexina43^{+/-}*, por ter apenas 1 alelo da *Conexina43*, apresentou menos mRNA (Figura 6.7) e proteína para *Conexina43* (Figura 6.5 e 6.6) quando comparados com os animais selvagens. Isto ocorreu devido a deleção e substituição do alelo da *Conexina43* pelo da neomicina, conforme publicado por Reaume e colaboradores (REAUME et al., 1995). Como a análise imunoistoquímica foi eficiente para avaliarmos a *Conexina43* nos pulmões e ao mesmo tempo capacitar nossa análise de localização da proteína, não realizamos o western blot dos tumores, ainda porque não tínhamos amostras suficientes para realizarmos o RNA e a proteína. Na análise imunoistoquímica, foi evidente a presença de *Conexina43* nos alvéolos, caracterizando-se em forma de placas finas e alongadas, ou por pontos entre as células. Poucas células apresentaram marcação citoplasmática, mas por vezes esta foi presente. Por outro lado, nos animais *Conexina43^{+/-}*, claramente ocorreu menor marcação para *Conexina43* no parênquima pulmonar. Ao analisarmos as estruturas bronquiolares, a marcação das células não ciliadas por vezes foi fraca, porém quando havia hiperplasia destas células, como se pôde verificar na Figura 6.6, um aumento na marcação da *Conexina43* ocorreu. Por fim, ao analisarmos os tumores induzidos pelo NNK nos dois grupos de animais, notou-se que o padrão da marcação da *Conexina43* foi diferente. Nos tumores dos animais selvagens, a *Conexina43* estava presente entre as células, gerando marcações em forma de placa e também presente no citoplasma das células, indicando um acúmulo da *Conexina43*. Já nos animais *Conexina43^{+/-}*, a *Conexina43* foi aparentemente mais expressa, porém não se localizava entre as células para formar as junções GAP. Desta maneira, é possível que tenha ocorrido algum problema na conformação dos conexons ou no direcionamento destes até a membrana citoplasmática. Nossos dados de PCR quantitativo corroboram com esta hipótese, já que os tumores dos animais *Conexina43^{+/-}* apresentaram uma expressão de aproximadamente 300% a mais que a dos animais selvagens. Em outro modelo de carcinogênese pulmonar induzida por 4-nitroquinolina 1-óxido, também em camundongos com background A/J, Udaoka e colaboradores (UDAKA; MIYAGI; ITO, 2007), analisaram a expressão de diversas conexinas em adenomas e adenocarcinomas e mostraram um aumento discreto da expressão da *Conexina43* nos tumores mais malignos (UDAKA; MIYAGI; ITO, 2007), o que corrobora com nossos dados.

Com base em nossos dados, sugere-se que a Conexina43 tenha importância também nas fases avançadas da carcinogênese, já que observamos aumento da expressão desta conexina e sua localização aberrante justamente nos animais que apresentaram lesões neoplásicas com maior grau histológico (maligno). Aparentemente, a falta da Conexina43 é responsável por gerar um desenvolvimento mais rápido das lesões, mas por outro lado, também exerce alguma função nas fases mais avançadas da carcinogênese já que sua expressão é aumentada.

Logo, será possível que a conexina43 tenha dupla função na carcinogênese pulmonar? Sabe-se que isto acontece com outras proteínas como, por exemplo, com o TGF-beta que apresenta tanto supressão como promoção tumoral (ELLIOTT; BLOBE, 2005). Ao analisar a Cx26 durante a carcinogênese do melanoma (SAITO-KATSURAGI et al., 2007) os autores sugeriram que a expressão da Cx26 se perde durante o avançar do processo carcinogênico, e apenas volta a ser expressa durante o carcinoma *In situ* onde teria função importante na comunicação com as células endoteliais no processo de metástase. Podemos sugerir com base em nossos dados, que a Conexina43 possa ter função parecida nos tumores de pulmão induzidos pelo NNK já que observamos resultados semelhantes.

Por fim, concluímos que a Conexina43 é importante para a carcinogênese pulmonar induzida pela nitrosamina presente no tabaco, atuando como um gene supressor tumoral durante o desenvolvimento do processo carcinogênico. Além disto, sugerimos ainda uma possível função da Conexina43 em estágios mais avançados da carcinogênese, como, por exemplo, durante o processo de invasão e metástase. Entretanto, mais estudos são necessários para descrever por qual meio estas alterações no perfil de expressão e localização da Conexina43 ocorrem durante a tumorigênese pulmonar em camundongos.

Capítulo 7

Efeito antineoplásico do guaraná sobre metástases pulmonares de Melanoma

Publicado no Brazilian Journal of Medical and Biological Research com o título: "Paullinia cupana Mart var. sorbilis, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice"

7 A *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná reduz a proliferação celular e aumenta a apoptose de metástases pulmonares de melanoma B16/F10 em camundongos

Heidge Fukumasu^a, José Luis Avanzo^a, Marcia Kazumi Nagamine^a, José Alexandre Barbuto^b, Kurapati Venkata Rao^a, Maria Lucia Zaidan-Dagli^a

^a Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, São Paulo, SP, Brasil

^b Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas – USP, São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

Já fora demonstrado que o guaraná (*Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*) tem efeito quimiopreventivo na hepatocarcinogênese em camundongos e diminui o dano de DNA induzido pela Dietilnitrosamina (DEN). No presente experimento, avaliaram-se os efeitos do guaraná num modelo de metástase experimental. Para isso, foram cultivadas células de melanoma B16/f10 (5×10^5 células) e injetadas pela veia da cauda dos camundongos após 7 dias de tratamento diário com guaraná (2000 mg/kg). Os animais foram tratados por mais 14 dias e então eutanasiados (tempo total de tratamento com guaraná: 21 dias). Seções histológicas dos pulmões foram obtidas para análise morfométrica, contagem de corpúsculos apoptóticos para calcular a taxa de apoptose nas lesões e também foi realizada reação imunoistoquímica para detectar o antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA) para determinar a taxa de proliferação celular das células tumorais. Na análise histológica, os animais tratados com guaraná (GUA) apresentaram uma redução de 68,6% na área acometida por tumor (CO: $0,84 \pm 0,26$, n=6; GUA: $0,27 \pm 0,24$, n=6; p=0,0043). Além disso, houve uma redução de 57,9% na proliferação celular (CO: $23,75 \pm 20,54$, n=6; GUA: $9,99 \pm 3,93$, n=6; p=0,026) e um aumento de 4,85 vezes na taxa de apoptose (CO: $66,95 \pm 22,95$, n=6; GUA: $324,37 \pm 266,74$, n=6; p=0,0152). Neste modelo animal, o tratamento com guaraná diminuiu a proliferação celular e aumentou a apoptose das células tumorais, conseqüentemente reduzindo a área acometida por lesões. Atualmente estamos investigando as vias moleculares que geram estes efeitos do guaraná em cultivo de células melanoma B16/f10, com foco nas proteínas inibidoras do ciclo celular e ciclinas.

7.1 INTRODUÇÃO

Mesmo com os avanços no tratamento do câncer atualmente são necessárias estratégias que intervenham com o desenvolvimento dos tumores, ou seja, que tenham ação na carcinogênese. Dentre estas, o uso de substâncias quimiopreventivas têm chamada a atenção, já que estas podem atuar prevenindo, atrasando ou revertendo o fenótipo maligno tumoral, além de afetar lesões cancerosas secundárias ou recorrentes. Os agentes quimiopreventivos são conhecidos por serem pouco tóxicos, apresentarem menos efeitos colaterais e estarem envolvidos na neutralização de carcinógenos e/ou seus efeitos nas células. Nos últimos anos, têm se dado considerável atenção para identificar agentes quimiopreventivos naturais, particularmente aqueles presentes em plantas medicinais e as que fazem parte da dieta. Assim, diversos estudos têm demonstrado efeitos quimiopreventivos muito interessantes de plantas, como por exemplo, o chá verde (KANDASWAMI et al., 2005; KIMURA, 2005).

A *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, conhecida como guaraná, é uma planta nativa brasileira que cresce originalmente em Maués, uma área situada na floresta Amazônica (HENMAN, 1982b). Os índios Saterê-Maués têm usado o guaraná por séculos como um agente estimulante, afrodisíaco e para dores de cabeça (HENMAN, 1982b). Diversos efeitos foram mostrados recentemente como o efeito protetor do DNA contra os danos induzidos pela Dietilnitrosamina (FUKUMASU et al., 2006a), efeito protetor contra lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina (CAMPOS et al., 2003) e efeito antioxidante e antibacteriano (BASILE et al., 2005). Mais recentemente, nosso grupo reportou que a administração do guaraná reduziu a incidência e a multiplicidade das lesões pré-neoplásicas induzidas pela Dietilnitrosamina em fígados de camundongos (FUKUMASU et al., 2006b). Estes efeitos foram atribuídos a redução da proliferação celular determinada pela análise dos níveis de PCNA (FUKUMASU et al., 2006b).

Tendo em vista estes interessantes efeitos do guaraná, o estudo de outros efeitos na proliferação celular e apoptose em um modelo de metástase, onde as células já apresentam fenótipo maligno, parece apropriado. Então, no presente estudo, nós usamos um modelo experimental de metástase de células Melanoma B16/f10 (RUSCIANO; LORENZONI; BURGER, 1994; WELCH, 1997). As metástases advêm do espalhamento do câncer a partir do tumor

primário, quando este se torna hábil a formar novos tumores em órgãos distantes. Dentre os diferentes órgãos acometidos por metástases, as metástases pulmonares são consideradas uma das mais importantes causadoras de morte em pacientes com câncer (CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002). Este é um processo que envolve a liberação de células do tumor primário que caem na circulação, sobrevivência destas na circulação, sua localização em um novo órgão, extravasamento e acomodação no tecido distante, o início e manutenção do seu crescimento e a neo-vascularização do clone metastático (CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002; PANTEL; BRAKENHOFF, 2004). Quando o câncer é detectado após ter metastatizado, o seu tratamento é muito mais difícil e quase não efetivo.

Desta maneira, o objetivo principal deste estudo foi avaliar o efeito inibitório do crescimento celular nos animais tratados diariamente com guaraná em um modelo de metástase experimental com melanoma B16/f10. Nós reportamos que o efeito de controle do crescimento celular exercido pelo guaraná se baseia na redução da proliferação celular e na indução de apoptose nas células tumorais, sugerindo-se então que esta planta pode ter um potencial efeito quimiopreventivo para o câncer.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Animais

Neste experimento foram utilizadas fêmeas de camundongo da linhagem C57Bl/6 com dois meses de idade, as quais foram mantidas no Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP. Doze animais foram divididos em dois grupos de seis cada: tratados com guaraná (GUA) ou controles (CO). Estes foram mantidos num ciclo de luz de 12 horas sob condições controladas de temperatura ($20 \pm 4^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55 \pm 10\%$) e tiveram acesso livre a ração peletizada (Nuvilab-CR1, Nuvital Nutrientes LTDA, Brasil) e água filtrada. Todos os procedimentos foram realizados seguindo-se as normas de utilização e cuidados do Instituto Nacional de Saúde dos EUA (CLARK et al., 1996) além de terem sido revisados e aprovados pelo comitê de bioética da FMVZ-USP (processo número 953/2006).

7.2.2 *Paullinia cupana*

O pó das sementes de guaraná foi fornecido pela EMBRAPA Amazônia Ocidental (Amazônia, Brasil) e mantido sobre condições secas a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ até sua administração. O guaraná (2000 mg/kg) foi diluído em água filtrada e fornecido por gavagem (0,2 ml por animal por dia). Os animais do grupo controle receberam apenas água por gavagem. Esta dose foi escolhida baseando-se em nossos experimentos prévios (FUKUMASU et al., 2006a; FUKUMASU et al., 2006b), os quais mostraram efeito quimiopreventivo e de proteção do DNA. A composição química da amostra de guaraná utilizada foi a mesma publicada anteriormente (FUKUMASU et al., 2006b). O conteúdo de cafeína na amostra foi determinado seguindo-se metodologia publicada previamente (PAGLIARUSSÍ; FREITAS; BASTOS, 2002) e apresentou cerca de 1,02% da matéria seca.

7.2.3 Cultivo celular

As células de melanoma B16/f10 foram cultivadas em meio RPMI-10 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (50 IU/ml), estreptomicina (50 mg/ml) e L-glutamina (2mM) sobre condições normais de temperatura, umidade e composição atmosférica (37°C, 5% de CO₂ em câmara umidificada). Utilizamos o método de exclusão vital com a coloração por Azul de Tripán para contarmos e verificarmos o índice de células viáveis, sendo que apenas foram utilizados cultivos que apresentassem viabilidade maior que 95%. Então, aproximadamente 5×10^5 células foram diluídas em 0,2 ml de solução salina 0,9% estéril, logo antes da injeção na veia da cauda.

7.2.4 Protocolo experimental

O guaraná diluído na água (2000mg/kg) ou apenas a água foi administrada por gavagem uma única vez por dia, por 21 dias durante todo o experimento. No sétimo dia, os camundongos de ambos os grupos receberam uma injeção intravenosa de 5×10^5 células na veia da cauda e foram eutanasiados no dia 21. Os pulmões foram expostos e cuidadosamente insuflados com metacarn (60: 30: 10, metanol, clorofórmio e ácido acético, v/v) e o número de lesões macroscópicas foi contado. Coletou-se o pulmão, fígado, baço, intestinos, rim e cérebro que foram fixados em metacarn por 8 horas no máximo e processados rotineiramente e embebidos em parafina.

7.2.5 Análise histopatológica

A análise histopatológica foi realizada utilizando-se seções representativas dos pulmões de cada animal (5µm) coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Posteriormente foi realizada a análise morfométrica onde calculou-se a área de cada lesão encontrada (Image-

Pro Plus, versão 4.5, Media Cybernetics, Bethesda, EUA). As colônias de melanoma e a área total das seções dos pulmões foram medidas para cada animal. Então o “tumor burden”, ou seja, a área acometida por lesão dividida pela área total do pulmão foi calculada e demonstrada como porcentagem (%).

7.2.6 Imunohistoquímica para PCNA

Para a análise da proliferação celular nas metástases de melanoma, realizou-se reação imunoistoquímica para o PCNA (PCNA, PC10, diluição 1:3200, Dako, Dinamarca) em seções representativas de 5µm de espessura do pulmão de cada animal. Para isto, as lâminas foram desparafinizadas e reidratadas com banhos consecutivos de xilol e etanol em diferentes concentrações. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com uma solução de 3% de H₂O₂ diluído em PBS por 5 minutos, sendo posteriormente lavadas três vezes em PBS (5 minutos cada banho). Para evitar marcação inespecífica do anticorpo, as lâminas foram bloqueadas com leite desnatado (Dako) à 5% por duas horas, sendo posteriormente expostas ao anticorpo anti-PCNA a noite toda à 4°C. No outro dia, para se detectar o PCNA, as lâminas foram tratadas utilizando-se o método da peroxidase-biotina-estreptavidina, de acordo com as instruções do fabricante (LSAB, Dako), sendo a proteína PCNA detectada após exposição à 3’3 Diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram lavadas em água corrente e contra-coradas com hematoxilina. Os núcleos das células positivas para PCNA apresentaram-se corados em marrom devido ao DAB e pelo menos 1000 células por animal foram contadas. O índice de proliferação foi obtido dividindo-se o número de células positivas pelo número de células totais contadas por animal e multiplicado por 100.

7.2.7 Detecção de apoptose

A taxa de apoptose das metástases pulmonares foi avaliada pelo método (STINCHCOMBE et al., 1995) que detecta os corpúsculos apoptóticos com o auxílio de

microscópio de fluorescência (Nikon E-800, Tóquio, Japão). Este método é baseado na propriedade de intensidade de fluorescência que a eosina, presente nos corpúsculos apoptóticos corados por H&E, possui sob luz UV (465-495 nm). A identificação dos corpúsculos apoptóticos foi confirmada ao se trocar o sistema do microscópio de fluorescência para luz clara, além de se utilizar critérios estabelecidos anteriormente (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). Os corpúsculos apoptóticos detectados apresentaram-se como pequenas circunferências acidofílicas com cromatina fragmentada ou mesmo ausente, acompanhados por condensação do citoplasma e /ou sua fragmentação. Se células únicas ou agrupados celulares de células vizinhas continham múltiplos corpúsculos, foi assumido que estes derivavam apenas de uma célula, portanto, um evento apoptótico. Contaram-se todos os corpúsculos presentes na seção histológica do pulmão de cada animal do experimento. A taxa de apoptose foi reportada como sendo o número de eventos apoptóticos pela área das lesões de melanoma.

7.2.8 Análises estatísticas

Estas análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism (versão 3.0, GraphPad Software Inc, EUA). ANOVA de duas vias foi utilizada para avaliar as alterações no peso corpóreo durante todo o experimento. O teste de Mann-Whitney foi aplicado para todos os outros dados porque eles não seguiam distribuição normal. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

7.3 RESULTADOS

A avaliação macroscópica foi realizada imediatamente após a eutanásia, sendo que nenhuma alteração patológica foi observada na cavidade peritoneal e torácica. Além disso, nenhum efeito relevante após o tratamento com guaraná foi observado no exame histopatológico dos seguintes órgãos: baço, fígado, cérebro, intestinos e rins. Também não se notou nenhuma diferença do ganho de peso durante todo o experimento (Figura 6.1). Quando analisamos macroscopicamente os pulmões, as lesões visíveis de melanoma foram contadas e os resultados foram contabilizados na tabela 6.1. Nenhuma diferença significativa foi notada no que concerne ao total de lesões macroscópicas após o tratamento com guaraná (CO: $38,16 \pm 23,77$, GUA: $30,33 \pm 16,19$ lesões/animal; $p=0,56$; Tabela 6.1; Figura 6.2). Adicionalmente, nenhuma alteração foi observada no número de lesões microscópicas (CO: $0,15 \pm 0,08$, GUA: $0,11 \pm 0,06$ lesões/mm²; $p=0,59$) após o tratamento com guaraná. Por outro lado, foi demonstrado que a administração da *P.cupana* levou a uma redução significativa de 3x no “tumor burden” (CO: $0,84 \pm 0,26$, GUA: $0,27 \pm 0,24\%$; $p = 0,0043$).

Figura 7.1 – Variação do peso vivo dos camundongos submetidos ao modelo de metástase experimental e tratados com guaraná

Figura 7.2 – Metástase representativa de melanoma B16/f10 no pulmão de camundongo submetido ao modelo de metástase experimental. (A) seção em aumento de 4x; (B) seção em aumento de 20x. Barra preta igual a 300 μm e barra verde igual a 30 μm

Tabela 7.1 – Análise das lesões macroscópicas, microscópicas, “tumor burden”, taxa de proliferação e de apoptose dos animais submetidos ao modelo de metástase experimental

Grupos (n)	Controle (6)	Guaraná (6)
Lesões macroscópicas totais	38.16 ± 23.77	30.33 ± 16.19
Lesões microscópicas por mm ²	0.15 ± 0.08	0.11 ± 0.06
<i>Tumor Burden</i> (%)	0.84 ± 0.26%	0.27 ± 0.24%*
Células positivas para PCNA (%)	23.75 ± 20.55%	9.99 ± 3.94*
Taxa de apoptose (M ± SD)	66.94 ± 22.94	324.37 ± 266.74*

(n) = número de animais por grupo; PCNA = Antígeno Nuclear de Células em Proliferação; *p < 0.05 comparado ao grupo controle

Para podermos entender melhor este efeito da administração do guaraná, neste experimento nós contamos as células positivas para PCNA de todas as metástases encontradas nas seções pulmonares avaliadas de cada animal dos dois grupos. Os resultados mostraram que o guaraná reduziu 2,4 vezes a proliferação das células dos melanomas (CO: 23,75 ± 20,55, 9,99 ± 3,94%; p = 0,026) quando comparados aos animais do grupo controle (Tabela 6.1 e Figura 6.3). Além deste efeito na proliferação celular, o guaraná também aumentou a taxa de apoptose nas metástases de melanoma. As células tumorais em apoptose foram encontradas randomicamente e geralmente sozinhas por todas as lesões de melanoma analisadas (Figura 6.4). A taxa de apoptose das lesões dos animais controle e dos tratados com guaraná são demonstrados na tabela 6.1, e foi demonstrado um aumento significativo após o tratamento com guaraná (CO: 66,94 ± 22,94, GUA: 324,37 ± 266,74 eventos/mm²; p = 0,0152).

Figura 7.3 – Imunoistoquímica para PCNA em seções pulmonares dos camundongos controle e tratados com guaraná. (A) Controle positivo para PCNA, baço; (B) metástases representativas encontradas no grupo controle; (C) metástases representativas encontradas no grupo tratado com guaraná; Todas as figuras em aumento de 400x. As barras têm tamanho de 30 μ m

Figura 7.4 – Avaliação de apoptose por luz clara e fluorescente em seções pulmonares dos animais submetidos ao modelo de metástase experimental. (A) melanoma corado com H&E em luz clara, sendo que a seta indica um corpúsculo apoptótico; (B) O mesmo tumor sob fluorescência, onde a seta indica um corpúsculo apoptótico arredondado. (C) A imagem sobreposta das duas fotomicrografias anteriores mostrando a co-localização do corpúsculo apoptótico. A célula apoptótica apresentou-se como corpúsculo acidofílico com fragmentação da cromatina acompanhada por condensação citoplasmática. Todas as figuras em aumento de 400x. As barras têm tamanho de 30 μm

7.4 DISCUSSÃO

Metástases são definidas como sendo implantes tumorais descontínuos do tumor primário, e são consideradas malignas porque tumores benignos não metastatizam (KUMAR, V.; ABBAS; FAUSTO, 2004). O extravasamento das metástases ocorre geralmente em estágios tardios do processo carcinogênico, caracterizados pela fase de progressão da carcinogênese (FIDLER, 2003). Adicionalmente, as metástases podem se disseminar por três grandes vias: descolando do tumor e implantando em cavidades e superfícies próximas, disseminação linfática e hematogena (KUMAR, V.; ABBAS; FAUSTO, 2004). O modelo utilizado aqui de injeção intravenosa das células de melanoma B16/f10 nos camundongos C57Bl/6 é considerado como sendo um modelo de metástases experimental já que as células entram diretamente na corrente sanguínea e crescem primariamente nos pulmões (WELCH, 1997). Dependendo da concentração das células injetadas, a sobrevivência dos camundongos é alterada. Por isso, em nosso experimento nós injetamos 5×10^5 células por animal, e estes foram eutanasiados após 14 dias. Na dose testada aqui, 2000mg/kg de guaraná por 21 dias não gerou efeitos tóxicos em 4 órgãos importantes: fígado, baço, cérebro e rim, e não causou alterações no peso corpóreo dos animais da mesma maneira mostrada em outros trabalhos já publicados (FUKUMASU et al., 2006a; FUKUMASU et al., 2006b). A avaliação macroscópica dos pulmões revelou a presença de metástases de melanoma em ambos os grupos, variando em número e tamanho. Os resultados macroscópicos nos levaram a concluir que o tratamento com guaraná não teve efeito na colonização e estabelecimento das células tumorais no pulmão. Concordando com esta afirmação, o número de lesões microscópicas por mm^2 foi igual entre o grupo controle e o tratado com guaraná, suportando a idéia que o guaraná não teve efeito em alguns passos importantes da cascata metastática (FIDLER, 2003) neste modelo experimental.

Por outro lado, a análise histológica dos pulmões gerou novas informações após a análise da área acometida por lesão ("tumor burden"). Verificamos que os animais tratados com guaraná apresentaram menor "tumor burden" que os animais do grupo controle ($p=0,0043$) sendo que este interessante resultado direcionou-nos a determinar o balanço entre proliferação e morte das células tumorais. Para isto, primeiramente determinamos o índice de proliferação pela detecção de células positivas para PCNA. A proteína PCNA

começa a acumular tardiamente na fase G1, atingindo seu pico na fase S e diminuindo nas fases G2 e M. Logo, a quantificação das células positivas para PCNA em um determinado tecido é um método útil para avaliar a taxa de proliferação tecidual (BACCHI; GOWN, 1993). Neste modelo animal, as células tumorais dos animais tratados com guaraná mostraram uma redução no número de células positivas para PCNA ($p=0,026$), a qual foi correlacionada com um menor estado proliferativo destes tumores. Estes resultados são semelhantes com nossos resultados previamente publicados onde o guaraná reduziu a incidência e multiplicidade dos focos de células alteradas hepáticas, por diminuir sua proliferação (FUKUMASU et al., 2006b). Ambos os modelos demonstraram que o guaraná pode efetivamente controlar o crescimento celular de células alteradas desde pouco transformadas (focos de células alteradas hepáticas) até células muito malignas (melanomas) em experimentos *in vivo*.

É sabido que em células tumorais é normal os mecanismos de apoptose estarem alterados e que estes efeitos são fundamentais no processo carcinogênico. As células neoplásicas sofrem alterações que diminuem sua suscetibilidade a apoptose e é considerado que a reversão deste processo é um ponto chave na quimioterapia do câncer. A técnica utilizada neste experimento para detectar apoptose é útil para avaliar o número de corpúsculos apoptóticos em seções coradas com H&E, baseando-se em uma propriedade de coloração da eosina nos corpúsculos, que fluorescem quando expostos a certas condições de luz ultravioleta. Além disso, para se ter certeza nesta análise, nós confirmamos todos os corpúsculos apoptóticos encontrados sob luz clara (STINCHCOMBE et al., 1995), onde se procurou os sinais clássicos de apoptose (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). As principais vantagens deste método são: rápido reconhecimento dos corpúsculos apoptóticos, os quais são algumas vezes de difícil visualização sob a luz clara, e aproximadamente 3 vezes mais sensível que o método padrão de análise em luz clara das seções H&E, sendo então uma excelente técnica para comparar a apoptose entre diferentes grupos. Seguindo estas informações, nós quantificamos a taxa de apoptose dividindo o número total de eventos apoptóticos pela área total de melanoma analisada. O tratamento com guaraná promoveu um aumento de 5 vezes na taxa de apoptose, contribuindo assim para a extensa redução do “tumor burden”. Este efeito, associado com a menor proliferação celular, indica que o guaraná tem um potencial efeito de controle de crescimento neste modelo.

Seguindo a re-orientação da ênfase na pesquisa do câncer que direcionará maiores recursos preferencialmente para a prevenção do que para o tratamento da doença de estágio tardio (SPORN; SUH, 2002b), estudos estão sendo conduzidos para isolar as substâncias responsáveis por este efeito do guaraná. É sabido que o guaraná é rico em cafeína e taninos (HENMAN, 1982b; CAMPOS et al., 2003), e que a cafeína tem um papel importante no controle do processo metastático (YANG et al., 2004), principalmente pela maior expressão de diversos genes relacionados a matriz extracelular como *Fbln1*, *Bgn*, *Sparc*, *Fbn1*, *Loxl1*, *Col1a1*, *Col3a1*, *Col5a1*, *Col5a2*, *Col5a3*, *Col6a1*, *Col6a2*, e *Col6a3*. Por outro lado, os efeitos antitumorais de catequinas (uma classe de taninos) presentes no chá-verde são muito bem descritos na literatura (KANDASWAMI et al., 2005; KIMURA, 2005). O guaraná contém catequina, epicatequina, ent-epicatequina e as procianidinas B1, B2, B3, B4, A2 e C1 (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007), sendo que algumas destas substâncias também são encontradas no chá-verde. Possivelmente, as substâncias mencionadas acima podem ser pelo menos em parte responsáveis por estes efeitos do guaraná observados neste estudo. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo mostrando que o guaraná controla o crescimento *in vivo* de metástases de melanoma por dois pontos-chave do câncer (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000): reduz a proliferação celular e aumenta a morte celular por apoptose.

Capítulo 8

Efeito antineoplásico do guaraná sobre o tumor de Ehrlich

A ser publicado com o título: "Paullinia cupana decreases proliferation of Ehrlich ascites carcinoma cells by inducing a G1 arrest through altered levels of p27^{Kip1} and cyclin-D1"

- 8 A *Paullinia cupana* diminui a proliferação do Tumor Ascítico de Ehrlich por induzir parada do ciclo celular na fase G0/G1 devido a níveis alterados de p27^{KIP1} e ciclina-D1**

Heidge Fukumasu^a, Andreia Oliveira Latorre^a, Maria Lucia Zaidan-Dagli^a

^a Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

O tratamento do câncer e sua cura são considerados um dos mais desafiadores problemas da medicina. Logo, a busca por novas drogas as quais têm como alvo vias moleculares específicas relacionadas com oncogenes ou genes supressores de tumor são essenciais. Neste sentido, atualmente tem se estudado os efeitos da *P.cupana* Mart var. *sorbilis*, também conhecida como guaraná, uma planta brasileira que pertence a família Sapindaceae. Até o momento seus efeitos estão sendo investigados em modelos de câncer em animais como um agente quimiopreventivo e/ou terapêutico do câncer, sendo demonstrado até agora efeitos inibitórios. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar outro efeito da *P. cupana*, o efeito antiproliferativo, em animais inoculados com o Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE). Para isto, camundongos BALB/c foram tratados por 7 dias com três doses de *P.cupana* (100, 1000 e 2000 mg/kg), injetados com 10^5 células de TAE e tratados por mais 14 dias. Em outro experimento, avaliamos a sobrevivência dos animais no mesmo molde experimental. O volume ascítico, número de células, porcentagem das fases do ciclo celular, os níveis protéicos de ciclina D1 e de p27^{KIP1} e a expressão gênica da ciclina D1 foram analisados. Pôde-se observar que o tratamento com guaraná diminuiu o volume ascítico ($p=0,0120$) e o número total de células de TAE ($p=0,0004$). Isto ocorreu devido a uma indução de parada na fase G0/G1 do ciclo celular ($p<0,01$) a qual foi induzida pela menor expressão de ciclina D1 e maior de p27^{KIP1}. Além disso, o guaraná aumentou a sobrevivência dos animais com TAE ($p=0,0012$). Concluindo, o guaraná tem efeito antitumoral por diminuir a proliferação das células tumorais neste modelo animal.

8.1 INTRODUÇÃO

O tratamento do câncer e sua cura são considerados um dos mais desafiadores problemas da medicina atualmente (CHABNER; ROBERTS, 2005). Contribuindo para esta dificuldade está a grande gama de alterações genéticas no câncer, já que mesmo tumores de um mesmo tipo e grau histopatológico igual podem ter alterações genéticas completamente diferentes. Desta maneira, a busca por novas drogas que tenham como alvo vias moleculares específicas relacionadas aos oncogenes ou genes supressores de tumor é essencial. No que se concerne aos produtos naturais, estes são considerados grandes fontes para estas novas drogas, já que mais de 60% das novas entidades químicas são isoladas de produtos naturais ou mimetizam seus efeitos (CHABNER; ROBERTS, 2005). Recentemente, as plantas da família Sapindaceae foram consideradas importantes e que deveriam ter uma atenção especial ao potencial efeito anti-leucêmico (CRAGG; NEWMAN; YANG, 2006). A *Paullinia cupana*, também conhecida como guaraná é uma destas plantas e atualmente está sob investigação em nosso laboratório em modelos experimentais de câncer e tem mostrado efeitos quimiopreventivos interessantes (FUKUMASU et al., 2006b).

A *P.cupana* é um arbusto original do Brasil, mais precisamente da região de Maués na floresta Amazônica, que tem sido utilizada por séculos como um agente estimulante pelos índios Sateré-Maués (HENMAN, 1982b). Hoje em dia, esta planta tem sido usada como parte de diversas bebidas não alcoólicas, tônicas, assim como de medicamentos fitoterápicos complementares e alternativos principalmente como anti-estresse e para perda de peso. O guaraná possui atividade antioxidante *in vitro* bem descrita (MATTEI et al., 1998a; BASILE et al., 2005; MAJHENIC; SKERGET; KNEZ, 2007; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007) e *in vivo* também por aumentar a atividade da superóxido dismutase levando a proteção do DNA contra a lesão genotóxica induzida pela DEN (capítulo 4). Em nosso laboratório já demonstramos em modelos experimentais em camundongos que a *P.cupana* apresentou efeito quimiopreventivo em modelo de hepatocarcinogênese (FUKUMASU et al., 2006b) e efeito antitumoral em metástases de melanoma B16/f10 (FUKUMASU et al., 2008). Nestes dois experimentos, os animais tratados com *P.cupana* apresentaram menor proliferação celular diminuindo a expressão do PCNA tanto por análise imunoistoquímica como por

western blot. No entanto, nenhuma caracterização das alterações nas vias moleculares devido ao tratamento com o guaraná fora estudada.

Algumas das vias mais alteradas nas células cancerosas são aquelas relacionadas ao controle do ciclo celular. O ciclo celular dos mamíferos é dividido em 4 fases (G1, S, G2 e M), com a presença de pontos de checagem que são controlados pelos níveis de quinases dependentes de ciclinas (CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6) e suas coenzimas ativadoras essenciais, as ciclinas (A, B, D e E). A atividade quinase destas CDKs é regulada principalmente pela abundância das ciclinas e suas interações com os inibidores de CDK como p16^{ARF}, p21^{WAF1} e p27^{KIP1}. A ciclina D1 acumula durante a fase G1 e regula a atividade quinase de CDK4 e CDK6, sendo estas responsáveis pela fosforilação de pRB. A ativação de pRB leva a passagem pelo ponto de checagem G1/S e a proliferação celular é ativada. É conhecido que a super-expressão da ciclina D1 ocorre com frequência em uma grande variedade de carcinomas (LU; GLADDEN; DIEHL, 2003), sendo então considerado um oncogene. Por outro lado, a proteína p27^{KIP1} é um regulador negativo da fase G1 e é considerado um gene supressor de tumor (KIM, Y. T.; ZHAO, 2005) além de estar implicada na regulação negativa da proliferação celular em resposta à sinais extracelulares e a privação de soro. Quando super-expresso, p27^{KIP1} impede as células de entrarem na fase S (SHIOZAWA et al., 2001).

É interessante notar que os polifenóis do chá verde (*Camellia sinensis*) e principalmente a epigallocatequina-3-galato inibem a proliferação de células cancerosas de mama humana *in vitro* e *in vivo* por induzir a parada na fase G1 devido a diminuição da expressão das ciclinas D e E (THANGAPAZHAM et al., 2007). Além disso, as saponinas do ginseng (*Panax ginseng*) apresentaram efeito antiproliferativo por alterar a expressão da ciclina D1 e do inibidor de CDK p21^{WAF} (LIU, W. K.; XU; CHE, 2000). De acordo com estas evidências, nosso objetivo neste trabalho foi reportar o efeito antiproliferativo do guaraná em animais inoculados com TAE. Assim, observamos que o controle da proliferação ocorreu devido a uma parada na fase G1, induzida simultaneamente pela diminuição na expressão da ciclina D1 e aumento na proteína p27^{KIP1}.

8.2 MATERIAL E MÉTODOS

8.2.1 Anticorpos e reagentes

Os reagentes Trizma, vermelho de Ponceau, azul de Comassie, iodeto de propídeo, anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase, anticorpo IgG anti-camundongo e anticorpo primário A-actina foram obtidos da Sigma Chemical Co (Saint Louis, EUA). Os anticorpos anti-ciclina D1 e anti-p27^{KIP1} foram adquiridos da Santa Cruz Biothecnology (Santa Cruz, EUA). O leite desnatado e o kit LSAB foram obtidos da Dako (Dinamarca). O ensaio de quantificação protéica foi adquirido da Bio-Rad (Hercules, EUA). A RNase, os primers oligo-DT, a enzima superscript II e o reagente Platinum SyBr Green foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, EUA). Os primers foram feitos pela IDT Technologies (Coralville, EUA). Todos os outros reagentes eram de grau analítico.

8.2.2 Animais

Cinquenta e duas fêmeas (BALB/c) com 3 meses de idade foram mantidas no biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP num ciclo de 12 horas de luz, sobre condições controladas de temperatura ($20 \pm 4^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa ($55 \pm 10\%$). Os camundongos tiveram acesso livre a ração (Nuvilab-CR1®, Nuvital Nutrientes LTDA, Brasil) e a água filtrada. Todos os procedimentos foram realizados seguindo-se as normas de utilização e cuidados do Instituto Nacional de Saúde dos EUA (CLARK et al., 1996) além de terem sido revisados e aprovados pelo comitê de bioética da FMVZ-USP (processo número 953/2006).

8.2.3 Guaraná (*Paullinia cupana*)

O pó de guaraná foi fornecido pela EMBRAPA Amazônia Ocidental (Amazônia, Brasil) e foi conservado em condições secas à $\pm 4^{\circ}\text{C}$ até a administração. A análise química e bromatológica do guaraná (Tabela 2.1) foi publicada previamente (FUKUMASU et al., 2006b). A quantificação da cafeína na amostra de guaraná foi realizada conforme publicado anteriormente (PAGLIARUSSI; FREITAS; BASTOS, 2002) e atingiu 1,02% na matéria seca da amostra. Para isto, 50 mg do pó de guaraná foram diluídos em 10 ml de etanol absoluto contendo 0,1mg/ml de controle interno (7-beta-hidroxi-etil-teofilina) e foi submetida a agitação constante por 2 horas. Então, o material foi filtrado e 1 μl desta amostra foi injetada num detector de Nitrogênio/Fósforo acoplado a cromatografia gasosa (GC/DNP). As doses de guaraná utilizadas neste experimento foram baseadas em trabalhos previamente publicados (MATTEI et al., 1998a; FUKUMASU et al., 2006b).

8.2.4 Protocolo experimental

Quarenta animais foram divididos igualmente em 4 grupos como se segue: controle, 100mg/kg, 1000mg/kg e 2000mg/kg. As doses de guaraná foram administradas orogastricamente (gavagem) uma vez ao dia até os animais serem eutanasiados. Os animais do grupo controle receberam apenas água. No dia 7, todos os animais foram injetados com 2×10^5 células do TAE e tratados por mais 14 dias até serem eutanasiados por ruptura cervical (Figura 8.1). Neste momento, o fluído ascítico de todos os animais foi coletado e quantificado. Para a análise de sobrevivência, os animais foram tratados com água (controle) ou guaraná (2000mg/kg) por 7 dias, injetados com 2×10^5 células de TAE e tratados com as mesmas doses até o dia em que morreram (Figura 8.1).

As células de TAE foram contadas pela coloração de azul de Tripán, conforme descrito anteriormente (SAKAI et al., 2006). Para isto, 10 μl do fluído ascítico foram diluídos em 390 μl de solução de azul de Tripán. As células foram contadas em hemocítômetro de

Neubauer com aumento de 10x. Além disso, foi dado um valor para o grau da hemorragia ascítica encontrada nos animais (Figura 8.2).

Figura 8.1 – Protocolo experimental utilizado com o Tumor Ascítico de Ehrlich. (A) Análise dos efeitos do guaraná sobre os animais inoculados com TAE aos 7 dias. (B) Análise dos efeitos do guaraná sobre a sobrevivência dos animais inoculados com TAE

8.2.5 Análise por citometria de fluxo

A análise do ciclo celular em que as células de TAE se encontravam foi realizada conforme publicado previamente (SAKAI et al., 2006). Para isto, 10^6 células de cada animal foram fixadas e conservadas em etanol 70% por uma semana (-20°C). Então as células foram lavadas duas vezes com PBS (5 minutos, 1200rpm) e incubadas com 200 μl de solução contendo 20 $\mu\text{g/ml}$ de Iodeto de Propídeo, 200 $\mu\text{g/ml}$ RNase A e 0,1% de Triton 100x em PBS. Após 30 minutos, de incubação no escuro a 37°C , 10000 eventos foram adquiridos por citômetro de fluxo (FACScan Becton Dycson®, BD Biosciences, San Jose, EUA) utilizando o filtro FL2 ($585\pm 42\text{ nm}$). As amostras foram analisadas pelo programa FlowJo 7.2.2 (Tree star Inc, Asland, EUA) e os resultados expressos em % de células nas fases G0/G1, S ou G2/M.

8.2.6 Western blot para ciclina D1 e p27^{kip1}

Cerca de 1×10^7 células de TAE coletadas de cada camundongo foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e conservadas à -80°C até sua análise. Para isto, estas foram homogeneizadas diretamente em tampão de amostra (*Sample Buffer*; 1M Tris-HCl, pH 6,8; 10% SDS; 10% glicerol). Posteriormente, foi adicionada a solução de trabalho (*Working solution*; M, pH 6,8, contendo 10% SDS, 10% glicerol, 1M DTT, e 10 mM PMSF) e a suspensão foi centrifugada (13000 rpm, 15 minutos, 4°C) sendo o sobrenadante recolhido e congelado até sua utilização. A quantificação das proteínas foi realizada com o reagente Bio-Rad Protein Assay, baseado no método de Bradford (BRADFORD, 1976) antes de se realizar o SDS-Page (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio). Então, 100 μg de proteínas totais foram carregadas e separadas por eletroforese num gel de 12% de poliacrilamida-SDS (100 V; 2,5 horas). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para a membrana de PVDF (Polivinilideno difluoreto) em condições úmidas. Posteriormente, a transferência das proteínas foi analisada por coloração com vermelho de Ponceau seguida de várias lavagens com tampão TBS-T. Para bloquear os sítios de ligação inespecíficos, as membranas foram incubadas com tampão de bloqueio (5% de leite desnatado em TBS-T) por

duas horas em agitação leve e contínua. Então, a membrana foi incubada com os anticorpos primários anti Ciclina D1 e p27^{KIP1} diluídos em tampão de bloqueio por toda a noite (4°C). Após a incubação descrita acima, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário específico (IgG) conjugado a peroxidase (diluído em TBS-T) por duas horas a temperatura ambiente sob agitação leve e contínua. Finalmente as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T e expostas ao reagente ECL por 1 minuto conforme as instruções do fabricante (GE Healthcare). Os filmes de raio-X foram expostos às membranas e revelados de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare). As membranas foram lavadas em TBS-T, secas, reidratadas em metanol e em TBS-T e limpas com solução de limpeza (*Stripping solution*; 62.5 mM Tris pH 6.8, 2% SDS and 100 mM 2-mercaptoetanol) por 40 minutos à 50°C. Na sequência, as membranas foram lavadas extensivamente com TBS-T até o odor característico do 2-mercaptoetanol não ser perceptível. Então as membranas foram bloqueadas novamente com solução de bloqueio e incubadas com o anticorpo anti-alfa-actina conforme descrito acima.

8.2.7 Análise da expressão gênica

O RNA total foi isolado a partir de 1×10^6 células de TAE coletadas de cada camundongo e congeladas com o kit Perfect RNA Eukaryotic Mini (Eppendorf) seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram então quantificadas em biofotômetro e a razão A260/A280 foi analisada, sendo que apenas as amostras que tiveram seus valores entre 1,7 e 2,0 e apresentaram boa qualidade e integridade na análise no gel de agarose (1,5% em tampão tris-acetato-edta) foram usadas. Um micrograma de RNA total foi transformado em cDNA pela enzima superscript II com primers OligoDT conforme o fabricante recomenda. Então, a reação de PCR em tempo real foi realizada no termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Para a análise da ciclina D1, foi usado o ensaio baseado na incorporação de SYBR Green. Os primers para este gene foram desenhados com auxílio do programa Primer-3 (ROZEN; SKALETSKY, 2006) e analisados no programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) para verificar a ausência de alinhamentos locais com DNA ou outros transcritos de RNA. Os seguintes primers foram usados, Ciclina D1_F:

CGTGGCCTCTAAGATGAAGG e Ciclina D1-R: TTGAGCTTGTTACCAGAAGC, com produto esperado de 123 pb. Por fim, a análise da expressão relativa do gene foi realizada de acordo com o método de LIVAK; SCHMITTGEN (2001).

8.2.8 Análises estatísticas

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão quando não indicado. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para comparações entre mais de dois grupos, e o teste Mann-Whitney para comparações entre dois grupos. Para a análise do ciclo celular, foi utilizada ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni. Por fim, a comparação das curvas de sobrevida foi realizada com o teste Log-rank. Diferenças significativas foram consideradas a partir de $p < 0,05$.

8.3 RESULTADOS

8.3.1 A *P.cupana* reduz o crescimento das células de TAE e sua malignidade

Todos os animais neste experimento desenvolveram o TAE independente do tratamento com *P.cupana*. Após 14 dias da inoculação, o tratamento com 2000mg/kg reduziu em 45% o volume do fluido ascítico (Controle = $8,65 \pm 2,43$ ml; 2000mg/kg = $4,7 \pm 3,13$ ml; $p=0,0120$; Figura 8.2). Além disso, o número total de células de TAE foi reduzido pelo tratamento com guaraná (Controle = $146,98 \times 10^7 \pm 36,86 \times 10^7$ células; 2000mg/kg = $66,99 \times 10^7 \pm 40,30 \times 10^7$ células; $p=0.0004$; Figura 8.2). O grau hemorrágico do fluido ascítico ocorreu devido ao extenso vazamento de eritrócitos para a cavidade peritoneal, e é geralmente relacionada com a malignidade do TAE (HARTVEIT, 1965; MAYER, 1966). Portanto, nós classificamos a ascite hemorrágica em quatro diferentes níveis (Figura 8.2). Interessantemente, a *P.cupana* também diminuiu o grau de hemorragia no fluido ascítico, indicando uma menor malignidade do TAE nos animais tratados com *Paullinia cupana*.

Figura 8.2 – Efeitos da *P.cupana* nos camundongos inoculados com TAE. (A) Volume ascítico no dia 21 após a eutanásia. Notar que o tratamento com a planta na maior dose diminuiu o volume ascítico significativamente. (B) Número total de Células de TAE. Notar também que o tratamento na maior dose reduziu o número total de células. (C) Nível de Hemorragia Ascítica. A *P.cupana* diminuiu o grau de hemorragia no fluído ascítico dos animais inoculados com TAE. (D) Os diferentes graus de hemorragia ascítica encontrados neste experimento. * - $p < 0,05$; ** $P < 0,01$

8.3.2 A *P.cupana* induz parada na fase G1 nas células do TAE

Após caracterizar que o tratamento com o guaraná induziu um controle no crescimento das células do TAE em camundongos, nós estudamos a distribuição das fases do ciclo celular em que estas células se encontravam para determinar se esta redução no número de células era devido a *P.cupana* induzir alterações na progressão do ciclo celular. Como esperado, o tratamento com a planta induziu uma parada na fase G1 nas duas maiores doses de guaraná (Controle = $37,31 \pm 5,28$ %; 1000mg/kg = $42,69 \pm 5,48$ %;

2000mg/kg = $43,40 \pm 5,82$ %; $p < 0,01$; Figura 8.3). Este efeito foi responsável por diminuir as células na fase S na dose de 1000 mg/kg (Controle = $38,87 \pm 4,25$ %; 1000mg/kg = $33,35 \pm 4,85$ %; $p < 0,01$; Figura 8.3). Nenhuma diferença foi notada nas fases sub-G1 e G2/M referentes ao tratamento com *P.cupana*.

8.3.3 O tratamento com *P.cupana* aumenta a proteína p27^{kip1} e reduz a expressão de ciclina d1 nas células do TAE

Para avaliar as vias moleculares que o tratamento com *P.cupana* levam à parada do ciclo celular na fase G1, nós analisamos os níveis protéicos do inibidor do ciclo celular p27^{KIP1} e da ciclina D1. Realmente, os níveis de p27^{KIP1} estavam aumentados após o tratamento com *P.cupana* nas doses de 1000 e 2000 mg/kg (Figura 8.4). Além disso, foi demonstrado que ocorreu uma diminuição tanto na expressão do gene da ciclina D1 (Figura 8.5) como nos níveis protéicos de ciclina D1 (Figura 8.4). Ambos os efeitos levaram a diminuição da proliferação celular parando as células tumorais na fase G1.

Figura 8.3 – Análise do ciclo celular das células do TAE. (A-D) Histogramas representativos das células do TAE de camundongos dos grupos controle e tratados com guaraná [respectivamente controle (A), 100(B), 1000(C) e 2000 mg/kg(D)]. O tratamento com a planta induziu parada na fase G1 nas doses de 1000 e 2000 mg/kg; * - $p < 0,01$

Figura 8.4 – Análises por western blot das células de TAE coletadas dos camundongos tratados com *P.cupana*. (A) Bandas das proteínas p27^{KIP1}, Ciclina D1 e alfa-actina. (B) Análise densitométrica dos níveis de proteína ciclina D1. É notável que a expressão da ciclina D1 foi reduzida nos animais tratados com a planta. (C) Análise densitométrica dos níveis protéicos de p27^{KIP1}. Notar que os níveis são aumentados em ambas as doses de *P.cupana* em relação ao grupo controle. Foram utilizados três animais por grupo para estas análises

Figura 8.5 – Análise por PCR em tempo real da expressão da Ciclina D1. A análise mostrou que a ciclina D1 teve uma redução em sua expressão após o tratamento com *P.cupana* (2000mg/kg). Cinco animais por grupo foram utilizados nesta análise; * - $p=0,0286$

8.3.4 O tratamento com *P.cupana* aumenta a sobrevida dos animais inoculados com TAE

Mesmo sendo demonstrado que o tratamento com o guaraná apresenta um efeito inibitório sobre o crescimento das células de TAE, a análise da sobrevida é essencial para verificar se estes efeitos apresentam qualquer significância. Então, nós realizamos outro experimento utilizando-se apenas a dose mais alta de *P.cupana*, e injetamos os animais com 2×10^5 células de TAE, pela via intraperitoneal, no dia 7 de tratamento com a planta e continuamos a tratá-los com a planta todos os dias até eles morrerem. Como esperado, o tratamento com a planta aumentou a sobrevida dos animais em 15% (Mediana do grupo controle = 21 dias; 2000mg/kg = 24 dias; $p = 0,0012$; Figura 8.6). É importante salientar que este modelo tumoral é extremamente agressivo, e este aumento da sobrevida é bastante significativo levando-se em conta a média de dias de vida dos animais após serem inoculados com o TAE (21 dias).

Figura 8.6 – Curva de sobrevida dos camundongos inoculados com TAE. O tratamento com o guaraná aumentou a sobrevida dos animais significativamente ($p=0,0012$). Foram utilizados 6 animais por grupo neste experimento

8.4 DISCUSSÃO

Mesmo com os imensos investimentos durante os últimos 30 anos sendo feitos em diversas áreas da pesquisa sobre o câncer, desde a ciência básica à clínica e terapêutica, esta doença continua a matar muitas pessoas todos os dias. Atualmente, uma em cada quatro mortes nos EUA ocorre por causa do câncer (JEMAL et al., 2008). É estimado que mais de dois terços de todos os cânceres em humanos poderiam ser prevenidos por modificações no estilo de vida das pessoas (SURH, 2003a). Estas incluem o consumo de frutas e vegetais, os quais são considerados excelentes fontes de substâncias preventivas do câncer (SURH, 2003a). Neste contexto, nosso experimento avaliou o potencial quimiopreventivo de câncer da *Paullinia cupana* sobre células tumorais crescendo *in vivo*.

O tumor de Ehrlich é um tumor de origem epitelial, pois se originou de um explante de adenocarcinoma mamário de camundongo. Entre os diferentes tipos de tumor, os de origem epitelial são os mais comuns em humanos – como os que ocorrem no pulmão, mama, próstata, cólon, pâncreas e ovário – e até hoje são responsáveis por um grande número de mortes, o que induz um ultimato racional para tentativas baseadas em prevenção (SURH, 2003a). Assim, neste experimento, com o intuito de avaliarmos a ação quimiopreventiva do guaraná nós avaliamos os animais todos os dias e eutanasiávamos eles quando o TAE apresentou crescimento exponencial. Isto é imperativo quando se usa este modelo experimental, já que, se for escolhido avaliar o crescimento celular tumoral numa fase mais tardia, ocorre um número maior de células mortas além das restantes proliferarem mais devagar, podendo tornar as curvas de crescimento de um grupo tratado em relação ao controle sem diferença relevante. Nós não avaliamos a ação da *P.cupana* neste experimento sobre alterações no peso corpóreo porque esta já foi descrita em experimento anterior (FUKUMASU et al., 2006b), além do capítulo 4. Como citado acima, a hemorragia do fluído ascítico ocorreu devido ao extensivo extravasamento de eritrócitos pelos capilares danificados na cavidade peritoneal e isto geralmente é relacionado com a malignidade do TAE (HARTVEIT, 1965; MAYER, 1966). A intensa inflamação induzida pelas células tumorais na cavidade peritoneal leva ao extenso extravasamento de glóbulos brancos, degradando os delicados capilares presentes nas paredes do peritônio. Simultaneamente as células vermelhas caem na cavidade gerando a hemorragia. Quanto mais o TAE cresce, o processo

inflamatório aumenta e a hemorragia se torna mais intensa. No geral, o tratamento com a *P.cupana* reduziu a hemorragia em todos os animais do grupo que recebeu 2000mg/kg (Figura 8.2). Este efeito aconteceu secundariamente ao menor número de células tumorais observado nos animais tratados com a planta.

O efeito quimiopreventivo da *P.cupana* já foi demonstrado em um modelo de hepatocarcinogênese em camundongos (FUKUMASU et al., 2006b), onde ocorreu redução do número de lesões macroscópicas e menor proliferação celular. Além disso, esta planta demonstrou reduzir o tamanho das metástases pulmonares de melanoma B16/f10 em camundongos (FUKUMASU et al., 2008), por reduzir a taxa de proliferação celular e aumentar a de apoptose das células tumorais. Ambos os estudos demonstraram importante efeito da *P.cupana* sobre células transformadas variando desde pré-neoplásicas até fenótipos altamente malignos. Aqui, nós mostramos que a *P.cupana* controla o crescimento das células de TAE e como consequência, aumenta significativamente a sobrevivência dos animais inoculados com TAE. Reportamos que estes efeitos estão correlacionados com uma parada na fase G1 induzida pelo aumento de p27^{KIP1} e diminuição dos níveis de ciclina D1.

As ciclinas D1 são instáveis, e sua indução, síntese e conformação com seus parceiros catalíticos dependem totalmente da persistência dos sinais mitogênicos (SHERR, 2000). Neste sentido, estas ciclinas agem como sensores de fatores de crescimento, participando da ativação de quinases em resposta aos sinais extracelulares (SHERR, 1993). A expressão da ciclina D1 é controlada por mecanismos transcricionais, traducionais e pós-traducionais (TETSU; MCCORMICK, 1999; DRAGNEV et al., 2001), sendo esta proteína considerada como um alvo para a quimioprevenção do câncer (PETTY; DRAGNEV; DMITROVSKY, 2003). Neste trabalho, nós mostramos que os níveis de ciclina D1 diminuíram nos animais tratados com guaraná devido a menor expressão gênica da ciclina D1 nas células do TAE. Diversos fatores de transcrição regulam a expressão da ciclina D1, como a proteína ligante de elementos responsivos ao c-AMP (CREB), fator de transcrição ativador-2, Beta-catenina e o Receptor Ativado-Proliferador de Peroxissomos gama (PPAR γ) (BEIER et al., 1999; TETSU; MCCORMICK, 1999). Uma possível questão existente ainda para ser determinada em outra ocasião é se a *P.cupana* tem fitoquímicos que podem desativar alguns destes receptores especificamente.

Quando da sua descoberta, o inibidor do ciclo celular p27^{KIP1} não foi considerado um gene supressor de tumor, já que pelo menos um alelo dele estava presente nas células

tumorais quando desta caracterização. No entanto, existem evidências que esta proteína é haplosuficiente para a supressão tumoral, ou seja, que mesmo a perda de um alelo já é suficiente para contribuir a supressão de câncer (FERO et al., 1998). Seu efeito inibitório ocorre por impedir que a ciclina E ligue-se ao CDK2, desta forma diminuindo a fosforilação de pRB e conseqüentemente mantendo as células na fase G0/G1. As células do TAE quase não expressam p27^{KIP} como demonstrado na figura 8.4, e o tratamento com *P.cupana* aumenta seus níveis. Este resultado é similar ao mostrado em outro experimento onde os polifenóis do chá verde também induziram parada na fase G1 do TAE, diminuindo a fosforilação de pRB (KENNEDY et al., 2002). Em outro estudo, o ginsenosídeo RG3 (isolado da planta *P. giseng*) ativou a expressão de p21^{WAF} e p27^{KIP1} reduzindo a proliferação de células cultivadas de tumor de próstata humano (LIU, W. K.; XU; CHE, 2000). Nós sugerimos que a parada na fase G1 encontrada nas células de TAE dos animais tratados com *P.cupana* pode sim ter ocorrido por um aumento nos níveis protéicos de p27^{KIP1}. Ao melhor do nosso conhecimento, esta é a primeira vez que se demonstrou que uma parada na fase G1 do ciclo celular foi responsável pelos efeitos antiproliferativos do guaraná em células cancerosas.

Em conclusão, nós demonstramos que o tratamento com *P.cupana* por 21 dias em animais portadores de TAE aumentou a sobrevida destes. Este efeito ocorreu por uma parada na fase G1 das células tumorais induzida por uma menor expressão de Ciclina D1 e aumento de p27^{KIP1}. Entretanto, mais estudos são necessários para detectar se estas proteínas são os alvos específicos da *P.cupana* ou se outro alvo molecular pode ter induzido estes efeitos.

Capítulo 9

Efeitos do guaraná sobre células tumoriais em cultivo

A ser publicado sob o título: "Antiproliferative and cytotoxic effects of a Guarana extract on mouse lung tumor cells"

9 Efeito Citotóxico e Antiproliferativo de um Extrato de Guaraná Sobre Células Tumerais de Pulmão de Camundongos

Heidge Fukumasu^a, Marcia Kazumi Nagamine^a, Andreia Oliveira Latorre^a, Mitsue Haraguchi^b,
Ja Seok Koo^c, Maria Lucia Zaidan Dagli^a

^a - Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada, Departamento de Patologia,
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

^b - Instituto Biológico de São Paulo

^c - *Department of Thoracic/Head and Neck Medical Oncology, The University of Texas M. D.
Anderson Cancer Center, Houston, Texas*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os efeitos antitumorais de dois extratos padronizados de guaraná (*Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*) sobre as células tumorais E9 originárias de pulmão de camundongo. Para isto, foram realizados dois extratos com diferentes solventes (água e etanol absoluto). Ambos foram testados nas células E9 (variante tumoral) e E10 (variante não tumoral, porém imortalizada), nas quais se verificou que as doses que levaram a redução de 50% da população das células E9 (EC_{50} ETOHG = 1,10 mg/ml; EC_{50} AQUEG = 3,38mg/ml) e E10 (EC_{50} ETOHG = 1,52 mg/ml; AQUEG aquoso = 5,10 mg/ml) foram menores do extrato etanólico do que do extrato aquoso. Conforme esperado, ambos os extratos apresentaram maior efeito sobre as células tumorais, pois a concentração necessária para induzir a morte de 50% das células foi menor para as células tumorais. A partir deste dado avaliamos apenas os efeitos do extrato etanólico (ETOHG) sobre as células tumorais. Demonstrou-se que o ETOHG reduziu a proliferação celular de forma dose-dependente (a partir de 1,25 mg/ml; $p < 0,0001$) e diminuiu a expressão de PCNA (a partir de 0,08mg/ml; $p < 0,0001$). No entanto, não foram observadas alterações significativas no ciclo celular ou na expressão de p27. Apenas as células tratadas com 2,5 mg/ml apresentaram maior atividade de caspase-3 ($p < 0,0001$), indicando indução de apoptose apenas nesta concentração. Além disto, verificou-se que a exposição ao ETOHG reduziu a expressão da Cx43 de forma dose-dependente ($p < 0,0001$), e induziu um aumento da expressão do receptor CAR ($p = 0,0001$; 0,16 até 1,25 mg/ml), porém os valores voltaram ao normal na maior concentração avaliada (2,5 mg/ml). Não foi possível detectar as proteínas em sua forma ativada: CREB, p38 MAPK, p42/44 e SAPK-JNK devido à técnica utilizada de western blot. Desta forma, fica evidente que o efeito antitumoral do ETOHG é principalmente pela redução da proliferação celular. Embora, tenham sido observadas alterações na expressão de Cx43, PCNA e CAR ainda não é possível afirmar que estas pertençam ao mesmo mecanismo de ação antiproliferativo do guaraná neste modelo experimental, ou ainda que seja apenas consequência deste efeito. Assim, remanesce como pergunta para trabalhos futuros. Se estas duas alterações pertencem ao mecanismo de ação antiproliferativo do guaraná neste modelo experimental, ou são apenas consequência deste efeito, remanesce como pergunta para trabalhos futuros.

9.1 INTRODUÇÃO

Neoplasias pulmonares são responsáveis por mais de 1.100.000 mortes por ano mundialmente (KAMANGAR; DORES; ANDERSON, 2006) e mesmo com as diversas modalidades terapêuticas desenvolvidas e utilizadas para esta doença, o câncer pulmonar de células não-pequenas se mantém como uma doença agressiva e de mau prognóstico. Desta maneira, pesquisadores do mundo todo tentam encontrar novas alternativas para prevenção e tratamento destes tumores sendo que muitos têm estudado plantas com esta finalidade. Deste modo, há diversas drogas quimioterápicas para o tratamento de cânceres, que são provenientes de plantas como, por exemplo, os alcalóides da vinca (*Catharanthus roseus*), os taxanos (*Taxus brevifolia*), o etoposídeo (*Podophyllum peltatum*), a camptotecina (*Camptotheca acuminata*) etc.

O guaraná, *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, é uma planta nativa do Brasil, mais precisamente da floresta amazônica na região de Maués. Tem sido consumida há séculos como estimulante pelos índios Saterê-Maués, fato este que despertou o interesse comercial e científico nesta planta. Desta forma, diversos trabalhos com o guaraná foram publicados demonstrando outros efeitos além do estimulante, como potencial antioxidante, para perda de peso e como quimiopreventivo e antineoplásico (para maiores informações consultar o capítulo 2). No que tange aos efeitos sobre as células cancerosas demonstrou-se em mais de um modelo experimental que o guaraná tem efeito antitumoral por reduzir a proliferação celular e induzir apoptose (FUKUMASU et al., 2008; Capítulo 7). No entanto, até este experimento, sempre havíamos utilizado o guaraná em sua forma bruta, ou seja, o pó de guaraná era administrado diretamente aos animais ou misturado na ração ou por via orogástrica (gavagem). Porém, em modelos experimentais de carcinogênese em camundongos, geralmente é difícil caracterizar o mecanismo de ação de uma dada substância devido a diversas dificuldades encontradas como, por exemplo, tamanho das lesões (tumores são pequenos, raramente chegando a 5 mm de diâmetro), tempo de tratamento, custo da manutenção dos animais por períodos longos etc. Assim, como os efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos em camundongos do guaraná já haviam sido bem caracterizados (Capítulos 4, 5, 7, 8), partimos então para a confecção de diferentes extratos da planta com intuito de padronizar ainda mais a quantidade dos princípios ativos

que futuramente serão isolados. Além disso, estes extratos foram testados em células tumorais e não tumorais em cultivo *in vitro*, facilitando assim a verificação dos efeitos antitumorais e a possibilidade de se elucidar o seu mecanismo de ação. Escolhemos o par de células E9 e E10, isoladas do clone NAL-1A proveniente de explante de um pulmão de camundongo BALB/c e cultivado *in vitro* (SMITH, G. J.; LYKKE, 1985; SMITH, G. J. et al., 1986; KAMANGAR; DORES; ANDERSON, 2006). As células NAL-1A apresentam características semelhantes à pneumócitos do tipo II imaturos (células epiteliais alveolares do tipo II), como a presença de corpos lamelares e baixa expressão de fosfatidilcolina. A origem foi definida como epitelial já que estas células eram positivas para citoqueratina e não para vimentina. A célula não-tumoral E10 é um clone de NAL-1A e as células E9 tumorais foram selecionadas a partir das E10 expostas a dexametasona e que apresentaram resistência. Quando injetadas em camundongos singenéticos, ou seja, em camundongos imunocompetentes (BALB/c), apenas as células E9 cresciam e formavam tumores caracterizados posteriormente como adenocarcinomas. Logo, por todas estas características descritas acima, este par de células pode ser considerado uma ótima ferramenta para o estudo do fenótipo neoplásico, além de ser importante para avaliar a ação de novas substâncias antitumorais (MALKINSON et al., 1997). Desta maneira, avaliamos os efeitos dos extratos do guaraná sobre ambas as células. Demonstramos que o extrato etanólico foi mais efetivo que o aquoso e que existe certa seletividade em relação às células tumorais.

9.2 MATERIAL E MÉTODOS

9.2.1 Preparação dos extratos de guaraná

Dois extratos do guaraná foram preparados com a finalidade de se encontrar o mais efetivo contra as células tumorais estudadas. O extrato aquoso de guaraná (AQUEG) foi feito partindo-se de 100 g totais de guaraná em pó, sendo o mesmo utilizado nos experimentos descritos previamente. Então um litro de água destilada foi acrescentado e o volume foi agitado constantemente por 30 minutos. Posteriormente a solução foi evaporada em 2 horas a 60 °C em evaporador-condensador específico. O extrato foi então evaporado em rota-evaporador, sendo posteriormente o resíduo deixado secar com o auxílio de sílica. No extrato etanólico de guaraná (ETOHG), o pó de guaraná foi diluído em etanol 100% e sofreu o mesmo processamento descrito para o extrato aquoso. Posteriormente os extratos foram diluídos no próprio meio de cultura utilizado para cultivo celular na dose de 40 mg/ml.

9.2.2 Cultivos celulares

As células E10 (variante não transformada) e E9 (variante tumoral) foram gentilmente doadas pela Dra. Lucy M. Anderson sob os cuidados de sua técnica Janet Fields do Laboratório de Carcinogênese Comparada do Instituto Nacional do Câncer (Fredericks - EUA). Estas foram mantidas em nitrogênio líquido até sua utilização. O processo de descongelamento consistiu em manter o criotubo congelado em banho-maria à 37°C até que o conteúdo descongelasse parcialmente, sendo então rapidamente homogeneizado com dois volumes de meio de cultivo CMRL1066 adicionado de 10% de soro fetal. As células foram então centrifugadas a 1200 RPM por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet de células re-suspendido em meio de cultivo e as células foram colocadas em garrafas de cultivo adicionando-se 10µl/ml estreptomicina e 20 µl/ml L-glutamina. As células foram mantidas e replicadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida com 5% de CO₂. Quando

estas atingiram cerca de 70 a 80% de confluência, estas foram soltas da garrafa com solução de tripsina 0,05% à 37°C por 3 a 15 minutos, dependendo da linhagem (E10 soltavam-se rapidamente, E9 bem mais aderidas). Posteriormente, as células foram lavadas em dois volumes de meio de cultivo com 10% de soro fetal e centrifugadas por 10 minutos a 1200 RPM. Então as células foram re-suspendidas em 1 ml de meio de cultivo e contadas.

Para a contagem das células, 10 µl da suspensão celular foram diluídos em 90 µl de solução de Azul de Tripán (0,025%) e colocados em câmara de Neubauer para contagem em aumento de 100x. Contaram-se 4 campos e fez-se a média para chegar ao valor de número de células por ml.

9.2.3 Avaliação da citotoxicidade dos extratos do guaraná

Avaliou-se a citotoxicidade dos extratos de guaraná com doses variando entre 0,31 a 10,00 mg/ml em ambos os tipos de células. Para isto, foram utilizados ambos os cultivos de células E9 e E10, onde cerca de 5×10^3 células foram colocadas em placa de 24 poços e após 24 horas foram expostas as diferentes concentrações dos extratos de guaraná por 16 horas. Este experimento foi realizado em triplicata. Calculou-se a dose que inibiu 50% das células (EC50) utilizando-se dos dados observados neste experimento.

A princípio, o ensaio do MTT foi utilizado, porém como as células E9 aderem muito às placas, não foi possível recuperá-las e dissolver os cristais formados pela metabolização do composto MTT pelas células viáveis. Além disto, aparentemente o tom de cor dos extratos de guaraná atrapalharam a leitura do leitor de Elisa. Desta forma, preferimos avaliar o número de células pela técnica do azul de Tripán descrito anteriormente. Assim, foi possível avaliar as células vivas e mortas ao mesmo tempo.

9.2.4 Ensaio de proliferação celular

Para avaliar os efeitos do extrato de guaraná sobre a proliferação celular, foram realizados experimentos apenas com as células tumorais E9 e com o extrato de maior potencial citotóxico encontrado. Sendo assim, 2×10^3 células E9 foram colocadas em cada poço de uma placa de 96 poços contendo 200 μ l de meio de cultivo (descrito acima). Após 24 horas, o meio de cultivo foi retirado e colocado 200 μ l de meio de cultivo com as concentrações de guaraná variando entre 0,08 a 2,5 mg/ml. As células foram expostas por 24 horas, quando então foi retirado o meio contendo o guaraná e as células foram lavadas duas vezes com meio de cultivo. Posteriormente as células foram expostas a solução de Cristal violeta à 10% em meio de cultivo por 10 minutos e lavadas com água corrente. A placa foi colocada em estufa a 37°C até que todos os poços estivessem totalmente secos. Finalmente foram adicionados 100 μ l de metanol em cada poço para solubilização dos cristais e a placa foi analisada em leitor de ELISA a 540 nm.

9.2.5 Avaliação da morte celular por apoptose

As células E9 (5×10^5 células) foram colocadas em garrafas pequenas de cultivo celular nas mesmas condições descritas acima. Após 30 horas, o meio de cultivo foi trocado por novo meio contendo as diferentes concentrações de guaraná. Passadas 8 horas, o meio foi retirado, as células lavadas por duas vezes com meio de cultivo e então retiradas com auxílio de solução de tripsina (metodologia descrita acima). O teste de atividade da caspase-3 foi realizado seguindo as normas do fabricante (NucView 488™, Biotium, California, EUA). Resumidamente, as células foram contadas pela técnica de exclusão vital por azul de trypan e diluídas para 1×10^6 células/ml. Duzentos microlitros foram colocados em um tubo de citometria de fluxo e foram incubados por 30 minutos com 5 μ l de 0,2mM do substrato de Caspase-3 NucView™. Este substrato sofre a ação da caspase-3 e forma um composto fluorescente que se liga ao DNA das células em apoptose. Ao final dos 30 minutos, foram adicionados mais 300 μ l de PBS e as células foram analisadas em citômetro de fluxo

utilizando o canal FL1. Foram adquiridos 10000 eventos por amostra e os resultados são expressos em % da população com atividade de caspase-3. O experimento foi realizado em triplicatas e como controle positivo foi utilizada uma alíquota de células do grupo controle que foram expostas à 50°C por 15 minutos. O controle negativo recebeu um inibidor da caspase-3 simultaneamente com o reagente NucView™.

9.2.6 Análise das fases do ciclo celular

A distribuição das células pelas fases do ciclo celular foi estudada pela técnica da impregnação nuclear do iodeto de propídeo (PI). O PI é conhecido por intercalar-se entre as fitas de DNA, em células que foram previamente permeabilizadas pela fixação em etanol 70%. Para isto, 1×10^6 células E9 de cada amostra foram fixadas e conservadas em etanol 70% por três dias (-20°C). Então as células foram lavadas duas vezes com PBS (5 minutos, 1200rpm) e incubadas com 200 µl de solução contendo 20 µg/ml de PI, 200 µg/ml RNase A e 0,1% de Triton 100x em PBS. Após 30 minutos, de incubação no escuro, 10000 eventos foram adquiridos por citometria de fluxo (FACScan Becton Dycson®, BD Biosciences, San Jose, EUA) utilizando o filtro FL2 (585±42 nm). As amostras foram analisadas pelo programa FlowJo 7.2.2 (Tree star Inc, Asland, EUA) e os resultados expressos em % de células nas fases <G1, G0/G1, S ou G2/M. Os dados foram representados em histogramas.

9.2.7 Detecção de proteínas por western blot

Cerca de 5×10^5 células E9 foram colocadas em placas de Petri de 10 cm com meio CMRL1066 adicionado de soro fetal (10%), 10µl/ml estreptomicina e 20 µl/ml L-glutamina. Após 24 horas o meio foi trocado por outro com as diferentes concentrações do extrato de guaraná. Um dia depois este meio foi retirado e as células lavadas duas vezes com PBS e a placa colocada rapidamente no gelo. Então foram adicionados 500 µl de solução de lise [62,5mM Tris-HCl (pH 6,8 a 25°C), 2% SDS, 10% glicerol, 10µl/ml de inibidores de fosfatases

(Phosphatase Inhibitor Mix I, Serva, Dinamarca) e 10µl/ml de inibidores proteases (Protease Inhibitor Mix HP Plus, Serva, Dinamarca) e as células foram destruídas com auxílio de bastão plástico. Posteriormente o conteúdo foi colocado em um tubo de 1,5ml e centrifugado a 13000 rpm por 20 minutos à 4°C. Finalmente os sobrenadantes foram coletados e congelados à -20°C até que fossem quantificado pelo método colorimétrico de Bradford para utilização (Bio Rad Protein Assay, EUA). Alíquotas contendo 50 µg de proteínas totais foram adicionadas de solução de Laemmli 2x (LAEMMLI, 1970), desnaturadas por 5 minutos à 95°C e aplicadas no gel de Acrilamida-BIS (11%; SDS-PAGE). A eletroforese ocorreu à 110 V até que as bandas se agrupassem e posteriormente à 100 V até que o Azul de Bromofenol saísse do gel. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para a membrana de PVDF (Polivinilideno difluoreto, Bio Rad) em condições úmidas (100 V, 1 hora). Posteriormente à transferência das proteínas, as membranas foram analisadas por coloração com vermelho de Ponceau seguida de várias lavagens com tampão TBS-T. Os géis foram corados em solução de Azul de Comassie e lavados extensivamente com água para verificar o restante das proteínas. Para bloquear sítios de ligação inespecíficos, as membranas foram incubadas com tampão de bloqueio (5% de leite desnatado ou Soro-albumina bovina em TBS-T) por uma hora em agitação leve e contínua. Então, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti – PCNA (1:1000 monoclonal anti-camundongo; Sigma, EUA), p27 (1:200, policlonal anti-coelho; SantaCruz, EUA), Phospho-CREB (1:500, monoclonal anti-coelho; Cell Signaling Technology, EUA) Phospho-p38 MAPK (1:1000, monoclonal anti-coelho; Cell Signaling Technology, EUA), Phospho-p44/42 (1:1000, monoclonal anti-coelho; Cell Signaling Technology, EUA), Phospho-SAPK/JNK (1:1000, monoclonal anti-coelho; Cell Signaling Technology, EUA), CAR (1:200, policlonal anti-coelho; Santa Cruz, EUA), Cx43 (1:200, policlonal anti coelho; Zymed, EUA) e tubulina (1:1000, monoclonal anti-camundongo; Sigma), diluídos em tampão de bloqueio (leite ou BSA) por toda a noite (4°C). Após a incubação descrita acima, as membranas foram lavadas 3 vezes em TTBS e incubadas com anticorpo secundário específico (IgG, anti-coelho ou anti-camundongo) conjugado com peroxidase (diluído em TBS-T) por uma hora à temperatura ambiente sob agitação leve e contínua. Finalmente as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T e expostas à solução de DAB-níquel para detecção colorimétrica das bandas específicas. A densitometria foi realizada pelo programa ImageMaster 1D (Amersham Biosciences, EUA), utilizando-se o

volume das bandas normalizadas para curvas de Gauss. Três quantificações foram realizadas para cada banda.

9.2.8 Análises estatísticas

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida de pós teste de Dunnet utilizando-se o programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad, EUA). Os dados foram representados como sendo a média e desvio padrão ($M \pm DP$).

9.3 RESULTADOS

9.3.1 Avaliação da citotoxicidade dos extratos de guaraná sobre as células E9 e E10

Conforme descrito no item acima, foram realizados dois extratos de guaraná baseando-se em diferentes solventes (água e etanol) que extraem substâncias diferentes da mesma matéria prima, de acordo com as características de solubilidade em água ou etanol. Nossa intenção foi verificar qual destes extratos teria um potencial anti-neoplásico mais específico, ou seja, qual extrato continha as substâncias antitumorais mais efetivas. Além disso, procuramos avaliar a citotoxicidade dos extratos do guaraná sobre duas linhagens de células, uma tumoral (E9) e outra apenas imortalizada e não transformada (E10). O intuito desta ultima avaliação foi verificar se os extratos possuíam efeito citotóxico mais intenso sobre as células tumorais, já que de nada adianta encontrar um novo fármaco antineoplásico que tenha efeito similar em células normais.

Nossos resultados indicaram que o ETOHG tem maior potencial citotóxico que o AQUEG, já que apresentou uma dose EC50 menor (Figuras 9.1 e 9.2) tanto em células tumorais (EC50 ETOHG = 1,10 mg/ml; EC50 AQUEG = 3,38mg/ml) quanto nas células não transformadas (EC50 ETOHG = 1,52 mg/ml; AQUEG aquoso = 5,10 mg/ml). Ainda sobre estes dados, pode ser notado que o efeito de ambos os extratos foi mais intenso nas células tumorais do que nas células não tumorais, o que significa que é possível utilizar uma dose menor de guaraná com efeito antitumoral e sem efeito tóxico. Interessante é o fato que aparentemente o efeito citotóxico do AQUEG foi diferente em ambas as células testadas, pois apresentaram formato das curvas diferentes (Figura 9.1 e 9.2).

Figura 9.1 – Efeito citotóxico dos extratos de guaraná sobre as células E9. Nota-se que as linhas de tendência são diferentes entre os dois extratos testados (linhas pontilhadas), o que indica que o extrato etanólico foi mais citotóxico que o aquoso (apresenta uma dose EC50 menor)

Figura 8.2 – Efeito citotóxico dos extratos de guaraná sobre as células E10. Nota-se que as linhas de tendência são bem diferentes entre as duas células (linhas pontilhadas) e que o extrato etanólico apresentou efeito citotóxico mais pronunciado

A análise do número de células viáveis e não viáveis pela técnica de Exclusão Vital pelo Azul de Tripan possibilitou-nos contar o número de células mortas nas amostras. Desta maneira, foi possível calcular a porcentagem de células mortas pelas diferentes doses do extrato de guaraná. Sendo assim, observou-se que uma dose menor do ETOHG foi mais eficaz do que do AQUEG em ambos os cultivos celulares (Figura 9.3).

Levando-se em conta os dados obtidos neste experimento, prosseguimos os estudos apenas com o ETOHG sobre as células tumorais E9.

Figura 9.3 – Efeito dos extratos de guaraná sobre o número de células não viáveis. Ambos os cultivos foram mais sensíveis ao extrato etanólico. Notar ainda que as células E9 morreram com uma concentração menor de extrato etanólico que as células E10. ** - $p < 0,01$

9.3.2 Efeito do ETOHG sobre a proliferação da células E9

Para analisarmos os efeitos anti-proliferativos do guaraná algumas alterações nas concentrações do extrato foram feitas, partindo-se de 0,08 mg/ml à 5,0 mg/ml. Para demonstrar o efeito anti-proliferativo deste extrato sobre as células E9, utilizamos a técnica de impregnação por cristal violeta, descrita no material e métodos. Verificamos que o extrato de guaraná apresentou efeito dose-dependente, apresentando diferença estatisticamente significativa a partir da dose de 1,25 mg/ml ($p < 0,0001$, Figura 9.4). Entretanto, foi possível notar que na concentração de 62,5 mg/ml ocorreu um menor número de células porém, sem atingir a diferença significativa (Figura 9.4).

Figura 9.4 – Efeito dos extratos de guaraná sobre a proliferação celular. Observou-se menor detecção colorimétrica da impregnação de cristal violeta a partir da concentração de 62,5 mg/ml. ** - $p < 0,01$

9.3.3 Efeitos do ETOHG sobre o ciclo celular

A análise do ciclo celular após 8 horas da exposição às diferentes concentrações do ETOHG não demonstrou alterações significativas (Figura 9.5). Entretanto, é possível supor que com maior tempo de exposição das células tumorais ao guaraná seriam observadas alterações significativas neste experimento.

Figura 9.5 – Efeito do extrato de guaraná sobre as fases do ciclo celular. Não se observou qualquer efeito dose-dependente após a exposição ao extrato por 8 horas. Apenas na maior concentração foi possível verificar uma maior quantidade de células na fase <G1, indicando morte celular. * - $p < 0,05$

9.3.4 Efeitos do ETOHG sobre a atividade de caspase-3

Avaliamos também se o efeito antitumoral do ETOHG era devido à indução de morte celular por apoptose. Para isto, estudamos a atividade enzimática da caspase-3 nas células vivas por teste específico após 8 horas de exposição ao ETOHG. Neste experimento verificamos que apenas a dose de 2,5 mg/ml induziu aumento significativo na atividade da caspase-3, ou seja, induziu um maior grau de apoptose devido a ação do extrato do guaraná nas células E9 (Figura 9.6). Nesta mesma concentração foi possível verificar também uma maior quantidade de células com DNA degradado (Figura 9.5), o que condiz com a morte por apoptose observada.

Figura 9.6 – Efeito do extrato etanólico de guaraná sobre a atividade da caspase-3. Observou-se maior atividade da caspase-3 apenas na dose de 2,5 mg/ml. ** - $p < 0,01$

9.3.5 Análise de proteínas por western blot

Para demonstrarmos que o ETOHG apresenta um efeito antiproliferativo sobre as células tumorais E9, analisamos semi-quantitativamente a expressão protéica de PCNA em relação à de tubulina nas células tratadas com diferentes doses de ETOHG. Após a realização da densitometria das bandas de PCNA e de tubulina, foi possível verificar, já na menor dose, menor expressão significativa de PCNA ($p < 0,0001$, Figura 9.7) porém, este fato não caracteriza diretamente alterações na proliferação celular induzidas pelo ETOHG (efeito entre 62,5 e 1,25 mg/ml, Figura 9.4). Por outro lado, não foi observada diferença nos níveis de p27 após exposição às doses do ETOHG (Figura 9.8).

Figura 9.7 – Expressão protéica de PCNA em células tratadas com diferentes concentrações de ETOHG. Observou-se menor quantidade de PCNA a partir da primeira concentração utilizada de ETOHG (0,08 mg/ml). Como controle endógeno foi utilizado a tubulina. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$

A função da Conexina43 sobre a gênese tumoral pulmonar é bem descrita e discutida no capítulo 9, onde concluímos que a Cx43 mesmo sendo considerada um gene supressor de tumor tem seus níveis aumentados nas lesões com maior grau de malignidade. Este paradoxo já foi descrito para outras proteínas conforme descrito no capítulo 9. Assim, em um trabalho de caracterização da capacidade de GJIC e da expressão da Cx43 nas células E10 e E9, verificou-se que as últimas expressavam a Cx43, porém apresentavam baixa capacidade de comunicação intercelular por junções do tipo GAP, diferentemente das células E10 (CESEN-CUMMINGS et al., 1998). Em nosso experimento, observamos que o

ETOHG diminuiu a quantidade de Cx43 a partir da dose de 0,16 mg/ml ($p < 0,0001$; Figura 9.9).

Figura 9.8 – Expressão protéica de p27 em células tratadas com diferentes concentrações de ETOHG. Não se observou diferença significativa entre as células tratadas com ETOHG e as células não tratadas. Como controle endógeno foi utilizado a tubulina

Figura 9.9 – Expressão protéica da Conexina43 em células tratadas com diferentes concentrações de ETOHG. Observou-se que a Cx43 diminui a partir da concentração de 0,16 mg/ml. Como controle endógeno foi utilizado a tubulina. ** - $p < 0,01$

Nosso trabalho demonstrou que a administração de guaraná e cafeína para animais por 15 dias levou a um aumento na expressão gênica do receptor CAR (capítulo 10) no fígado dos camundongos e que diversas alterações relacionadas à ativação deste receptor são exacerbadas pela administração prévia de guaraná e cafeína. Desta maneira, tornou-se importante avaliarmos se as células tumorais de pulmão expressariam o CAR e se a administração de diferentes concentrações do ETOHG alteraria a quantidade deste receptor nas células. Conforme nossas expectativas, as células tumorais expressam o receptor CAR e

o tratamento com as diferentes concentrações de guaraná alterou a sua expressão (Figura 8.9). Porém, na maior dose testada do ETOHG, as células não apresentaram diferença em comparação às células não tratadas. Falta ainda avaliar se este receptor tem importância para a carcinogênese pulmonar e se positivo, como modular sua atividade em prol de novas perspectivas terapêuticas e preventivas.

Figura 9.10 – Expressão protéica do receptor CAR em células tratadas com diferentes concentrações de ETOHG. Observou-se o CAR aumentado a partir da concentração 0,16 mg/ml, porém, sua expressão mostrou-se reduzida em células tratadas com 2,5mg/ml. Como controle endógeno foi utilizado a tubulina. ** - $p < 0,01$

Conforme descrito no capítulo 5, sobre os efeitos quimiopreventivos do guaraná serem relacionados às alterações na expressão do fator CREB/ATF-1 de transcrição, procuramos verificar se a exposição do guaraná às células E9 alterariam a ativação do fator CREB e de algumas outras proteínas relacionadas à via das proteínas MAPK como, por exemplo, p38, p42/44 e SAPK/JNK. Nossos anticorpos para estas proteínas avaliariam o grau de ativação destas proteínas nas células tratadas ou não com o ETOHG, porém, com a metodologia empregada neste experimento não foi possível verificar marcação alguma destes 4 anticorpos. Sendo assim, nossos esforços continuarão para melhorar a detecção destas proteínas fosforiladas por western blot.

9.4 DISCUSSÃO

Mesmo o câncer de pulmão sendo uma doença evitável na grande maioria das vezes, já que sua incidência está diretamente correlacionada ao consumo do tabaco, este ainda é a maior causa de morte entre os diversos tipos de câncer que afetam os seres humanos. Desta maneira, encontrar novas substâncias que possam ter ação preventiva ou mesmo terapêutica sobre estes tumores é essencial. Neste trabalho, utilizando duas linhagens de células sendo uma tumoral (E9) e uma não-tumoral e imortalizada (E10), estudamos a ação de dois extratos diferentes do guaraná. Demonstramos que um destes extratos tem um potencial antitumoral maior que o outro e que existe certa seletividade dos compostos ativos pelas células tumorais frente às não tumorais. Além disso, foi demonstrado o modo de ação responsável pelo efeito antitumoral e foram estudadas algumas proteínas chave no possível mecanismo de ação do extrato de guaraná.

Neste trabalho, foram utilizadas duas linhagens de células originárias de camundongos com o intuito de ratificar os efeitos *in vivo* encontrados nos modelos experimentais já utilizados. Para isso as células E9 e E10 foram escolhidas por já terem sido bem caracterizadas (MALKINSON et al., 1997). Uma das principais vantagens de utilizar este par de células é que se torna possível estudar os efeitos de alguma substância sobre uma variante tumoral e uma não tumoral *in vitro*, podendo prever de maneira rápida se o composto testado tem alguma seletividade sobre as células tumorais. Isto se faz necessário para se economizar tempo e dinheiro no desenvolvimento de novos fármacos antitumorais.

Já fora publicado anteriormente diversos efeitos do guaraná, sendo que nosso laboratório é pioneiro em estudar seus efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos (MALKINSON et al., 1997; FUKUMASU et al., 2006b; FUKUMASU et al., 2008). Além dos resultados já publicados, outros experimentos foram realizados e confirmaram o efeito antitumoral do guaraná para outros tipos de tumores em camundongos, como de pulmão (capítulo 5) e de mama (capítulo 7). Presente em todos os experimentos onde avaliamos a ação do guaraná foi pelo menos um dos modos de ação responsável pelo efeito antitumoral: a redução da proliferação celular. Conforme descrito anteriormente no capítulo 5, demonstramos que o guaraná fornecido para camundongos por 52 semanas controla o desenvolvimento da carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK, uma nitrosamina do

tabaco. Neste trabalho, demonstrou-se que as lesões pulmonares dos animais tratados com a planta foram menos agressivas e apresentaram menor índice de proliferação celular. No que concerne sobre o mecanismo de ação, pôde-se demonstrar que os tumores dos animais tratados apresentaram menor número de células com o fator de transcrição CREB ativado, conhecido por gerar a expressão de genes que podem induzir a proliferação celular e suprimir apoptose dentre outros (SHANKAR; SAKAMOTO, 2004; CONKRIGHT; MONTMINY, 2005). Assim, um dos nossos objetivos do presente trabalho foi avaliar se o CREB seria responsável pelo efeito antitumoral do extrato etanólico do guaraná. Porém devido a problemas relacionados ao procedimento para detecção do CREB por western blot, não foi possível caracterizar se sua atividade sofreria alterações devido à ação do extrato do guaraná. Da mesma maneira as outras proteínas que poderiam ser responsáveis por alterar a expressão do CREB não puderam ser avaliadas já que a técnica não foi efetiva para detecção destes anticorpos. Futuramente realizaremos adaptações no protocolo a partir da extração das proteínas e principalmente sobre o western blot.

Inúmeros trabalhos demonstraram que a expressão e localização das conexinas sofrem alterações durante a carcinogênese em diversos órgãos (YAMASAKI et al., 1993; MESNIL et al., 1995a; YAMASAKI et al., 1995; YAMASAKI et al., 1996; LOCKE, 1998; RUCH; CESEN-CUMMINGS; MALKINSON, 1998; YAMASAKI et al., 1999a; YAMASAKI et al., 1999b; MESNIL, 2002, 2004; MESNIL et al., 2005; MCLACHLAN; SHAO; LAIRD, 2007). Outro fato bem caracterizado é que quando as células tumorais voltam a expressar algumas conexinas estas perdem sua malignidade e tumorigenicidade (MESNIL et al., 1995b). Porém, mais recentemente, diversos trabalhos têm demonstrado que a expressão de algumas conexinas é aumentada na fase tardia da carcinogênese e correlaciona-se com pior fenótipo, invasão de vasos e pior prognóstico (LOCKE, 1998; ITO et al., 2002; MCLACHLAN; SHAO; LAIRD, 2007). Foi demonstrado também que o aumento na expressão da Cx43 melhorou a capacidade de migração e aumentou a proliferação celular em células isoladas de miocárdio de rato (LIU, X. et al., 2007), quando da super-expressão de Wnt-3a. Os genes que codificam a família Wnt produzem proteínas que influenciam a comunicação intercelular, desde o desenvolvimento embrionário até a vida adulta (CADIGAN; NUSSE, 1997; CADIGAN, 2008). Além disso, foi demonstrado que a Cx43 promove malignidade de um tipo de células cancerosas de fígado por inibir a comunicação intercelular reduzindo a expressão da Cx32 (ZHANG, D. et al., 2007). Corroborando com estes dados, demonstramos (descrito no

capítulo 6) que mesmo os camundongos tendo apenas 1 alelo da Cx43 e suas lesões serem mais agressivas que a dos animais wild-type, ocorre um aumento na expressão da própria Cx43 (capítulo 6) nas lesões tumorais. Analisando a Cx43 por imunistoquímica, demonstramos que este aumento na expressão gênica é correlacionado a um fenótipo alterado onde as células apresentam a Cx43 principalmente intracitoplasmática e não na membrana citoplasmática, onde faria parte dos conéxons que formam as junções do tipo GAP. Logo ao levarmos em conta os trabalhos publicados (LIU, X. et al., 2007; ZHANG, D. et al., 2007) e nossos resultados (capítulo 6), este efeito controverso da Cx43 parece ter importância para a caracterização do fenótipo mais maligno na carcinogênese pulmonar. Deste modo, seria interessante encontrar substâncias que possam reduzir a expressão da Cx43 e conseqüentemente apresentar efeito antitumoral. Em nosso trabalho, verificamos que as células E9 expressam a Cx43 apesar desta linhagem apresentar um menor grau de comunicação intercelular por junções GAP que as células E10 (CESEN-CUMMINGS et al., 1998). Simultaneamente à redução da proliferação celular, induzida pela exposição ao ETOHG, ocorreu uma redução no nível de Cx43, porém, na atual fase deste trabalho não foi possível caracterizar se este fato é responsável ou conseqüência da ação antitumoral do ETOHG sobre as células tumorais. Futuramente, para afirmarmos que a Cx43 é importante ao mecanismo de ação antitumoral do ETOHG pretendemos caracterizar a comunicação intercelular por junções GAP, além de avaliar a expressão da Cx43 e sua localização celular quando da exposição às diferentes concentrações do ETOHG. Torna-se interessante a partir destes resultados avaliar também a ação da inibição da expressão da Cx43 pela utilização de RNA de interferência para caracterizar a ação da Cx43 em células já transformadas, visando a descoberta de potenciais novos fármacos antitumorais.

Capítulo 10

Efeitos do guaraná sobre o Receptor CAR

Submetido à publicação sob o título: "Guarana (Paullinia cupana) and caffeine increase the expression of Constitutive Androstane Receptor (CAR) on mouse liver"

10 O guaraná (*Paullinia cupana*) e a cafeína aumentam a expressão do receptor Andróstenos/Ativado Constitutivo no fígado de camundongos

Heidge Fukumasu^a, Andreia Oliveira Latorre^a, Tereza Cristina da Silva^a, Frederico Azevedo Costa-Pinto^a, Maria Lucia Zaidan Dagli^a.

^a – Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

Os receptores sensores de xenobióticos, como o Receptor Andrógeno/Ativado Constitutivo (CAR) e o Receptor X-Pregnano (PXR), têm sido recentemente identificados como reguladores importantes da biotransformação de drogas. Neste experimento, nós estudamos os efeitos da *Paullinia cupana* (guaraná) e da cafeína após a administração do 1,4-bis[2-(3,5-dichloropiridiloxi)]benzeno (TCPOBOP), um conhecido ligante do CAR em camundongos. Para isto, utilizaram-se camundongos fêmeas C57BL/6 que foram tratadas por 15 dias com guaraná (2000mg/kg) ou cafeína (50 mg/kg) e administradas com o TCPOBOP (6mg/kg). A eutanásia ocorreu imediatamente após a aplicação do TCPOBOP e 24, 48 e 72 horas depois; quando se avaliaram a histopatologia, a proliferação celular, a comunicação intercelular por junções GAP (GJIC) e a expressão gênica de algumas enzimas do citocromo p450 e do receptor CAR. O tratamento por 15 dias com guaraná ou cafeína aumentou a expressão da CYP1A2, CYP2B10, CYP3A11 e do CAR. Quando o TCPOBOP foi administrado, ocorreu degeneração vacuolar e aumento na proliferação celular, conseqüentemente aumentando o peso do fígado as 48 e 72 horas. Ambos os tratamentos prévios aumentaram a proliferação celular dos hepatócitos após 24 horas, mas apenas a cafeína aumentou a perda das GJIC após o TCPOBOP. A cafeína e o guaraná exacerbaram a expressão do CAR após 24 horas da ativação pelo TCPOBOP, e aumentaram a expressão da CYP1A2 e da CYP3A11. Nós demonstramos que a indução das enzimas do citocromo p450, após o tratamento com o guaraná e com a cafeína, pode ter ocorrido pelo aumento na expressão do CAR. Corroborando com este efeito está o fato de que diversos efeitos induzidos pela ativação do CAR foram aumentados com o tratamento prévio com guaraná e com a cafeína. Estes resultados levam-nos a concluir que a cafeína é pelo menos parcialmente responsável por estes efeitos e que o CAR é importante para a indução enzimática gerada pela guaraná.

10.1 INTRODUÇÃO

Os receptores sensores de Xenobióticos como o Receptor Andrógeno Constitutivo (CAR), Receptor X-Pregnano (PXR), Receptor Aril-hidrocarbono (AhR), Receptor Ativado Proliferador de Peroxissomos (PPAR) e o Fator Nuclear Eritróide 2-parecido 2 (Nrf2) têm sido recentemente identificados como reguladores importantes da biotransformação de drogas. Componentes de ervas presentes na dieta ou da Medicina Alternativa e Complementar (CAM) podem interagir com estes receptores, sendo que isto pode ocorrer ao nível transcricional ou pós-transcricional. O CAR é conhecido por controlar a biotransformação de drogas por mediar a indução de diversas enzimas de biotransformação de fase I e II (como CYP2B, CYP3A, UGT1A1 e GSTA1), assim como de diversos transportadores de drogas incluindo Mrp2 e Oatp4 (WILLSON; KLIEWER, 2002). Por isto, o CAR tem sido implicado na biotransformação de diversos xenobióticos (WEI et al., 2000; ZHANG, J. et al., 2002; XIE et al., 2003), como endobióticos (GUO et al., 2003; XIE et al., 2003; MAGLICH et al., 2004; SAINI et al., 2004; ZHANG, J. et al., 2004). O contaminante de pesticida, 1,4-bis[2-(3,5-dichloropiridiloxi)]benzeno (TCPOBOP), é geralmente considerado o mais potente ligante do CAR em camundongos (POLAND et al., 1980). Assim, já fora demonstrado que a administração de TCPOBOP em camundongos induz a expressão da CYP2B10 através da ativação do CAR (TZAMELI et al., 2000).

Dentre as diversas espécies de plantas amazônicas que são reconhecidas por seus potenciais terapêuticos, o guaraná (*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*) é uma que particularmente chama atenção (GONCALVES et al., 2006). O guaraná pertence à família Sapindaceae sendo um arbusto que cresce originalmente no Brasil, mais precisamente na região de Maués da bacia Amazônica, e tem sido utilizada como estimulante pelos índios da tribo Saterê-Maués por séculos (HENMAN, 1982b). Hoje em dia, o guaraná é utilizado como parte de diversos produtos, como bebidas não alcoólicas, tônicos, assim como parte de produtos de medicina alternativa e complementar como agente anti-estresse ou para perda de peso (Capítulo 2). Esta planta possui atividade antioxidante *in vitro* (MATTEI et al., 1998a; BASILE et al., 2005; MAJHENIC; SKERGET; KNEZ, 2007) e *in vivo*, aumentando a atividade da Superóxido-Dismutase em fígado de camundongos tratados por 15 dias (Capítulo 4).

Recentemente nosso grupo demonstrou que a administração de guaraná em camundongos BALB/c fêmeas por 15 dias levou a indução das CYP1A2 e CYP3A11 (capítulo 4), podendo este efeito ser parcialmente responsável pela proteção ao DNA contra o dano genotóxico induzido pela Dietilnitrosamina (FUKUMASU et al., 2006a). Além deste experimento, o guaraná tem sido estudado em diversos modelos de tumorigênese onde já foi demonstrado seus efeitos quimiopreventivos em modelo de hepatocarcinogênese em camundongos (FUKUMASU et al., 2006b) e efeito antitumoral em metástases pulmonares de melanoma B16/f10 em camundongos (FUKUMASU et al., 2008).

A cafeína é provavelmente umas das substâncias mais consumidas mundialmente, estando presente no café (*Coffea sp.*), chás (*Camellia sinensis*; *Ilex paraguariensis*) e em especialidades farmacêuticas (Tylenol®). Este alcalóide xantínico é principalmente conhecido por seus efeitos psicoestimulatórios como consequência do antagonismo competitivo pelos receptores de adenosina (FISONE; BORGKVIST; USIELLO, 2004). Após a administração da cafeína, ela é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, distribuída por todo organismo e rapidamente biotransformada, principalmente pelo fígado, em três diferentes metabólitos: paraxantina, teobromina e a teofilina (LELO et al., 1986). Esta biotransformação é catalisada principalmente pela CYP1A2, no entanto, outras enzimas do citocromo p450 estão envolvidas, como as CYP3A11 e CYP2C9 (KOT; DANIEL, 2007). Como esperado, o tratamento com cafeína induz a expressão da CYP1A2 (CHEN et al., 1996; GOASDUFF et al., 1996), mas evidências sobre o mecanismo molecular pelo qual ocorre o aumento na expressão desta enzima ainda é desconhecido. O receptor Aril-hidrocarbono (AhR) é um dos receptores que regulam a expressão da família CYP1A pela ligação de seus respectivos ligantes (MA; LU, 2007). Porém, todas as tentativas para se demonstrar que a cafeína induz a expressão da CYP1A2 pela ativação do receptor AhR falharam (AYALOGU et al., 1995).

É considerado que o receptor CAR tem um papel muito importante na biotransformação de drogas, como, por exemplo, na biotransformação do acetaminofeno (paracetamol, APAP) e sua hepatotoxicidade (ZHANG, J. et al., 2002). Além disso, demonstrou-se que a toxicidade do APAP é aumentada pela ativação do receptor PXR, sendo provavelmente este efeito devido a sua biotransformação pela enzima CYP3A4, levando a formação do seu metabólito mais tóxico (GUO et al., 2004). Já foi demonstrado em alguns trabalhos que o tratamento prévio com cafeína altera a biotransformação do APAP, aumentando sua hepatotoxicidade (SATO; IZUMI, 1989; JAW; JEFFERY, 1993). Outro trabalho

importante demonstrou que quando a cafeína é utilizada como pré-tratamento, ela induz a atividade de monoxigenase das enzimas microssomais, levando a uma conversão mais rápida do APAP em seu metabólito tóxico (GALE et al., 1986). Porém ao nosso conhecimento, não há dados demonstrando os mecanismos pelos quais a cafeína altera a biotransformação do APAP.

No presente trabalho nós descrevemos pela primeira que o guaraná, possivelmente pelo seu conteúdo de cafeína, aumenta a expressão do receptor CAR e conseqüentemente induz a expressão da CYP1A2, CYP2B10 e CYP3A11. Além disso, após a administração do TCPOBOP, e a conseqüente ativação do receptor CAR, tanto o guaraná quanto a cafeína exacerbaram a proliferação dos hepatócitos, a expressão da CYP1A2 e da CYP2B10 e a perda da GJIC. Estes resultados levam-nos a concluir que a possivelmente cafeína é responsável por regular a indução enzimática aumentando a expressão do CAR.

10.2 MATERIAL E MÉTODOS

10.2.1 Substâncias químicas

A cafeína foi obtida do Laboratório Labsynth (pureza de >98,5%; São Paulo, Brasil). O TCPOBOP foi sintetizado como previamente descrito (POLAND et al., 1980) e foi providenciado pela Senhora Croizy (Paris, França). O óleo de milho era Mazolla® (São Paulo, Brasil). Os testes bioquímicos de alanina-aminotransferase e de colesterol foram comprados da CELM (São Paulo, Brasil). O vermelho da Síria, Luciffer Yellow, Rodamina, DAB, Trizma, Vermelho de Ponceau, anticorpos IgG anti-camundongo e anti-coelho foram obtidos da Sigma Chemical Co (Saint Louis, EUA). O anticorpo anti-PCNA, leite desnatado e o LSAB eram da DAKO (Dinamarca). O reagente Bio-Rad Protein Assay foi comprado da Bio-Rad Labs (Hercules, EUA). Os anticorpos policlonais feitos em coelho anti-Cx26 e Anti-Cx32 foram adquiridos da Zymed Laboratories (San Francisco, EUA). Os reagentes TRIzol, primers oligoDT, enzima superscript II e Platinum SYBR Green foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, EUA). O kit para expressão gênica Assay-on-Demand CAR (Mm004986_m1), 18s (4319413E) e Taqman Mastermix são da Applied Biosystems (Foster City, EUA). Os primers para CYP1A2, CYP2B10, CYP3A11 e 18s foram feitos pela IDT technologies (Coralville, EUA). Todos os outros reagentes eram de grau analítico.

10.2.2 Animais

Setenta e dois camundongos C57BL/6 fêmeas foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, sob ciclo de claro de 12 horas e condições controladas de temperatura ($20 \pm 4^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa ($55 \pm 10\%$). Os camundongos tiveram acesso livre a dieta padrão (NUVILAB—CR1®, Nuvital Nutrientes LTDA, Brasil) e água filtrada. Todos os camundongos tiveram acesso livre a ração (Nuvilab-CR1®, Nuvital Nutrientes LTDA, Brasil) e a água filtrada. Além disso, todos os procedimentos foram

realizados seguindo-se as normas de utilização e cuidados do Instituto Nacional de Saúde dos EUA (CLARK et al., 1996) além de terem sido revisados e aprovados pelo comitê de bioética da FMVZ-USP (processo número 953/2006).

10.2.3 Guaraná

O pó de guaraná foi fornecido pela EMBRAPA Amazônia Ocidental (Amazônia, Brasil) e foi conservado em condições secas à $\pm 4^{\circ}\text{C}$ até a administração. A análise química e bromatológica do guaraná (Tabela 2.1) foi publicada previamente (FUKUMASU et al., 2006b). A quantificação da cafeína na amostra de guaraná foi realizada conforme publicado anteriormente (PAGLIARUSSI; FREITAS; BASTOS, 2002) e atingiu 1,02% na matéria seca da amostra. Para isto, 50 mg do pó de guaraná foram diluídos em 10 ml de etanol absoluto contendo 0,1mg/ml de controle interno (7-beta-hidroxietilteofilina) e foi submetida a agitação constante por 2 horas. Então, o material foi filtrado e 1 μl da amostra foi injetada num detector de Nitrogênio/Fósforo acoplado com cromatografia gasosa (GC/DNP). A dose de guaraná usada neste experimento (2000mg/kg) foi baseada em estudos prévios (FUKUMASU et al., 2006a; FUKUMASU et al., 2006b). A dose de cafeína utilizada neste experimento (50mg/kg) foi considerada segura para camundongos por ser menos que a metade utilizada em outros experimentos (LU; GLADDEN; DIEHL, 2003).

10.2.4 Protocolo experimental (figura 10.1)

Os animais foram divididos em grupos como se segue: controle (n=25), tratados com guaraná (n=24) e tratados com cafeína (n=23). O guaraná (2000 mg/kg) e a cafeína (50 mg/kg) foram administrados orogastricamente (gavagem), uma vez ao dia, por 15 dias até que os animais foram eutanasiados, sendo que o grupo controle apenas recebeu água por gavagem. No dia 15, quatro animais de cada grupo foram eutanasiados; todos os outros receberam o TCPOBOP (6 mg/kg; gavagem) diluído em óleo de milho e foram eutanasiados

24, 48 e 72 horas após o TCPOBOP. Todos os animais foram pesados a cada três dias e diariamente após a administração do TCPOBOP. Os animais foram eutanasiados (Tiopental 250mg/kg, I.P.) e o sangue coletado por punção cardíaca. Em seguida, o fígado dos animais foi coletado, pesado e dividido para realizar a análise histológica e congelado em nitrogênio líquido para conservação à -80°C até sua análise.

Figura 10.1 – Protocolo experimental utilizado na avaliação dos efeitos da cafeína e do guaraná sobre o receptor CAR e sua ativação pelo seu ligante CAR

10.2.5 Análise histopatológica

As amostras de fígados de cada lobo foram fixadas em formol à 10% por 48 horas, desidratadas em banhos de álcool etílico com diferentes concentrações, processadas e embebidas em parafina para posterior coloração com Hematoxilina e Eosina.

10.2.6 Análise bioquímica sérica

A análise bioquímica da alanina-aminotransferase e do colesterol foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante.

10.2.7 Detecção de colágeno

A quantificação do colágeno foi realizada nas seções de fígado por método descrito anteriormente (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979). Brevemente, as seções de fígado foram de-parafinizadas e reidratadas com banhos consecutivos de xilol e etanol em diferentes concentrações. Então, as lâminas foram expostas à solução de Picrosirius (0,2% Vermelho da Síria em solução saturada de Ácido Pícrico) por 1 hora. As seções foram lavadas e contra-coradas com Hematoxilina de Harry. Finalmente as seções desidratadas foram montadas com bálsamo do Canadá. Por último, procede-se a quantificação da área total das seções de fígado e a detecção colorimétrica das fibras vermelhas foram realizadas sob luz polarizada.

10.2.8 Análise da comunicação intercelular por junções GAP

A técnica de transferência de corante “Incision Loading Dye Transfer” foi realizada de acordo com o método descrito anteriormente (SAI et al., 2000). Este método é baseado na habilidade do corante Lucifer Yellow (LY, Peso molecular: 457 Da) de se difundir pelas células adjacentes pelas junções GAP devido ao seu tamanho ser menor que 1000 Da. Por outro lado, a rodamina (ROD) não se difunde pelas junções GAP por ser maior que 1000 Da. Resumidamente, o tecido hepático foi seccionado rapidamente após a eutanásia, lavado com PBS e colocado na parte externa de um tubo de ensaio de vidro, para permitir que a mistura dos dois corantes permanecesse nas incisões. Três a quatro incisões (7-8 mm de

comprimento com 1 mm de profundidade) foram feitas com lâmina de barbear (Gilete®, Brasil). A mistura dos corantes fluorescentes contendo 0,5% de LY e 0,5% ROD em PBS foi derramada sobre a superfície do tecido hepático e permaneceu por 5 minutos, sendo posteriormente lavada com PBS por 3 vezes e fixada em formol 10% por uma noite. Depois deste período os fragmentos foram lavados com água e processados rotineiramente para serem embebidos em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram feitos e preparados para a análise da GJIC, cortando-se o bloco de parafina perpendicularmente as linhas de incisão. As áreas coradas com LY foram detectadas por emissão fluorescente utilizando-se microscópio (Nikon Eclipse-800, Japão) equipado com unidade de epi-fluorescência. A área média corada com LY e o comprimento da incisão foram quantificados com a ajuda do programa Image-Pro Plus (versão 4.5, Media Cybernetics, EUA). Pelo menos três incisões foram analisadas por animal, sendo randomicamente escolhidas para a análise. O valor médio foi utilizado como único dado por animal. A distância da transferência do corante a partir da linha de incisão (área/comprimento) foi representada como unidades de GJIC e os valores expressos como fração do animal controle.

10.2.9 Imunoistoquímica para PCNA

A detecção do PCNA (clone PC10, diluição 1:3200) foi realizada em seções (5µm) representativas do fígado de cada animal, como previamente descrito (AVANZO et al., 2004). Resumidamente, as lâminas foram desparafinizadas e reidratadas em consecutivos banhos de xilol e etanol em diferentes concentrações. A peroxidase endógena foi bloqueada com solução de 3% de peróxido de hidrogênio em PBS por 5 minutos. Posteriormente, fez-se o bloqueio dos sítios protéicos inespecíficos com solução de 5% de leite desnatado por 2 horas, sendo em seguida, incubados com o anticorpo anti-PCNA pela noite toda ($\pm 4^{\circ}\text{C}$). Para detectar o PCNA, as lâminas foram submetidas ao método da peroxidase-biotina-estreptavidina de acordo com as instruções do fabricante (LSAB), sendo a proteína PCNA detectada após a coloração com o DAB. Finalmente, a hematoxilina de Harrys foi utilizada para contra-corar as lâminas.

As células positivas para PCNA tinham seus núcleos corados em marrom devido à coloração com DAB e pelo menos 1000 células foram contadas ao todo por animal. O índice de proliferação foi obtido dividindo-se o número de células positivas pelo número total de células contadas e multiplicado por 100 para se obter valores em porcentagem.

10.2.10 Análise por western blot das conexinas e PCNA

As amostras congeladas de fígado, pesando cerca de 40 mg cada, foram homogeneizadas diretamente em tampão de amostra (*Sample Buffer*; 1M Tris-HCl, pH 6,8; 10% SDS; 10% glicerol). Posteriormente, foi adicionada a solução de trabalho (*Working solution*; M, pH 6.8, contendo 10% SDS, 10% glicerol, 1M DTT, e 10 mM PMSF) e a suspensão foi centrifugada (13000 rpm, 15 minutos, 4°C) sendo o sobrenadante recolhido e congelado até sua utilização. A quantificação das proteínas foi realizada com o reagente Bio-Rad Protein Assay, baseado no método de Bradford (BRADFORD, 1976) antes de se realizar o SDS-Page (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio). Então, 100 µg de proteínas totais foram carregadas e separadas por eletroforese num gel de 12% de poliacrilamida-SDS (100 V; 2,5 horas). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para a membrana de PVDF (Polivinilideno difluoreto) em condições úmidas. Posteriormente, a transferência das proteínas foi analisada por coloração com vermelho de Ponceau seguida de várias lavagens com tampão TBS-T. Para bloquear os sítios de ligação inespecíficos, as membranas foram incubadas com tampão de bloqueio (5% de leite desnatado em TBS-T) por duas horas em agitação leve e contínua. Então, a membrana foi incubada com os anticorpos primários anti-Cx26 ou anti-Cx32 (1:500) diluídos em tampão de bloqueio por toda a noite (4°C). Após a incubação descrita acima, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário específico (IgG) conjugado com peroxidase (diluído em TBS-T) por duas horas, a temperatura ambiente, sob agitação leve e contínua. Finalmente as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T e reveladas com solução contendo DAB-níquel na presença de peróxido de hidrogênio. As membranas foram secas, copiadas (Epson Photo1600), reidratadas em metanol e TBS-T e limpas com solução de limpeza (*Stripping solution*; 62.5 mM Tris pH 6.8, 2% SDS and 100 mM 2-mercaptoetanol) por 40 minutos à 50°C. Em seguida,

as membranas foram lavadas extensivamente com TBS-T até o odor característico do 2-mercaptoetanol não ser perceptível. Então as membranas foram bloqueadas novamente com solução de bloqueio e incubadas com o anticorpo anti-actina conforme descrito acima.

10.2.11 Análise da expressão gênica

O RNA total foi isolado a partir de 30mg de amostra congelada com o kit Perfect RNA Eukaryotic Mini (Eppendorf) seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram então quantificadas em biofotômetro e a razão A260/A280 foi analisada, sendo que apenas as amostras que tiveram seus valores entre 1,7 e 2,0 e apresentaram boa qualidade e integridade na análise no gel de agarose (1,5% em TAE) foram usadas. Um micrograma de RNA total foi transformado em cDNA pela enzima superscript II com primers OligoDT conforme o fabricante recomenda. Então, a reação de PCR em tempo real foi realizada no termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Para a análise do CAR, foi utilizado o sistema Taqman que consiste na utilização de primers e sonda específica para o gene alvo, sendo utilizados os reagentes CAR (Mm004986_m1) e 18s (4319413E). Para a análise das enzimas do citocromo p450, foi utilizado o sistema SYBR Green, sendo os primers desenhados com o programa Primer-3 (ALTSCHUL et al., 1990) e analisados no programa BLAST (ROZEN; SKALETSKY, 2000) para verificar a ausência de alinhamentos locais com DNA ou outras seqüências de transcritos. Os primers para CYP1A2, CYP2B10 e CYP3A11 foram os mesmos já descritos anteriormente (Capítulo 4). Por fim, a análise da expressão relativa do gene foi realizada de acordo com o método de LIVAK; SCHMITTGEN (2001).

10.2.12 Análises estatísticas

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio Padrão se não indicado. Foram utilizados a ANOVA de uma via para comparação entre mais de dois grupos e o Teste-T não pareado para comparações entre dois grupos. Para as análises de correlação, o teste de

Spearman não paramétrico foi utilizado. Foram consideradas diferenças significativas com $p < 0,05$.

10.3 RESULTADOS

10.3.1 A cafeína e o guaraná induzem perda de peso apenas após a administração do TCPOBOP e não aumentam o dano hepático associado com o ligante do CAR

O tratamento por 15 dias com guaraná (2000mg/kg) ou a cafeína (50 mg/kg) não alteraram o peso vivo dos animais (Figura 10.2). Porém, quando os animais foram administrados com o TCPOBOP, ambos os tratamentos levaram a uma perda de peso após a ativação do CAR ($p=0,018$, ANOVA de duas vias, Figura 10.2). Aparentemente, esta perda de peso não deve ser considerada de origem hepática, já que não foi notada diferença nos níveis séricos de ALT quando da administração de cafeína ou guaraná aos animais. Entretanto, é importante notar que a ativação do CAR pelo TCPOBOP induziu severo aumento nos níveis séricos de ALT, indicando massiva morte celular de hepatócitos após 48 ($p<0,05$) e 72 horas ($p<0,01$) (Figura 10.2).

Quanto ao colesterol livre no soro, notamos que o TCPOBOP diminuiu os níveis deste após 24, 48 e 72 horas ($p<0,0001$; ANOVA de duas vias; Figura 10.2), porém o guaraná e a cafeína não alteraram este efeito ($p=0,5383$).

10.3.2 A cafeína e o guaraná exacerbam a hepatomegalia induzida pela ativação do CAR

Quando se tratou os camundongos com as doses de guaraná ou cafeína utilizadas neste experimento por 15 dias, nenhuma alteração indicativa de toxicidade foi notada já que não se observou diferenças no peso corpóreo dos animais, peso do fígado, histologia ou nível de ALT sérico (Figura 10.2). Conforme esperado, 24, 48 e 72 horas após a administração do TCPOBOP e conseqüentemente a ativação do CAR, um aumento no peso relativo do fígado foi notado respectivamente de: 28% ($p<0,0001$), 59% ($p<0,0001$) e 103% ($p<0,0001$). De forma interessante, pôde-se notar que o tratamento com cafeína exacerbou este efeito às 48 (+11%; $p<0,0001$) e às 72 horas (10%; $p=0,0034$) em relação aos animais que

receberam apenas o TCPOBOP. Já o tratamento com guaraná apresentou este efeito apenas às 48 horas ($p < 0,0001$), sendo imperceptível às 72 horas ($p > 0,05$; Figura 10.2).

Figura 10.2 – Peso corpóreo e do fígado, ALT, colesterol e colágeno. (A) O guaraná e a cafeína diariamente não alteraram o peso vivo dos animais antes do TCPOBOP; (B) Por outro lado, após o TCPOBOP ambos os grupos perderam peso (ANOVA de duas vias; $p = 0,0018$); (C) Peso relativo do fígado aumentou após exposição ao TCPOBOP às 48 e 72 horas. Além disso, 48 horas após TCPOBOP, a cafeína e o guaraná exacerbaram este efeito, No entanto, às 72 horas, apenas a cafeína manteve este efeito; (D) A administração do TCPOBOP induziu um aumento no ALT sérico as 48 e 72 horas indicando dano hepático; (E) A ativação do CAR diminuiu o colesterol sérico após 24, 48 e 72 horas; (E) O colágeno hepático sofreu alteração 24 horas depois do TCPOBOP, indicando remodelamento tecidual. * - $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,01$

10.3.3 A cafeína e o guaraná aumentam a hepatomegalia induzida pelo TCPOBOP por aumentar a proliferação dos hepatócitos

O ligante do CAR induz proliferação hepática e hipertrofia para aumentar a capacidade metabólica do fígado levando à hepatomegalia descrita acima. Como pode ser visto na Figura 10.3, uma única administração de TCPOBOP induziu a proliferação celular que teve seu pico às 48h (índice de proliferação de 49%; $p<0,01$). Além disto, observou-se que a cafeína ($p<0,05$) e o guaraná ($p<0,01$) aumentaram a proliferação celular às 24 horas, quando comparado ao grupo tratado apenas com TCPOBOP (CT= $12,88 \pm 4,05$; CAF= $26,82 \pm 10,66$; GUA= $36,44 \pm 5,99$; Figura 10.3), sendo que este efeito foi o responsável pela exacerbação da hepatomegalia gerada pelo TCPOBOP. É relevante que os dados da imunoistoquímica e do western blot para PCNA demonstraram os mesmos resultados (Figura 10.3).

Figura 10.3 – Proliferação dos hepatócitos após ativação do CAR. (A) TCPOBOP aumentou a proliferação celular que teve pico em 48 horas. Interessantemente a cafeína e o guaraná aumentaram este efeito às 24 horas; (B) Imunoistoquímica para PCNA mostrando maior número de células marcadas às 24 horas nos animais tratados com cafeína e guaraná; (C) Western blot para PCNA mostrando mesmo efeito descrito no item (B). Todas as linhas foram carregadas igualmente com proteínas. * - $p < 0,01$; ** $p < 0,05$

10.3.4 A ativação do CAR gera extensa degeneração vacuolar e conseqüente remodelação tecidual: ausência de efeito da cafeína e do guaraná

A administração do TCPOBOP alterou a morfologia hepática às 24, 48 e 72 horas (Figura 10.4). Às 24 horas foi notada extensa degeneração vacuolar nas zonas 1 e 2. Por outro lado, às 48 horas, aparentemente as áreas vacuolizadas se recuperaram e apenas alguns hepatócitos apresentaram-se com degeneração vacuolar. Por fim, às 72 horas após a exposição ao TCPOBOP, degeneração vacuolar nos hepatócitos por todas as zonas 1 e 2 foram novamente observadas. Também foi possível verificar a presença de alguns focos de infiltrado inflamatório, sendo estes eventos provavelmente responsáveis pelo aumento do ALT sérico neste período após a ativação do CAR. O tratamento com cafeína e guaraná não alteraram a histologia do fígado quando comparados aos animais controle, mesmo após a administração do TCPOBOP.

É esperado que a morfologia hepática sofra alterações após a administração com o TCPOBOP principalmente para acomodar e gerar espaço para a nova população de hepatócitos formados, sendo possível notar alterações na distribuição e quantidade de colágeno. As fibras de colágeno estão presentes na matriz extracelular do fígado e têm importante papel na manutenção da organização tecidual e morfologia celular. Neste experimento, o colágeno foi estudado pelo método de Picrosirius, onde as fibras se coram de vermelho e apresentam bi-refringência se submetidas à luz polarizada. Foi observado alteração na quantidade de colágeno às 24 horas após a administração do TCPOBOP ($p=0,0403$; Figura 10.2). Nem a cafeína ou o guaraná induziram alterações significativas após a administração do TCPOBOP quando comparados ao respectivo grupo controle.

Figura 10.4 – Alterações hepáticas histológicas após administração do TCPOBOP. (A) fotomicrografia representativa de fígado de animal do grupo controle que não recebeu o TCPOBOP; (B) fotomicrografia representativa de fígado de animal do grupo controle após 24 horas do TCPOBOP, notar degeneração vacuolar na zona 1 e parcialmente na zona 2; (C) Após 48 horas do TCPOBOP pode-se notar que a degeneração vacuolar apresenta-se diminuída em relação às 24 horas; (D) Após 72 horas do TCPOBOP, a degeneração vacuolar apresenta-se um pouco mais intensa que nos períodos anteriores. Todas fotomicrografias foram realizadas em aumento de 200x e as barras brancas equivalem a 50 µm

10.3.5 Ativação do CAR leva a perda da capacidade de comunicação intercelular por junções GAP

Assim como o Fenobarbital, o TCPOBOP é conhecido como uma substância que diminui a GJIC (REN; RUCH, 1996). Diversos estudos indicam que este processo pode ser mediado por diversas quinases de tirosina (WARN-CRAMER; LAU, 2004), incluindo-se as

quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Aqui, nós demonstramos que após a administração do TCPOBOP, a capacidade de GJIC foi diminuída às 48 ($p < 0,01$) e às 72 horas ($p < 0,01$; Figura 10.5). Também, uma correlação inversa entre a proliferação celular e a capacidade de GJIC foi observada (Spearman $r = -0,6364$; intervalo de confiança: $-0,8987$ à $-0,03841$; $p = 0,0402$). Um dado interessante é que quando os animais foram tratados previamente com guaraná ou cafeína, apenas os que receberam cafeína apresentaram uma maior perda das GJIC às 24 horas ($p = 0,0124$; Figura 10.5 e 10.6).

10.3.6 As alterações na capacidade das GJIC ocorre devido aos níveis de conexinas26 e 32

Os hepatócitos expressam as conexinas 26 e 32 (WILLECKE et al., 1999). Conforme esperado, as diferenças das capacidades das GJIC ocorreram devido a alterações na expressão destas conexinas. Como notado na figura 10.7, aparentemente ocorre um acúmulo das Cx26 e 32 às 24 horas (possivelmente por fosforilação pelas quinases de tirosina), praticamente desaparecem às 48 horas e voltam a aumentar novamente às 72 horas, corroborando com os dados da capacidade das GJIC mostradas acima. Além disso, a cafeína aparentemente diminuiu a expressão da conexina26 24 horas após a administração do TCPOBOP, levando a menor capacidade de GJIC notada (Figura 10.7).

Figura 10.5 – Comunicação Intercelular por Junções do tipo GAP. Fotomicrografias representativas do fígado de camundongos do grupo controle que receberam TCPOBOP e foram eutanasiados imediatamente (A), 24 (B), 48 (C) e 72 horas(D)

Figura 10.6 – Efeitos do TCPOBOP sobre a GJIC. (A) A administração do TCPOBOP induziu diminuição da GJIC às 48 e 72 horas; (B) A cafeína diminuiu a GJIC às 24 horas; Foram utilizados quatro animais por grupo para análise da GJIC * - $p < 0,01$; ** - $p = 0,0124$

Figura 10.7 – Efeitos do TCPOBOP sobre a expressão das Connexinas. (A) Expressão das Cx26 e Cx32 após o TCPOBOP: notar alterações em 24, 48 e 72 horas; (B) Western blot para connexina26 e actina. (C) Análise densitométrica do western blot (B). A cafeína diminuiu a expressão da Cx26 em relação ao grupo controle às 24 horas. Foram utilizados três animais por grupo para análises de western blot

10.3.7 Indução enzimática de CYP1A2, CYP2B10 E CYP3A11 pela cafeína e guaraná: um possível papel do CAR

Quando os camundongos foram tratados por 15 dias com cafeína ocorreu indução enzimática da CYP1A2 (1,98; $p < 0,05$ Figura 10.8), porém o guaraná apesar de aparentemente aumentar a expressão em 2,34 vezes, esta não foi de forma significativa ($p = 0,11$). Além disso, foi notada a expressão aumentada de outras enzimas do citocromo p450, como CYP2B10 (11 e 15 vezes respectivamente; $p < 0,01$) e CYP3A11 (1,98 e 1,81 vezes respectivamente; $p < 0,05$). Estes efeitos podem ter ocorrido devido ao aumento da expressão do CAR observado, induzido tanto pela cafeína como pelo guaraná (1,43 e 1,62 vezes, respectivamente; $p < 0,05$ e $p < 0,01$). É importante salientar que estas diferenças significam 43 e 62% mais CAR sendo expresso, devendo-se levar em conta que este receptor já é expresso em altos níveis no fígado de camundongos. Portanto, estes aparentes pequenos aumentos na expressão do CAR podem ser responsáveis pela indução enzimática demonstrada acima.

10.3.8 A cafeína e o guaraná exacerbam a transcrição pelo CAR de CYP1A2 e CYP3A11 após administração do ligante TCPOBOP

Vinte e quatro horas após os camundongos receberem o TCPOBOP, intensas alterações foram notadas no que condiz a expressão das enzimas do citocromo p450: CYP1A2, CYP2B10 e CYP3A11 (figura 10.8). A que mais teve aumentada sua expressão, conforme esperado, foi a CYP2B10 (250 vezes; $p < 0,0001$), seguida pela CYP3A11 (7,45 vezes; $p < 0,0001$) e pela CYP1A2 (5,3 vezes; $p < 0,0001$).

Após as 24 horas da exposição ao TCPOBOP, a cafeína aumentou a expressão da CYP1A2 (341%; $p < 0,0001$) em relação ao animal tratado apenas com TCPOBOP e da CYP3A11 (23%, $p < 0,05$), sendo que não foi encontrada diferença na expressão da CYP2B10. Por outro lado, o guaraná não alterou a expressão destas enzimas após 24 horas do desafio com o TCPOBOP (Fig. 10.8).

10.3.9 A cafeína e o guaraná aumentam a expressão do CAR após 24 horas da administração do TCPOBOP

Após 48 horas do desafio com o TCPOBOP, a ativação do CAR levou a um aumento da sua própria expressão em cerca de 4,41 vezes ($p < 0,0001$, Fig. 10.8). Além disso, é interessante notar que o tratamento prévio com cafeína (46%; $p < 0,05$) ou guaraná (86%; $p < 0,0001$) levaram a um aumento significativo da expressão do CAR 24 horas depois do TCPOBOP. Esta indução da expressão do mRNA do CAR corrobora com todas as alterações sinérgicas observadas entre os tratamentos com cafeína e guaraná e a administração do ligante do CAR, especialmente com o peso relativo do fígado, com a proliferação celular e com a capacidade de GJIC.

Figura 10.8 – Expressão de enzimas do citocromo p450 e do receptor CAR após tratamento com cafeína e guaraná. (A) Expressão da CYP1A2 nos animais tratados apenas com cafeína e guaraná e após 24 horas da aplicação do TCPOBOP; (B) Expressão da CYP2B10 nos animais tratados apenas com cafeína e guaraná e após 24 horas da aplicação do TCPOBOP; (C) Expressão da CYP3A11 nos animais tratados apenas com cafeína e guaraná e após 24 horas da aplicação do TCPOBOP; (D) Expressão do receptor CAR nos animais tratados apenas com cafeína e guaraná e após aplicação do TCPOBOP; Foram utilizados três animais por grupo com replicatas para análises da expressão gênica. * - $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$

10.4 DISCUSSÃO

O uso exacerbado dos produtos originários de plantas por todo mundo torna importante os estudos onde se avaliem os mecanismos moleculares que por ventura estejam alterados após o consumo destes produtos naturais. Por exemplo, um estudo recente demonstrou que nos Estados Unidos, tem se estimado o uso de 20000 produtos oriundos de plantas (BENT; KO, 2004). Aqui, nós mostramos que o guaraná, uma planta rica em cafeína utilizada muitas vezes como suplemento na dieta ou mesmo como fitoterápico, aumenta a expressão do receptor CAR e conseqüentemente de seus alvos como a CYP2B10, CYP1A2 e CYP3A11.

Mesmo sendo utilizadas doses de cafeína (50mg/kg) e de guaraná (2000mg/kg) as quais poderiam ser consideradas elevadas neste experimento, os camundongos não apresentaram qualquer sinal de toxicidade já que nenhuma alteração no peso corpóreo, na ALT sérica ou na análise histopatológica do fígado e dos outros órgãos foram observadas. Estes resultados corroboram com outros previamente publicados onde o guaraná não foi tóxico para ratos e camundongos (MATTEI et al., 1998a). Além disso, é importante notar que os animais utilizados neste experimento são considerados adultos (mais de 3 meses de idade) tendo atingido quase que completamente seu peso corpóreo máximo. Também deve-se levar em consideração que as doses e o tempo utilizados neste experimento são menores que os necessários para se atingir o efeito de perda de peso esperado pelo consumo de cafeína e guaraná.

No que concerne ao fígado, ambos os tratamentos não induziram alterações já que não houve modificação no peso relativo do fígado, nos níveis de ALT e colesterol séricos e no exame histopatológico. Por isso, não foi necessário avaliar a proliferação celular ou a comunicação por junções GAP nestes grupos. No entanto, após 15 dias de tratamento com guaraná ou cafeína observamos indução enzimática das citocromo p450, já que todas as monoxigenases analisadas apresentaram-se alteradas. Atenção especial deve ser dada para a CYP2B10, reconhecida como alvo da atividade de transcrição do receptor CAR (HONKAKOSKI et al., 1998). Esta enzima apresentou o maior aumento após ambos os tratamentos, comparando-se com as outras duas enzimas, CYP1A2 e CYP3A11. Além disso, nossos dados indicaram que os níveis da expressão do receptor CAR estavam aumentados

após o tratamento com cafeína e guaraná após 15 dias. Levando-se em conta todos estes resultados, é possível discutir que o guaraná, principalmente pelo seu conteúdo de cafeína, induziu a expressão de enzimas do citocromo p450 pela indução do receptor CAR. Além disso, no presente trabalho, demonstrou-se que o já conhecido efeito da cafeína sobre a CYP1A2 pode envolver a expressão aumentada do receptor CAR, fato este já proposto para outras drogas (LEE et al., 2007).

O TCPOBOP é cerca de 650 vezes mais potente que o fenobarbital sobre a ativação do receptor CAR sendo que ambos produzem um aumento no peso do fígado, induzem proliferação do retículo endoplasmático e aumentam a atividade microsomal de hidrolase epóxido e citosólica da glutathione S-transferase (POLAND et al., 1980). Já foi demonstrado que o efeito pleiotrópico do TCPOBOP ocorre porque ele é um ligante agonista do receptor CAR (TZAMELI et al., 2000). Além disso, a hepatomegalia encontrada após a administração do TCPOBOP em nosso experimento foi resultado tanto da hipertrofia celular como do aumento da proliferação celular (WEI et al., 2000), fato este demonstrado pela maior imunodeteção do PCNA às 48 horas após a administração do TCPOBOP. Sabendo que o tamanho do fígado é alterado após a ativação do CAR, eram esperadas alterações na quantidade de colágeno já às 24 horas após o TCPOBOP. Conseqüentemente, a morte celular de hepatócitos deve ocorrer para que os novos, com aumentada capacidade metabólica se tornem a população predominante. Com relação a este efeito, esta é a primeira vez que se demonstra que ocorre morte celular após administração de um ligante do CAR, notado principalmente pelo aumento do nível de ALT sérico após 48 e 72 horas. Mesmo que já se tenha demonstrado que o TCPOBOP atenua a injúria hepática induzida pela administração de FAS, por alterar a expressão de proteínas da família BCL-2 (BASKIN-BEY et al., 2006), nossos resultados demonstraram que a morte celular ocorreu como uma resposta do fígado para a hepatomegalia e pôde se sobressair ao efeito anti-apoptótico do TCPOBOP. Quando os animais receberam cafeína e guaraná previamente à administração do TCPOBOP, os camundongos sofreram uma exacerbação da hepatomegalia induzida por esse ligante do CAR. Nós demonstramos ainda que este efeito aconteceu pelo aumento na proliferação celular às 24 horas após a administração do TCPOBOP nos animais tratados com cafeína e guaraná. Por outro lado, não foram observadas alterações no que concerne a histopatologia, ALT e colágeno devido à administração prévia de cafeína e guaraná em comparação ao grupo controle tratado apenas com TCPOBOP.

A comunicação celular pode ser mediada pelas junções GAP, as quais são formadas por dois conéxons, sendo um de cada célula adjacente. Estes conéxons são conhecidos por serem formados pela oligomerização de 6 conexinas, as quais são membros de uma família multigênica, contendo pelo menos 20 tipos diferentes em mamíferos que são expressos de forma tecido-específica (WILLECKE et al., 2002). No fígado, os hepatócitos expressam as conexinas 26 e 32. Neste experimento, nós demonstramos que as alterações induzidas pelo TCPOBOP incluem a perda da capacidade de GJIC devido a diminuição na quantidade de Cx26 e Cx32 no tecido hepático. Além disso, uma correlação inversa com a proliferação celular foi notada, a qual é conhecida em alguns tipos de cânceres e em algumas condições fisiológicas onde a proliferação celular é alterada. Mesmo sendo observado que o TCPOBOP alterou a expressão das conexinas e conseqüentemente da capacidade de comunicação intercelular por junções GAP após 48 e 72 horas, nós apenas verificamos que a cafeína diminuiu a capacidade de GJIC após 24 horas da aplicação do TCPOBOP, fato este que se correlaciona com o aumento de proliferação celular observado no mesmo período. Aparentemente, o guaraná apresenta outros fitoquímicos, que não apenas a cafeína, que previniram a perda das junções GAP mesmo ocorrendo maior proliferação celular às 24 horas após o TCPOBOP. Este efeito será estudado e discutido em outra ocasião.

Nossos resultados concordam com a literatura no que condiz a diversas evidências que demonstram que a administração do TCPOBOP resulta na ativação do receptor CAR, e como resultado aumenta a expressão de enzimas do citocromo p450, especialmente a CYP2B10 e em menor grau as CYP1A2 e CYP3A11 (HONKAKOSKI et al., 1998; WEI et al., 2000; ZHANG, J. et al., 2002). Interessantemente, a cafeína após 24 horas da aplicação do TCPOBOP elevou a expressão das CYP1A2 e CYP3A11, não alterando a expressão da CYP2B10 quando comparado com os animais que receberam apenas o TCPOBOP. Além disso, a ativação do CAR induziu uma retro-alimentação positiva na expressão do mRNA do CAR 24 e 48 horas após a aplicação do ligante, sendo que ambos os tratamentos prévios, o guaraná e a cafeína, aumentaram este efeito após 24 horas. Todos estes resultados levam-nos a crer que o guaraná, principalmente por seu conteúdo de cafeína, ativa o receptor CAR, fato este que se comprovou após a aplicação do seu ligante, TCPOBOP. Devemos levar em consideração no presente momento, que não se pode descartar a possibilidade que tal efeito tenha ocorrido devido à ativação de outros receptores nucleares (por exemplo, o PXR), os quais podem *per se* terem regulado a expressão do CAR (PASCUSI et al., 2007;

PATEL et al., 2007). Dando suporte a esta hipótese, já foi demonstrado que diversos destes receptores nucleares de metabolismo apresentam efeitos complementares (GUO et al., 2003) e podem se entrecruzar no que concerne a regulação dos genes que codificam as enzimas de biotransformação e gliconeogênicas (KODAMA et al., 2004). Portanto, é possível considerar que a cafeína regule mais que um único receptor.

A luz do nosso conhecimento, esta é a primeira vez que se demonstra que o guaraná e a cafeína apresentaram efeitos sobre um receptor nuclear de metabolismo. Nós demonstramos ainda que a indução das CYP1A2, CYP2B10 e CYP3A11, após o tratamento por 15 dias com guaraná e cafeína, ocorreu concomitantemente com aumento na expressão do receptor CAR. É importante notar que os agonistas do CAR podem ser futuramente considerados potenciais drogas para estimular a proliferação dos hepatócitos durante o período de regeneração hepática posterior a transplante de fígados cadavéricos em estado não tão adequado (COSTA et al., 2005). Se a cafeína ou extratos de guaraná podem ser utilizados com este propósito, remanescerá como hipótese para trabalhos futuros. Agora nossos esforços se concentrarão em definir se outros receptores nucleares de metabolismo teriam função nestes resultados. Entender a farmacocinética molecular da cafeína definitivamente resultará em melhores formulações de drogas (por exemplo, em conjunto com o acetaminofeno) e prescrições por parte dos médicos.

Capítulo 11

Possíveis Interações Medicamentosas entre Fito e Quimioterápicos

*A ser publicado sob o título: “Natural é sinônimo de
saudável? Os fitoterápicos e suas interações
medicamentosas na terapia do câncer”*

11 Natural É Sinônimo De Saudável? Os Fitoterápicos E Suas Interações Medicamentosas Na Terapia Do Câncer

Heidge Fukumasu^a, Natalia P. Bracci^a, Silvana Lima Górnjak^a e Maria Lucia Zaidan-Dagli^a

^a Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, São Paulo, SP, Brasil

11.1 INTRODUÇÃO

Atualmente o tratamento dos cânceres, em sua grande maioria, é considerado como um dos problemas mais desafiadores da medicina (CHABNER; ROBERTS, 2005). A partir do momento que o tumor primário metastatiza pelo corpo do hospedeiro o prognóstico se torna extremamente ruim, sendo a quimioterapia a principal forma de tratamento neste estágio. Se por um lado a quimioterapia tem a vantagem de acessar igualmente às metástases disseminadas pelo corpo, por outro lado, apresenta desvantagens principalmente relacionadas aos seus efeitos colaterais, pois na grande maioria das vezes os quimioterápicos apresentam baixo índice terapêutico, o que significa que a dose terapêutica é muito próxima da dose tóxica. Desta maneira, a pesquisa tanto básica como aplicada é fundamental para o desenvolvimento de novas drogas antitumorais, sendo que a cada dia estudam-se novas opções para o tratamento do câncer. Dentre estas, os produtos naturais oriundos de plantas têm surgido com o intuito de tratar ou mesmo prevenir o câncer, sendo que seu consumo tem aumentado rapidamente no mundo ocidental. Nesta classe incluem-se os fitoterápicos (medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais empregando-se exclusivamente derivados de drogas vegetais) e os suplementos dietéticos herbáceos (produtos oriundos de plantas com diversos efeitos reconhecidos). Algumas destas plantas têm demonstrado efeitos quimiopreventivos e antitumorais interessantes, no entanto, o principal problema ocorre quando estas são consumidas simultaneamente com as drogas convencionais prescritas, devido às interações medicamentosas causadas.

Levando-se em conta que o índice terapêutico dos quimioterápicos muitas vezes é estreito e que diversos produtos naturais podem alterar a expressão de diversas enzimas relacionadas à biotransformação de drogas, as interações medicamentosas na terapia do câncer, devido ao uso de fitoterápicos, são de extrema importância. É importante ressaltar o fato de que muitos pacientes oncológicos sequer relatam a utilização concomitante destes durante seu tratamento com a quimioterapia convencional (MEIJERMAN; BEIJNEN; SCHELLENS, 2006). Acredita-se que possivelmente devido a estas interações é que em diversos casos o tratamento com quimioterápico é considerado falho. O objetivo do presente trabalho é neste momento demonstrar que os fitoterápicos devem ser

considerados importantes quanto a estas interações, revisando sistematicamente os dados importantes dos principais fitoterápicos brasileiros.

11.2 FATORES QUE ORIGINAM A RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA

Todos os pacientes oncológicos que não respondem bem à excisão cirúrgica e a radioterapia ou apresentam metástases disseminadas são geralmente tratados com medicamentos quimioterápicos. Esta opção terapêutica pode levar a remissão completa do tumor, mas ainda é considerável o número de pacientes que não respondem bem a quimioterapia ou apresentam efeitos colaterais. A quimioterapia convencional utiliza-se de drogas que têm como alvo diversos processos fisiológicos das células, sendo estes geralmente relacionados às células que proliferam mais rapidamente, ou seja, que têm elevada taxa de mitose, uma característica presente na grande maioria dos diferentes tipos de tumores. Para seus efeitos ocorrerem, estas drogas precisam atingir seus alvos biológicos em quantidades suficientes, quer seja o DNA [agentes alquilantes (ciclofosfamida e cisplatina, por exemplo)], a maquinaria de replicação de DNA [agentes antifolatos (metotrexato) e antibióticos (doxorubicina)], ou os microtúbulos [agentes antipolimerizantes (alcalóides da vinca) e estabilizadores (paclitaxel e docetaxel)], entre outros. Podemos comparar o caminho a ser percorrido pela droga, desde sua administração até sua chegada ao sítio tumoral com um labirinto, onde diversos desvios e caminhos sem saída existem e podem atrapalhar seu efeito esperado. Dentre estes “desvios”, podemos citar:

- a) diminuição do influxo da droga para dentro da célula;
- b) aumento da expulsão da droga de dentro da célula;
- c) ativação dos sistemas de biotransformação das drogas;
- d) maior conjugação para excreção das drogas;
- e) bloqueio de apoptose induzida pelas drogas e;
- f) aumento do reparo aos danos no DNA.

Dentre as possibilidades acima apenas o bloqueio de apoptose e o reparo de DNA não são consideradas alterações farmacocinéticas que a célula tumoral pode apresentar. Para melhor compreensão podemos caracterizar a farmacocinética das drogas como sendo “os efeitos que o corpo gera nas drogas”, ou seja, os mecanismos responsáveis que atuam sobre a droga com a finalidade de mais rapidamente eliminá-la do corpo. Assim como a farmacodinâmica pode ser considerada como “os efeitos que a droga gera no corpo”, levando-se em conta principalmente o mecanismo de ação das drogas neste caso. Considera-se que grande parte das interações medicamentosas que resultam em efeitos colaterais ou mesmo na morte do paciente acontecem devido a alterações relacionadas à farmacocinética da droga.

11.3 COMO OCORREM AS INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS?

Interação medicamentosa pode ser definida como sendo a resposta farmacológica ou clínica da co-exposição da droga convencional com outra substância que acaba modificando a resposta do paciente à droga. Considera-se que cerca de 20 a 30% das reações adversas a drogas ocorrem por interações medicamentosas (KUHLMANN; MUCK, 2001). Uma grande preocupação com o paciente oncológico é que este geralmente necessita receber diversos medicamentos além do quimioterápico para minimizar as possíveis complicações, como vômitos, diarreia, enjôos, dores de cabeça, baixa da imunidade etc. Neste momento se torna extremamente importante para o oncologista saber que além destas drogas, diversos componentes naturais podem alterar a farmacocinética dos quimioterápicos. Logo, especial atenção deve ser dada tanto à dieta do paciente quanto ao uso de fitoterápicos em conjunto à quimioterapia. Os principais efeitos destas interações medicamentosas são relacionados com o aumento ou diminuição do potencial citotóxico do quimioterápico e o aumento dos efeitos colaterais.

Conforme dito anteriormente, as alterações relacionadas à farmacocinética das drogas são as mais importantes, sendo relacionadas à:

a) Absorção – Importante, principalmente para drogas que são administradas pela via oral. Diversos são os efeitos que o alimento ingerido em uma refeição pode gerar no estômago, a

exemplo do atraso no esvaziamento gástrico, aumento do pH intestinal, aumento do fluxo sanguíneo entero-hepático e diminuição do trânsito gastrointestinal (KUHLMANN; MUCK, 2001). O atraso no esvaziamento gástrico, devido aos alimentos faz com que o quimioterápico fique mais tempo em pH ácido, podendo levar a sua degradação já no estômago. Como exemplo, pode-se citar o clorambucil, que tem sua absorção diminuída e atrasada, sofrendo um grau considerável de hidrólise pelo baixo pH estomacal, diminuindo assim a quantidade biodisponível para as células tumorais (ADAIR; MCELNAY, 1986). Por outro lado, as alterações fisiológicas geradas pela alimentação acabam aumentando a absorção do Erlotinib® - um inibidor da ação tirosina quinase do receptor de EGF administrado pela via oral – (SMITH, N. F. et al., 2008), podendo aumentar a concentração máxima no organismo e induzir seus efeitos colaterais. Portanto é importante para o oncologista explicar ao paciente que diversos quimioterápicos devem ser administrados uma ou duas horas antes das refeições diminuindo-se assim as possíveis alterações induzidas pelas refeições.

Além disto, a administração de produtos naturais aos pacientes oncológicos pode levar ainda a uma menor absorção da droga administrada pela via oral. O exemplo clássico é o suco de Toranja (*Grapefruit*), um conhecido inibidor da enzima do complexo do citocromo p450 CYP3A4 nos enterócitos (EDWARDS; BELLEVUE; WOSTER, 1996). Desta maneira, este suco acaba por aumentar a biodisponibilidade de diversas drogas, onde alguns quimioterápicos podem então ter seus efeitos colaterais aumentados. Diversas outras plantas já demonstraram efeitos inibitórios sobre a expressão da CYP3A4, como extratos de batata africana (NAIR et al., 2007), *Ginkgo biloba* (YALE; GLURICH, 2005), algumas plantas indonésias (USIA et al., 2006) etc.

b) Distribuição – a partir do momento que a droga entra na corrente sanguínea, quer seja ela administrada pela via intravenosa ou ter sido absorvida pela via oral, esta se liga às proteínas plasmáticas, como a albumina, lipoproteínas e imunoglobulinas. Se algum fitoterápico for administrado prévia ou simultaneamente com o quimioterápico, este pode ter substâncias que se ligam às proteínas plasmáticas, diminuindo assim a quantidade livre destas proteínas para se ligarem aos quimioterápicos, gerando também menor disponibilidade destas drogas.

Outro fator importante quanto à distribuição das drogas é a presença de transportadores específicos nos hepatócitos, denominados de polipeptídios transportadores de ânions orgânicos (do inglês OATP – *organic anion transporter polypeptides*) que têm a

função de auferir os quimioterápicos presentes na corrente sanguínea para dentro do hepatócito. Alguns flavonóides de plantas como chá-verde, ginkgo, sementes de uva entre outros apresentaram efeito inibitório sobre o transporte gerado pelo OATP-B em células do epitélio intestinal humano (FUCHIKAMI et al., 2006). Estes resultados sugeriram que a co-administração destes suplementos dietéticos poderia diminuir a absorção oral de substratos do OATP-B. Já a naringina, um flavonóide isolado da toranja (Grapefruit), é um inibidor seletivo do OATP1A2, podendo ser utilizado na clínica por sua administração ser considerada bem segura (BAILEY et al., 2007).

c) Biotransformação – definitivamente o maior número de interações medicamentosas por fitoterápicos ocorre por indução ou repressão enzimática de proteínas de fase I ou fase II. Enzimas de fase I são consideradas como sendo responsáveis pela hidroxilação de moléculas com características mais lipofílicas, com a finalidade de tornar mais eficiente a excreção destas moléculas pela via renal. Nesta classe são consideradas todas as enzimas do complexo do citocromo p450 assim como as aldeído/álcool – desidrogenases, entre outras. Hoje, são conhecidos 57 genes diferentes que codificam para enzimas do citocromo p450 em humanos (NELSON et al., 2004), sendo que estas possuem funções variando desde a biotransformação de xenobióticos ao metabolismo de hormônios como a aromatização de andrógeno a estrógeno. Estas enzimas não são específicas quanto ao seu substrato, podendo atuar sobre diversas substâncias diferentes, tanto endógenas quanto exógenas. Em humanos as principais enzimas relacionadas à biotransformação de xenobióticos pertencem às famílias 1, 2 e 3, sendo as CYP3A4, CYP2D6, CYP1A2 e CYP2D9 responsáveis respectivamente por biotransformar 33%, 23%, 14% e 14% de todas as drogas conhecidas (RENDIC; DI CARLO, 1997). Diversos quimioterápicos convencionais usados no tratamento do câncer são drogas que atuam diretamente nas células tumorais, porém outros são pró-drogas que precisam ser biotransformadas para terem efeito. Desta maneira, como grande parte dos quimioterápicos sofre a ação de enzimas do citocromo p450, indica-se o trabalho (SCRIPTURE; FIGG, 2006) para melhor compreensão da matéria, visto que difere do objetivo do presente trabalho.

d) Eliminação – a eliminação das drogas pelas células tem como passo importante as proteínas transportadoras, que têm por função expulsar da célula os xenobióticos. A expressão destes genes é considerada fundamental quanto à quimioterapia, pois em sua grande maioria estão relacionados com a resistência a múltiplas drogas (do inglês *Multi Drug*

Resistance – MDR). Por exemplo, a família de proteínas transportadoras dependentes de ATP, ABCB1 é implicada na modulação, tanto da absorção quanto da eliminação das drogas (SHAROM, 2008). Elas são localizadas tanto na membrana apical das células epiteliais intestinais (daí sua importância na absorção), quanto nos bordos em escova da membrana proximal das células dos túbulos renais (tendo função na eliminação de substâncias) (SCRIPTURE; FIGG, 2006). Estas proteínas são consideradas importantíssimas quando do tratamento com quimioterápico para o câncer já que se demonstrou em diversos trabalhos que as células tumorais acabam se tornando resistentes aos quimioterápicos por aumentarem a expressão destas proteínas. Desta maneira, as células tumorais expulsam a droga antes mesmo de chegar ao seu alvo biológico, diminuindo assim sua eficácia.

11.4 QUAL A IMPORTÂNCIA DOS RECEPTORES XENO-SENSORES?

Existem algumas proteínas específicas nas células que são consideradas ponto-chave na coordenação da resposta do organismo a determinado toxicante. Estas são denominadas receptores “xeno-sensores”, como o Receptor CAR, o Receptor PXR, o Receptor AhR, entre outros, sendo essenciais na maneira como o organismo atua sobre um xenobiótico, ou seja, são controladores centrais da farmacocinética das drogas. Isto acontece porque são fatores de transcrição, que quando ativados induzem ou reprimem a expressão de diversos genes relacionados tanto à biotransformação quanto à absorção/eliminação de drogas. Estes receptores agem coordenadamente induzindo genes envolvidos em todas as fases do metabolismo das drogas, incluindo o metabolismo oxidativo, conjugação e transporte (BOCK; KOHLE, 2004).

O CAR e o PXR, ambos receptores órfãos, que foram descobertos a não mais que 15 anos (BAES et al., 1994; KLIEWER et al., 1998), são conhecidos principalmente por induzir genes das famílias CYP2B e CYP3A, respectivamente. Apenas lembrando, a CYP3A4 por si só é responsável por biotransformar de 50 a 60% de todas as drogas prescritas (GUENGERICH, 1999), sendo que desta maneira é fundamental compreender a existência e a importância destes receptores nucleares nas interações medicamentosas. Ainda não se tem certeza se os ligantes para o CAR e PXR precisam ter alta afinidade ou se ambos receptores

têm uma função mais geral quanto à biotransformação de xenobióticos, sendo menos específicos quanto aos seus ligantes. Desta maneira, a cada dia aumenta o número de trabalhos publicados demonstrando novas substâncias, tanto de origem sintética como natural, como ativadores destes receptores. Por exemplo, em nosso Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada recentemente mostrou-se que a cafeína, substância presente em diversas plantas e medicamentos, aumenta a expressão do receptor CAR em camundongos (capítulo 10), levando a um aumento também do seu principal gene alvo, a CYP2B10. Ainda não se pode afirmar que o efeito da cafeína é estritamente sobre o receptor, tendo em vista que alguns outros receptores, como o PXR (ROSENFELD et al., 2003), o HNF-4 (PASCUSI et al., 2007) e o AhR (PATEL et al., 2007), regulam também a expressão do CAR e conseqüentemente a CYP2B10. É possível então que o consumo de cafeína simultaneamente com algum quimioterápico possa alterar sua farmacocinética, induzindo efeitos colaterais ou diminuindo a eficácia da droga anti-tumoral.

11.5 PRODUTOS NATURAIS ORIUNDOS DE PLANTAS – ENFOQUE NOS MECANISMOS TOXICOCINÉTICOS

Diversos trabalhos científicos e epidemiológicos demonstraram que o consumo de algumas plantas tem ação quimiopreventiva e/ou antitumoral (SPORN; SUH, 2002b; SURH, 2003a). Entretanto, o maior problema tem sido o fato de que estes dados acabam por aumentar vertiginosamente o consumo destas plantas com estas finalidades. Conforme dito anteriormente, potenciais interações medicamentosas podem ocorrer entre as drogas antitumorais e os fitoterápicos, levando ao aumento dos efeitos colaterais ou perda da ação citotóxica dos primeiros. No Brasil o consumo de fitoterápicos tem aumentado a cada dia com a divulgação de dados por vezes imprecisos transmitidos pela imprensa referente aos trabalhos científicos que demonstram algum efeito preventivo ou terapêutico das plantas medicinais. Tais informações, em conjunto com a dita medicina popular, têm gerado uma tendência na população de interpretar que plantas medicinais em formulações medicamentosas, como cápsulas, não são tóxicas tampouco prejudiciais à saúde, por assumirem que são medicamentos provenientes de plantas já consumidas na forma de chás.

Aliado ao aumento desta demanda, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, órgão do Ministério da Saúde responsável pela regulamentação e fiscalização de medicamentos) tem apresentado dificuldades no controle da comercialização e fabricação destes medicamentos, por falta de fiscais habilitados e capacitados para farmacovigilância. Como consequência o mercado paralelo tem comercializado livremente fitoterápicos sem registro, controle de qualidade e receituário médico.

Segundo a própria ANVISA (Lei 5.991/73), os produtos alimentares à base de plantas podem ser comercializados quando comprovado seu controle de qualidade, avaliado o risco à saúde humana e registrados junto a Gerência Geral de Alimentos (RDC nº 16/99, RDC nº 18/99 e RDC nº 19/99). Desta forma isenta-se o registro como fitoterápico junto a Gerência Geral de Medicamentos, caso não apresentem formas terapêutica (ex. cápsula) e alegações terapêuticas em suas rotulagens. O suposto Suplemento Alimentar a base de plantas medicinais, que visa desintoxicar e outros efeitos benéficos, tem demonstrado que pode ser altamente prejudicial quando associado a certos compostos químicos. A legislação (Lei nº 6.360/76; Portaria RDC nº 48/04) determina que no ato do registro do produto este seja submetido a estudos como: teor microbiológico, estabilidade, toxicológicos, farmacológicos, pré-clínicos, clínicos, dentre outros, para comprovação da eficiência do medicamento e preservação da saúde humana. Ocorre que dentre os estudos necessários, o teste comprobatório de interação medicamentosa, a empresa registradora é passiva de selecionar os compostos químicos aos quais se deseja verificar incompatibilidade. Com isto, a empresa deixa uma lacuna entre o selecionado e o real, isto é, até o momento, disponível para o centro de pesquisa, não existe um método validado para comprovar interação medicamentosa em pacientes, por exemplo, submetidos à quimioterapia. Outro aspecto importante é que em decorrência dos estudos realizados pela indústria serem de propriedade da mesma, muitos trabalhos submetidos às autoridades reguladoras não são publicados. Em consequência as instituições de pesquisa ficam sem ter acesso a importantes informações científicas, bem como a população, na qual, na prática, acaba restando apenas as informações divulgadas pela imprensa, que nem sempre são embasadas por fundamentações. Segundo levantamentos recentes, existem cerca de 400 fitoterápicos registrados junto a ANVISA, formulados a partir de 60 plantas medicinais onde 10 destas são nativas (ANVISA, 2007). As plantas com maior número de registros no Brasil são apresentadas na tabela 11.1 e tabela 11.2 (plantas nativas brasileiras).

Tabela 11.1 – Plantas com maior número de registros junto a ANVISA (Setembro 2007)

Colocação	Plantas
1	Ginkgo (<i>Ginkgo biloba</i>)
2	Castanha da Índia (<i>Aesculus hippocastanum</i>)
3	Ginseng (<i>Panax ginseng</i>)
4	Sene (<i>Senna alexandrina</i>)
5	Boldo (<i>Peumus boldus</i>)
6	Alcachofra (<i>Cynara scolymus</i>)
7	Maracujá (<i>Passiflora incarnata</i>)
8	Valeriana (<i>Valeriana officinalis</i>)
9	Arnica (<i>Arnica montana</i>)

Tabela 11.2 – Plantas nativas registradas junto a ANVISA para produção de Fitoterápicos (Setembro 2007)

Plantas nativas
Aroeira (<i>Schinus terebinthifolius</i>)
Cactus (<i>Cereus brasiliensis</i>)
Carqueja (<i>B. trimera</i> ou <i>B. genistelloides</i>)
Catuaba (<i>Anemopaegma arvense</i>)
Espinheira santa (<i>Maytenus ilicifolia</i>)
Erva-baleeira (<i>Cordia verbenacea</i>)
Ginseng brasileiro (<i>Pfaffia glomerata</i>)
Guaco (<i>Mikania glomerata</i>)
Guarana (<i>Paullinia cupana</i>)
Hortelã (<i>Mentha crispa</i>)

A seguir estão descritas as principais plantas consumidas no Brasil, no que se refere à possibilidade de gerarem interações medicamentosas baseadas em estudos científicos tanto *in vitro*, como *in vivo*.

11.5.1 Ginkgo (*Ginkgo biloba*)

Esta planta tem sido usada na medicina tradicional chinesa há mais de 5000 anos. Acredita-se que seus princípios ativos, glicosídeos flavonóis e terpenóides (ginkgolídeos e bilobalídeos) têm ação nootrópica (drogas que melhoram a perda das habilidades cognitivas humanas). Seus principais usos na medicina chinesa são como antitussígeno, expectorante e antiasmático (DUBEY et al., 2004). Hoje extratos concentrados e padronizados são empregados para o tratamento de insuficiência circulatória periférica, distúrbios cerebrovasculares e Mal de Alzheimer (SIERPINA; WOLLSCHLAEGER; BLUMENTHAL, 2003). Interessantemente nenhum estudo pré-clínico ou clínico foi feito para investigar a farmacologia, eficácia terapêutica ou segurança de extratos brutos de folhas de Ginkgo (BUTERWECK; DERENDORF, 2006). Uma informação importante para os clínicos é que um dos principais constituintes do Ginkgo, o ginkgolídeo B, é um potente antagonista do fator ativador de plaquetas, dessa forma aumenta a fluidez do sangue (AKIBA et al., 1998; KUDOLO; DORSEY; BLODGETT, 2002) e é um importante fator a ser levado em consideração se o paciente apresenta alguma complicação na coagulação do sangue. No que tange à farmacocinética das substâncias presentes no Ginkgo, demonstrou-se que ratos que receberam repetidamente altas doses de extrato de Ginkgo apresentaram alteração na expressão de diversas enzimas do citocromo p450, como CYP2B e CYP3A e em menor quantidade nas CYP1A, CYP2E1 e 2C9 (SHINOZUKA et al., 2002; UMEGAKI et al., 2002). Em humanos têm-se relatado que vários componentes do Ginkgo podem ser potentes inibidores da CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4 (ZOU; HARKEY; HENDERSON, 2002). Desta forma, o consumo desta planta pode afetar a biotransformação de quimioterápicos que sejam biotransformados por algumas destas enzimas do citocromo p450 acima descritas.

11.5.2 Castanha da Índia (*Aesculus hippocastanum*)

Esta planta é a segunda com maior número de registros junto a ANVISA para produção de fitoterápicos. É parte de fitoterápicos e suplementos que servem para o tratamento de insuficiência venosa crônica, hemorróidas e edema pós-cirúrgico. A Aescina, o principal princípio ativo desta planta, é reconhecida como responsável por estes efeitos (SIRTORI, 2001). Ao nosso conhecimento nenhum estudo existe que indique possíveis interações medicamentosas tanto de extratos de *A. hippocastanum* quanto do princípio ativo aescina.

11.5.3 Ginseng (*Panax ginseng*)

Nos Estados Unidos, o Ginseng e seus produtos derivados, ficaram atrás apenas da *Echinacea purpurea* no consumo de fitoterápicos (TASCILAR et al., 2006). Já no Brasil, esta planta aparece em terceiro no “ranking” das que mais têm registros como fitoterápicos junto a ANVISA. Vale a pena salientar que diversos outros “Ginsengs” são vendidos comercialmente, não sendo estas plantas sequer da mesma família (*Panax sp.*), como o Ginseng Brasileiro (*Pfaffia glomerata* e *P. paniculata*) e o Ginseng Siberiano (*Eleutherococcus senticosus*). Os usos do Ginseng são diversos, onde seus efeitos como agente adaptogênico, afrodisíaco, estimulante e no tratamento da Diabetes do tipo II são os mais conhecidos. Por estes e outros motivos o Ginseng tem a reputação de ser a “Erva da Vida Eterna” (BUTERWECK; DERENDORF, 2006). Diversas substâncias já foram isoladas desta planta, sendo que os ginsenosídeos são aclamados como os princípios ativos de *P. ginseng*. No que concerne às interações medicamentosas com quimioterápicos é interessante notar que em humanos os ginsenosídeos Rh1 e F1 exibiram inibição competitiva pela enzima CYP3A4, enquanto apenas uma leve inibição foi verificada nas CYP2E1 e CYP2D6 (LIU, Y. et al., 2006a; ETHERIDGE et al., 2007). Por outro lado, demonstrou-se que os metabólitos dos ginsenosídeos formados no trato gastrointestinal são os principais responsáveis por alterar a expressão destas enzimas do citocromo p450 (LIU, Y. et al., 2006b). Além dos efeitos sobre as enzimas de biotransformação, demonstrou-se que o ginsenosídeo Rg3 foi capaz de

diminuir o efluxo de doxorubicina (DOX) aumentando os efeitos deste quimioterápico em células resistentes a DOX (KIM, N. D. et al., 2003). Os autores creditaram este efeito ao fato de que este ginsenosídeo competiria pela mesma P-glicoproteína responsável pela eliminação da DOX. Mesmo apresentando este efeito interessante é importante salientar que neste trabalho ficou caracterizado que uma substância presente no Ginseng tem a capacidade de alterar a eliminação de drogas pela célula. Talvez para outros quimioterápicos este mecanismo seja de extrema importância do ponto de vista de alterar a farmacocinética da droga em questão.

11.5.4 Boldo (*Peumus boldus*)

Esta é uma planta muito utilizada no Brasil principalmente para males do fígado. Seu princípio ativo é a Boldina, substância reconhecidamente antioxidante (O'BRIEN; CARRASCO-POZO; SPEISKY, 2006), responsável por diversos de seus efeitos. Por outro lado, já foram descritos casos de hepatotoxicidade (PISCAGLIA et al., 2005) e anafilaxia (MONZON et al., 2004) devido à utilização de Boldo. São escassos os trabalhos que avaliaram os efeitos tanto de extratos brutos de Boldo como da Boldina sobre enzimas relacionadas à biotransformação de drogas. O único trabalho encontrado diretamente arrolado com enzimas do citocromo p450 (KRINGSTEIN; CEDERBAUM, 1995), demonstrou que a Boldina não apresentou efeito sobre a CYP2E1. Logo, são necessários mais trabalhos para caracterizar se a Boldina ou outras substâncias presentes no Boldo podem levar a interações medicamentosas com quimioterápicos.

11.5.5 Alcachofra (*Cynara scolymus*)

Extratos de alcachofra são utilizados com o intuito de tratar pacientes com hipercolesteremia e dispepsia (MARAKIS et al., 2002; HOLTMANN et al., 2003), porém seu uso mostrou-se ineficaz para curar a ressaca por consumo excessivo de álcool (PITTLER et al.,

2003). Seus efeitos sobre o colesterol sérico são devido aos flavonóides presentes na planta (GEBHARDT, 2001). Apesar de ter mais de 100 trabalhos publicados referentes à *C. scolymus* na base de dados PUBMED, nenhum deles até a data da confecção deste trabalho era relacionado com alguma enzima pertencente à fase I ou II da biotransformação de drogas. Desta maneira, tornam-se extremamente necessários outros trabalhos que visem à ação da *C. scolymus* nestas proteínas, tendo em vista o estudo da ocorrência de potenciais interações medicamentosas.

11.5.6 Maracujá (*Passiflora incarnata*)

Extratos das folhas de Maracujá são indicados na medicina popular para problemas de ansiedade, insônia, irritação e agitação. Um trabalho onde se avaliou a ação inibitória de diversas frutas sobre a CYP3A, evidenciou que o Maracujá praticamente não tem ação sobre esta enzima (HIDAKA et al., 2004). Não foram encontrados outros artigos que evidenciassem a ação dos componentes do Maracujá sobre enzimas importantes na biotransformação de drogas, portanto é importante ter cautela quando da utilização do Maracujá conjuntamente com quimioterápicos.

11.5.7 Valeriana (*Valeriana officinalis*)

Esta planta é usada no combate à insônia e como um sedativo leve, porém ainda faltam dados conclusivos sobre estes efeitos (STEVINSON; ERNST, 2000). Os principais constituintes são conhecidos como valepotriatos, óleos monoterpênicos e sesquiterpenos (HOUGHTON, 1988), dentre outras substâncias. Alguns trabalhos reportaram que a administração destes valepotriatos prolongam a ação de barbituratos (HOUGHTON, 1988) como, por exemplo, aumentam o tempo de anestesia induzida pelo pentobarbital (HOUGHTON, 1988). Desta maneira e sabendo que a administração de outro barbitúrico, o Fenobarbital, induz a ativação do receptor CAR, é possível que substâncias presentes na

Valeriana também induzam este receptor. Somando-se a estes estudos em camundongos já se relatou um caso de intoxicação do uso concomitante de Valeriana e pentobarbital (HOUGHTON, 1988). Mais recentemente, dois estudos avaliaram a ação de *V. officinalis* sobre algumas enzimas do citocromo p450. No primeiro, em humanos, demonstrou-se que o extrato de Valeriana gerou uma ação inibitória mínima sobre a CYP3A4 e nenhum efeito sobre a CYP2D6 (DONOVAN et al., 2004). Em outro estudo, mais abrangente, diversos extratos comerciais de Valeriana foram avaliados quanto à atividade da CYP3A4 *in vitro*. Demonstrou-se que alguns apresentaram um efeito inibitório, enquanto outros não (LEFEBVRE et al., 2004). Estes estudos conduziram, a dois questionamentos: primeiramente é provável que à administração de extratos de Valeriana pode sim gerar interações medicamentosas com quimioterápicos, já que a grande maioria é biotransformada pela CYP3A4; e em segundo sobre a necessidade da legislação atual sobre a produção de fitoterápicos ser mais abrangente e segura, onde os diferentes extratos comerciais não apresentem tamanha diferença entre si.

11.5.8 Plantas nativas do Brasil

Dentre as plantas nativas citadas na tabela 11.2, não há nenhum trabalho publicado (Fevereiro 2008, base de dados PUBMED) que as avalie como possíveis causas de interações medicamentosas. A grande maioria apresenta poucos trabalhos publicados geralmente sobre suas principais indicações de usos estudadas em modelos animais. A planta nativa utilizada como parte de medicamentos fitoterápicos que apresenta maior número de trabalhos publicados é o Guaraná (*P.cupana*). Tem-se estudado intensamente os efeitos do guaraná sobre modelos de carcinogênese (FUKUMASU et al., 2006b; FUKUMASU et al., 2008), onde se obteve resultados interessantes já que a *P.cupana* retardou o crescimento tumoral em diferentes modelos experimentais estudados até o momento. Ainda, demonstrou-se que o guaraná protege o DNA de fígado de camundongos das lesões induzidas por um carcinógeno químico (FUKUMASU et al., 2006a) e recentemente desvendou-se que este efeito ocorre de duas maneiras: pelo efeito antioxidante do guaraná via aumento da atividade da Superóxido-Dismutase e por modular a expressão de diferentes

enzimas do citocromo p450, como a CYP2E1 e CYP2A5 (capítulo 4). Em um outro experimento em camundongos, demonstrou-se que o guaraná ativa a expressão do receptor CAR, levando a uma indução enzimática das CYP2B10 e CYP3A11 (análoga a CYP3A4 em humanos) e a CYP1A2. Esta ativação do CAR acaba por exacerbar os efeitos do TCPOBOP, o ligante específico do receptor CAR (capítulo 10). Sendo assim, mesmo o guaraná tendo apresentado diversos efeitos interessantes sobre o câncer, é importante salientar que o consumo desta planta pode alterar a biotransformação de quimioterápicos que sejam biotransformados via CAR. Desta maneira, mais estudos estão sendo realizados em nosso laboratório principalmente para caracterizar a ação de extratos de guaraná sobre a biotransformação de quimioterápicos e outras drogas de interesse.

11.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A importância dos fitoterápicos é indiscutível para um país como o nosso, onde a pobreza da população, os conhecimentos da cultura indígena e a rica flora fazem com que o uso de plantas medicinais seja intenso. Num primeiro momento é necessário provar os efeitos de cada uma destas plantas cientificamente, tanto em modelos animais como em cultura de células. Porém, acreditar que simplesmente pelo fato das plantas serem de origem natural são saudáveis e não apresentam riscos à saúde é inocente e muito arriscado. Portanto, um passo importante no estudo dos fitoterápicos é avaliar a possibilidade destes gerarem interações medicamentosas, já que na grande maioria das vezes são utilizados para melhorar os efeitos colaterais da alopatia. A quimioterapia do câncer não é exceção e os efeitos colaterais devido ao uso destas drogas são freqüentes já que a grande maioria apresenta baixo índice terapêutico. Logo, o consumo de algum extrato vegetal, mesmo que em pequenas doses como um agente estimulante, anti-ulcerogênico ou mesmo como adaptogênico, pode levar à importantes interações medicamentosas, que muitas vezes não são notadas pelo oncologista já que não há descrição destas na literatura.

Existem dados sobre interações medicamentosas entre quimioterápicos e o consumo de produtos vegetais em humanos. O estudo mais evidente demonstrou que o consumo da Erva de São João (*Hypericum perforatum*) deve ser evitado por pacientes em quimioterapia com Irinotecan®, uma pró-droga que precisa ser biotransformada para se tornar ativa para matar a célula tumoral (MATHIJSEN et al., 2002). O consumo simultâneo levou a uma menor mielosupressão induzida pelo Irinotecan, além de diminuir os níveis plasmáticos de SN-38 (o componente ativo) em 42%. Estes efeitos foram caracterizados pela ação da Hiperforina, o princípio ativo da Erva de São João, de induzir a expressão da CYP3A4 via ativação do receptor PXR (MANNEL, 2004). Outro trabalho publicado sobre o mesmo assunto demonstrou que o consumo da Erva de São João diminuiu também a ação do Imatinib em pacientes oncológicos (FRYE et al., 2004).

O objetivo deste trabalho é então alertar a população e, principalmente, a classe médica sobre a possibilidade das interações medicamentosas ocorrerem na quimioterapia pelo consumo de fitoterápicos ou outros suplementos vegetais. Diante do demonstrado até agora, se torna evidente que pouquíssimas plantas foram estudadas neste nível de

complexidade, tão importante quanto seus efeitos terapêuticos. Espera-se que com esta mensagem mais estudos sejam realizados sobre a ação destas substâncias, tendo em vista as alterações farmacocinéticas que estas causam. Caracterizando-se estes efeitos de cada fitoterápico utilizado, certamente novas diretrizes serão criadas com o intuito de padronizar ainda mais as formulações dos extratos vegetais presentes nos medicamentos fitoterápicos, tornando assim, cada vez mais, seu uso potencialmente mais seguro.

Capítulo 12**Discussão e conclusões**

12.1 DISCUSSÃO GERAL

Ao chegar neste ponto da tese, após 10 capítulos sobre diversos assuntos, desde experimentos diferentes e a confecção de textos sobre assuntos relevantes relacionados ao estudo do câncer, a pergunta que esperávamos responder seria: realmente o guaraná tem ação quimiopreventiva e terapêutica sobre o câncer? Hoje, após estes 7 anos dedicados (4 durante o doutorado) à caracterização dos efeitos do guaraná não apenas relacionados ao câncer, mas também seus efeitos patofisiológicos, que porventura poderiam ser responsáveis ao menos que parcialmente, pelos seus efeitos sobre o câncer, estão determinados. Assim, acreditamos que este trabalho responde à pergunta inicial. O direcionamento tomado a partir deste trabalho deverá levar em conta, acima de tudo, o objetivo maior de quem estuda o câncer: que menos pessoas e animais morram devido a esta doença. Não menos importante é o fato de que é necessário buscar novas alternativas menos custosas, já que a realidade do nosso país não é a mesma dos países desenvolvidos. Portanto, a pesquisa brasileira deve ser direcionada de modo diferente da realizada em outros países, mesmo que o objetivo final seja o mesmo.

Partindo-se destas idéias iniciais a escolha para vencer o câncer seria a prevenção, desde que esta fosse segura e com baixos custos. Porém, deve-se levar em consideração também que se programas de prevenção ao câncer iniciassem hoje, os resultados seriam notados provavelmente apenas após 1 década ou mais. Logo, os esforços devem ser contínuos também na descoberta de novas terapias antitumorais para melhorar a qualidade de vida e até mesmo curar todos que já sofrem ou virão a sofrer com essa doença nos próximos anos. Dessa maneira, durante a leitura desta tese, é possível verificar que foram caracterizados efeitos do guaraná sobre o desenvolvimento desde lesões pré-neoplásicas a neoplásicas e também sobre lesões já malignas, tanto em animais quanto em cultivos celulares. Conseqüentemente, foram demonstrados os efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos do guaraná, respectivamente.

Acreditar que das plantas encontrar-se-ão novas perspectivas contra o câncer não é mais tão longínquo assim. Desse modo, diversas ervas têm sido estudadas quanto aos seus efeitos sobre o câncer tanto para prevenção como para tratamento (SPORN; SUH, 2002b;

SURH, 2003a). Como exemplo, pode-se citar o chá verde e seus componentes que foram e ainda estão sendo avaliados em cerca de vinte e dois ensaios clínicos relacionados ao câncer em humanos, sendo 8 destes para avaliar seus efeitos quimiopreventivo (NIH, 2008). Outro exemplo bem conhecido é a curcumina, princípio ativo encontrado na planta *Curcuma longa*, que tem sido avaliada em 15 ensaios clínicos sendo 6 destes de quimioprevenção.

Nesse mesmo contexto se insere o guaraná, que apresenta diversos efeitos benéficos nos seres vivos (que estão descritos no capítulo 2) e também efeitos importantes no controle e combate ao câncer, sendo estes últimos frutos da idéia pioneira que surgiu em nosso Laboratório de estudar tais efeitos. Esse estudo iniciou quando a Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli me indicou estudar alguma planta nativa do Brasil que possuísse composição parecida a do chá verde. Assim, no primeiro experimento, sempre sob a orientação da profa. Zaidan Dagli foram avaliados os efeitos quimiopreventivos do guaraná em modelo de hepatocarcinogênese química induzida pela DEN. Após o período experimental observamos que o tratamento com o guaraná reduziu a incidência e a multiplicidade das lesões macroscópicas em fígado. Além disto, foi possível observar um menor número de lesões pré-neoplásicas e uma menor expressão de PCNA, o que condizia com um possível efeito antiproliferativo do guaraná (FUKUMASU et al., 2006b). Certo tempo depois nossos questionamentos recaíram sobre a ação da planta sobre o dano de DNA induzido pelo mesmo carcinógeno no fígado dos animais. Os animais foram tratados com o guaraná por 15 dias e receberam uma dose muito alta da DEN, sendo eutanasiados 4 horas depois para avaliação da possível proteção ao dano de DNA. Demonstramos então que a administração prévia do guaraná protegia os hepatócitos parcialmente da ação genotóxica da DEN (FUKUMASU et al., 2006a) porém naquele momento não era possível explicar qual seria o mecanismo de ação responsável por tal efeito. Partindo-se destes dois trabalhos originais, o projeto de doutorado foi desenvolvido para responder as diversas perguntas que fervilhavam em nossas cabeças: o guaraná teria o mesmo efeito quimiopreventivo em outros modelos? Seria um efeito antiproliferativo? Quais seriam os alvos moleculares do guaraná? Por que o guaraná protegia o DNA do dano genotóxico induzido pela DEN? Seriam alterações na capacidade antioxidante do tecido ou na bioativação do carcinógeno? Muitas destas perguntas foram respondidas nos capítulos prévios desta tese, e como não poderia ser diferente, diversas outras foram surgindo durante estes anos.

A caracterização dos efeitos do guaraná em animais sãos é essencial independente das possíveis futuras aplicações que esta planta ou seus extratos tenham. Desta maneira, nossos esforços se concentraram em primeiramente verificar se o aclamado efeito antioxidante observado em diversos experimentos *in vitro* (MATTEI et al., 1998a; BASILE et al., 2005; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007), ocorreria *in vivo* também. Interessantemente, verificou-se que a administração da planta por 15 dias para camundongos BALB/c gerou uma maior atividade especificamente da Superóxido-dismutase (capítulo 4), uma enzima que converte radicais superóxido (altamente reativos) em radicais peróxido (OH^- , menos reativos) e oxigênio. Esta enzima está presente em praticamente todas as células e é considerada uma importante defesa antioxidante. Claramente significativo na resposta ao estresse oxidativo é a ativação do receptor NRF2 que leva a transcrição gênica principalmente de enzimas de fase II (também conhecidas como enzimas antioxidantes indiretas), como as enzimas do complexo glutatona e a aldeído-desidrogenase 3A1 (COPPLE et al., 2008). Porém ainda não foi possível verificar se as substâncias presentes no guaraná ativam o receptor NRF2.

Ainda sobre os efeitos do guaraná em animais sãos, verificou-se que a expressão gênica de diversas enzimas do complexo citocromo p450 foi alterada no fígado dos animais tratados apenas com o guaraná. Em camundongos BALB/c fêmeas observamos que o guaraná induziu a expressão das enzimas CYP1A2 e CYP3A11, porém não alterou a CYP2B10 (Capítulo 4). Já em camundongos C57Bl/6 fêmeas observou-se um aumento destas duas primeiras enzimas e também da enzima CYP2B10, reconhecidamente um transcrito do receptor nuclear CAR, que por sinal também estava aumentado nesta linhagem (Capítulo 10). A ativação deste receptor pareceu-nos ser dependente da linhagem utilizada de camundongos já que na linhagem BALB/c não foi observada qualquer alteração nos níveis de sua expressão.

O CAR faz parte de uma família de receptores nucleares que tem por função principal induzir ou reprimir a expressão de diversas proteínas relacionadas ao metabolismo de substâncias endógenas, à absorção, à distribuição, à biotransformação e bioativação de xenobióticos e finalmente a excreção dos metabólitos e xenobióticos (MOORE et al., 2000; WEI et al., 2000; WILLSON; KLIEWER, 2002; GUO et al., 2003; KODAMA et al., 2004; MAGLICH et al., 2004; ZHANG, J. et al., 2004). Outros receptores tão importantes quanto o CAR são o PXR, o PPAR, o AhR e o NRF2 (YU; KONG, 2007), tendo funções semelhantes.

Atualmente a função destes receptores sobre a carcinogênese é considerada restrita ao fato de que eles controlam a exposição aos diferentes carcinógenos, alterando sua farmacocinética e conseqüentemente expondo as células ou a uma maior concentração ou a um maior tempo de exposição a substância carcinogênica (XIE et al., 2003). Outro fato relatado em literatura é que o efeito promotor tumoral do fenobarbital é dependente exclusivamente da presença do receptor CAR (YAMAMOTO et al., 2004).

Ainda é pouco conhecido como após a sua ativação, o CAR ou suas diferentes isoformas, seleciona quais genes devem ter sua expressão alterada. Em camundongos se têm descritos duas isoformas principais (mCAR1 e mCAR2) e recentemente uma outra contendo uma inserção de 188bp de íntrons; já em ratos se têm descrito pelo menos 5 outras isoformas oriundas de splicing alternativo (KANNO et al., 2005). Uma hipótese em relação aos genes que são alterados após a ativação do CAR é que alguns de seus transcritos são órgãos-específicos (KANNO et al., 2005), fato este que poderia explicar o aumento da proliferação celular observada no fígado e não no pulmão ou em outros órgãos. Deve-se somar a esta hipótese a possibilidade dos efeitos da ativação do CAR não serem os mesmos em diferentes órgãos, isso devido ao fato que o receptor CAR se dimeriza com RXR para reconhecer os sítios promotores PBREM (módulo elemento-responsivo ao fenobarbital). Como existem pelo menos 3 tipos de RXR (alfa, beta e gama) e 3 ou mais isoformas diferentes do CAR em camundongos, os dímeros formados podem ter certa seletividade por determinada região promotora. Se esta hipótese vier a ser confirmada experimentalmente, é provável que os efeitos de agonistas ou agonistas inversos deste receptor possam servir para modular seus efeitos, principalmente aqueles relacionados com proliferação celular, inibição da apoptose e farmacocinética de agentes quimioterápicos. Desta forma, sua ação se tornaria importante tanto para prevenção quanto para o tratamento do câncer.

Outro fator importante na modulação destes receptores nucleares visando a quimioprevenção do câncer é que, por vezes, alguns fitoquímicos apresentam efeitos bifásicos, ou seja, têm efeito protetor em baixas doses e efeito tóxico em altas doses ou vice-versa. Por exemplo, foi demonstrado em ratos que a administração de indol-3-carbinol, substância isolada de vegetais crucíferos, como a couve-flor, brócolis e a couve-de-bruxelas, claramente reduziu o número de criptas aberrantes e retardou a formação de tumores de mama, porém fortemente induziu focos preneoplásicos no fígado de ratos submetidos ao modelo de carcinogênese de múltiplos órgãos (STONER et al., 2002). Mesmo tendo seus

efeitos sido considerados interessantes em modelos experimentais, uma revisão recente sobre o indol-3-carbinol declarou que as evidências sobre uma correlação inversa entre o consumo de vegetais crucíferos e a incidência de cânceres de mama e próstata em humanos são limitadas e inconsistentes (HIGDON et al., 2007). As implicações destas respostas bifásicas são muitas vezes complexas e difíceis de serem compreendidas (KOHLE; BOCK, 2006) devendo ser consideradas quando da utilização destas substâncias como agentes quimiopreventivos, que por definição não devem apresentar efeitos colaterais ou tóxicos, já que serão administradas por um longo período a pessoas, em princípio, saudáveis.

A ativação de outro receptor nuclear o receptor AhR leva a três funções diferentes: adaptativa (aumento da biotransformação de xenobióticos), tóxica (efeitos adversos gerados por compostos semelhantes a dioxina) e de desenvolvimento (funções fisiológicas existentes mesmo na ausência de ligantes externos) (KOHLE; BOCK, 2006). Porém a ação adaptativa tem sido subjugada principalmente pelos efeitos dos compostos parecidos com a dioxina. Além disso, recentemente foi demonstrado que o receptor nuclear NRF-2 é um dos genes alvo da transcrição gerada pelo receptor AhR (MIAO et al., 2005). Acredita-se que sua importância como alvo do AhR seja para transcrever proteínas importantes contra o estresse oxidativo causado pela ação das enzimas do citocromo p450 (também induzidas pelo AhR), que geram a formação de espécies reativas de oxigênio. Seria possível, também, que o receptor CAR tenha funções parecidas a do NRF-2 ou a do AhR? A função adaptativa do CAR já foi bem demonstrada quando da sua ativação, e sua função biológica foi demonstrada em diversos processos como metabolismo de lipídeos (MOREAU et al., 2008), bilirrubina (XIE et al., 2003), e hormônios (XIE et al., 2003). Também já se demonstrou que o CAR é um gene alvo da transcrição de diversos receptores nucleares como o PXR (MAGLICH et al., 2002), o HNF-4 (PASCUSI et al., 2007), o próprio AhR (PATEL et al., 2007) e o receptor de glicocorticóide (PASCUSI et al., 2003). Desta forma, pode-se supor que os efeitos do guaraná podem ser em outro receptor nuclear que acaba levando a um aumento na expressão do CAR. Futuramente essa dúvida será solucionada a partir do momento que avaliarmos a expressão concomitante dos outros receptores e utilizarmos animais knockout para o próprio CAR e para os outros receptores.

Voltando aos outros efeitos observados neste trabalho, podemos acreditar que o efeito antioxidante e o efeito modulador do receptor CAR e de algumas enzimas do citocromo p450 gerados pela administração do guaraná devem ser em parte responsáveis

pela proteção ao DNA observada após a administração de alta dose do carcinógeno DEN, conforme descrito no capítulo 2. Além disso, estes efeitos podem ter sido importantes também para o retardo no desenvolvimento de tumores de fígado induzidos pela DEN (FUKUMASU et al., 2006b). A hipótese neste caso é que a ativação do receptor CAR após administração de guaraná ocorre em menor nível que o necessário para gerar o efeito promotor tumoral, efeito este observado quando da administração de fenobarbital, tendo assim potencial efeito protetor contra a hepatocarcinogênese em camundongos. Corroborando com esta teoria, demonstrou-se que doses mínimas de fenobarbital apresentaram efeito antitumoral em modelo de hepatocarcinogênese em ratos, reduzindo o número de lesões GST-P positivas e diminuindo a proliferação celular nestas lesões (KINOSHITA et al., 2003). Além disso, já fora demonstrado que o CAR expresso em lesões pré-neoplásicas e adenocarcinomas de fígado é menos ativado pelo fenobarbital do que em hepatócitos normais (NUMAZAWA et al., 2005), existindo desta maneira uma menor ação do CAR em lesões mais malignas. Seria o nível de ativação do CAR uma das barreiras para a progressão da carcinogênese? Mesmo sabendo que as doses de guaraná utilizadas no experimento de hepatocarcinogênese são consideradas altas (de 100 a 2000 mg/kg), não há como prever se os níveis plasmáticos dos fitoquímicos, responsáveis pelo efeito antitumoral, foram mínimos ou elevados para gerar seus efeitos, já que em nosso trabalho não identificamos qual foi a substância ou conjunto de substâncias que foram efetivas. Por outro lado, deve ser levado em conta que a carcinogênese é um processo que se caracteriza pelo acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, onde mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor são importantes. Por conseguinte, o benefício induzido pelo consumo do guaraná e o conseqüente aumento na atividade antioxidante possivelmente seja devido à menor probabilidade de ocorrência de uma nova mutação nas células causada por dano genotóxico gerado por espécies reativas de oxigênio. Desta maneira, pode-se explicar, ao menos em parte, o retardo observado na carcinogênese hepática induzida pela DEN quando da administração do guaraná, pois havia menos lesões e estas foram menores.

Tendo como base os resultados mostrados nesta tese, é possível afirmar que o modo de ação responsável pelo efeito antitumoral do guaraná em camundongos é a menor proliferação celular observada tanto em tumores quanto em lesões pré-neoplásicas. Este efeito foi bem descrito sobre o tumor de Ehrlich (Capítulo 8), o melanoma B16/f10 (Capítulo 7) e também no modelo experimental de carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK,

principal nitrosamina presente no tabaco (Capítulo 5). O consumo de guaraná na ração em pó por 52 semanas levou a um retardo no processo carcinogênico, sendo notado principalmente pelo menor tamanho das lesões e menor grau maligno destas. Porém, não ocorreram quaisquer efeitos do guaraná na mesma dose utilizada em camundongos que não receberam o carcinógeno e nos que o receberam em menor dose e foram tratados por menos tempo (Capítulo 5). Estes nossos resultados corroboram com a teoria de que o modelo experimental influencia a avaliação de componentes da dieta em modelos de quimioprevenção (FENTON; HORD, 2006), sendo, portanto fundamental a escolha de modelo adequado, senão muitas vezes a pesquisa, o tempo e o dinheiro investidos serão mal utilizados.

O último modelo testado apresentou resultados tão interessantes do guaraná, que possibilitou-nos verificar que as lesões pulmonares dos animais tratados com guaraná proliferavam mais devagar, devido ao menor número de células PCNA-positivas. Frente a estes resultados, procuramos por algumas proteínas que tivessem função capital na carcinogênese pulmonar. Dentre estas proteínas, fomos avaliar a ativação do fator de transcrição CREB, recentemente caracterizada na carcinogênese de pulmão, de mama e de pâncreas (SCHULLER, 2007). O CREB ainda foi encontrado constitutivamente ativado em diversas linhagens de tumor de pulmão em humanos (AGGARWAL et al., 2008), alterando a expressão de moléculas que levam a sobrevida e proliferação celular. Logo, agentes que suprimam a ativação do CREB nas células tumorais podem ter um potencial valor terapêutico, principalmente por levar a uma menor proliferação celular e talvez por permitir que as células morram por apoptose. Assim, superando até mesmo nossas expectativas confirmamos que as lesões dos animais tratados com guaraná apresentavam menor número de células com o CREB ativado, fato este que se correlacionou com a menor proliferação destas lesões, além destas apresentarem-se menos malignas (Capítulo 5).

Entretanto seria a fosforilação do CREB na serina-133 um alvo direto do guaraná ou um efeito de alguma outra alteração celular induzida pela administração do guaraná? Primeiramente, este resultado é de fundamental importância por um simples motivo: se tornou possível admitir que os efeitos antitumorais do guaraná neste modelo experimental provavelmente não se devam ao conteúdo de cafeína presente nesta planta. Esta afirmação é possível de ser feita, pois já foi demonstrado que a cafeína estimula a proliferação de células de adenocarcinoma de pulmão por ativação da PKA e conseqüente fosforilação do

CREB (AL-WADEI; TAKAHASHI; SCHULLER, 2006), fatos contrários aos resultados obtidos aqui com o guaraná sobre as lesões pulmonares induzidas pelo NNK. Contudo, as condições impostas pelo modelo de carcinogênese realizado em animais e o seu tempo de duração nos impossibilitou estudar mais a fundo os mecanismos pelos quais o guaraná atuou nas células tumorais. Para transpor esta barreira metodológica, nós realizamos dois extratos de guaraná com diferentes solventes, possibilitando uma melhor separação das substâncias presentes na planta (maiores detalhes no capítulo 8). Seria importante avaliar se os agentes antitumorais do guaraná seriam preservados pela metodologia de extração, pois poderíamos não observar quaisquer resultados sobre as células em cultivo.

O extrato etanólico (ETOHG) apresentou-se mais efetivo, sendo, portanto escolhido para os estudos subseqüentes sobre as células de tumor de pulmão de camundongos. Posteriormente foi caracterizado que este extrato possuía ação citotóxica em altas doses (5 à 10mg/ml), mas também que a exposição a ele causava redução da proliferação celular, já que em determinadas concentrações havia menos células viáveis e o mesmo número de células mortas (entre 0,62 e 1,25 mg/ml). Verificamos também que mesmo em cultivo celular a exposição ao guaraná levou a uma menor expressão protéica do PCNA de maneira dose-dependente, fato este que corroborou com a menor proliferação celular observada nos experimentos em animais. Outro efeito interessante da exposição ao ETOHG foi o aumento da expressão do CAR, que já havia sido demonstrada no fígado dos animais tratados com guaraná, agora observada *in vitro* entre as doses de 0,16 e 1,25 mg/ml nas células de tumor de pulmão, apresentando uma correlação inversa com a proliferação celular. Além disso, verificamos também que a expressão da Cx43 foi diminuída de maneira dose-dependente pelo extrato de guaraná nas células tumorais em cultivo. Os efeitos do CAR e sua possível função no câncer foram comentados alguns parágrafos acima. Porém este efeito do extrato do guaraná sobre a expressão da Cx43 diminuindo-a é inédito tanto do ponto de vista dos efeitos do guaraná como sua correlação com a menor proliferação celular induzida de maneira dose-dependente pelo ETOHG. Talvez haja certa importância da Cx43 no mecanismo de ação responsável pelo efeito antiproliferativo induzido pelo guaraná, já que nesta mesma tese demonstramos o aumento da expressão desta nas fases mais avançadas da carcinogênese pulmonar induzida pelo NNK, levou a sua localização aberrante (Capítulo 6). Corroborando com esta hipótese, foi demonstrado que o aumento na expressão da Cx43 aumentou a proliferação de células em cultivo (LIU, X. et al., 2007). Se

realmente este aumento da Cx43 for um passo importante para o desenvolvimento das lesões tumorais em pulmão e não apenas um efeito ou consequência do maior grau de malignidade, é muito interessante que alguma substância possa reduzir a expressão da Cx43 em células cancerosas, fato este observado em nossos experimentos.

A partir dos resultados mostrados nesta tese, podemos sugerir um possível mecanismo de ação do guaraná sobre as células tumorais, envolvendo as alterações encontradas e alguns passos que não foram analisados nestes trabalhos, mas que já partilham de embasamento científico, demonstrado em diversos trabalhos publicados. Para isto, alguns pontos devem ser discutidos antecipadamente, sendo que é necessário primeiramente destacar que a ativação do PXR, outro receptor nuclear de metabolismo similar ao CAR, leva a uma menor fosforilação da serina-133 do CREB, reprimindo sua atividade transcricional (KODAMA et al., 2007). Como o PXR e o CAR muitas vezes têm suas funções sobrepostas (SMIRLIS et al., 2001; GUO et al., 2003), talvez seja possível que o CAR possa também reprimir a ativação do CREB. Deve-se considerar também a possibilidade de que as substâncias do guaraná, ou ativam ambos os receptores ou ativam apenas o PXR e este, por sua vez, induz a expressão do CAR, efeito este já descrito anteriormente (MAGLICH et al., 2002). Outro fator importante para a hipótese proposta seria demonstrar uma alta expressão da via Wnt1/Beta-catenina nos tumores de pulmão induzidos pelo NNK (ABDEL-AZIZ et al., 2007) e nas células E9 em cultivo. Isto seria importante para poder explicar os elevados níveis de Cx43 nos tumores mais agressivos induzidos pelo NNK, já que a região promotora da Cx43 apresenta sítio para a Wnt1, caracterizando-se como um alvo da sua transcrição gênica ((VAN DER HEYDEN et al., 1998; MELLOY et al., 2005). Como a via Wnt1/Beta-catenina é encontrada super-expressa em diversos tipos de tumores (MOON et al., 2004; REYA; CLEVERS, 2005; SHITASHIGE; HIROHASHI; YAMADA, 2008), seria possível também verificar uma super-expressão de um de seus alvos, por exemplo, a Cx43, fato este já demonstrado em adenocarcinomas de ovário (ZHAI et al., 2002). Além disso, a via Wnt1/Beta-catenina quando expressa em altos níveis leva a um aumento da proliferação e sobrevivência celular já que aumenta a expressão de proteínas importantes como ciclina D1, c-MYC, etc (ABDEL-AZIZ et al., 2007). Também há um relato de que o fator de transcrição CREB controla a expressão da Cx36 durante a embriogênese do sistema nervoso (ARUMUGAM et al., 2005), mas não há relato diretamente sobre a possível relação entre o CREB e a Cx43.

Será plausível existir alguma interconexão entre os receptores nucleares e a via WNT/Beta-catenina? Algumas evidências existem sobre a ação inibitória da ativação de diversos receptores nucleares por seus ligantes sobre a função da via WNT/Beta-catenina (MULHOLLAND et al., 2005), como por exemplo: vitamina D3 (receptor VDR), ácido retinóico trans/cis (receptores RAR e RXR), glicocorticóides (receptor GR) e tiazolidinas (receptores PPAR). Seria então possível que a ativação do CAR, PXR ou AhR levassem também a uma diminuição da Beta-catenina? Em um trabalho onde foram estudadas as alterações imediatas na expressão gênica induzidas pela administração do fenobarbital (que ativa indiretamente o CAR) no fígado dos animais, demonstrou-se que dentre os 127 genes alterados, a Beta-catenina teve sua expressão diminuída (LOCKER et al., 2003), corroborando com os efeitos da ativação dos outros receptores comentados logo acima. Somando-se todas estas informações nós propomos um possível mecanismo de ação induzido pelo guaraná nas células tumorais (Figura 12.1).

Figura 12.1 - Proposta para mecanismo de ação responsável pelo efeito antitumoral do guaraná. Balões vermelhos indicam alterações induzidas pelo guaraná em modelos experimentais. Balões verdes são algumas alterações que o guaraná também induziu em diferentes experimentos. Os quadrados amarelos indicam os efeitos do guaraná nos modelos que levaram aos efeitos quimiopreventivos e antitumorais. Os balões azuis indicam possíveis proteínas alteradas pelo guaraná. As setas tracejadas azuis indicam possíveis ações onde os fitoquímicos presentes no guaraná poderiam atuar. As setas cheias pretas indicam efeito já comprovado em literatura. As setas vermelhas são efeitos comprovados e demonstrados em trabalhos presentes nesta tese. As setas pretas pontilhadas são possíveis alterações baseadas em diferentes experimentos com proteínas semelhantes. Para maiores detalhes consultar o texto

Se este mecanismo de ação for confirmado, abrem-se diversas possibilidades novas no tratamento de cânceres, podendo esta via explicar os efeitos de algumas substâncias naturais e sintéticas reconhecidamente antitumorais, porém ainda sem demonstração científica de seu mecanismo (CHANG; WAXMAN, 2006). Além disso, se tornará possível a utilização de novos ligantes agonistas ou agonistas inversos destes receptores dependendo claro da sua caracterização prévia em determinado tipo tumor. Há tempos se procuram agentes que possam inibir a via WNT/Beta-catenina, porém sem sucesso (TAKAHASHI-YANAGA; SASAGURI, 2007). Talvez a solução esteja mais próxima do que se imagina.

12.2 CONCLUSÕES

- O guaraná apresentou efeito quimiopreventivo e antineoplásico em modelos experimentais em camundongos e em cultivo de célula
- O modo de ação do guaraná é principalmente devido ao retardo da proliferação celular observada nas células tumorais
- O mecanismo de ação do guaraná em células tumorais não foi completamente elucidado, porém há indícios da participação do receptor CAR e da menor ativação do fator de transcrição CREB

REFERÊNCIAS

- ABDEL-AZIZ, H. O.; TAKASAKI, I.; TABUCHI, Y.; NOMOTO, K.; MURAI, Y.; TSUNEYAMA, K.; TAKANO, Y. High-density oligonucleotide microarrays and functional network analysis reveal extended lung carcinogenesis pathway maps and multiple interacting genes in NNK [4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyle)-1-butanone] induced CD1 mouse lung tumor. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 133, n. 2, p. 107-115, 2007.
- ABRAHAM, V.; CHOU, M. L.; GEORGE, P.; POOLER, P.; ZAMAN, A.; SAVANI, R. C.; KOVAL, M. Heterocellular gap junctional communication between alveolar epithelial cells. **American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 280, n. 6, p. L1085-L1093, 2001.
- ADAIR, C. G.; MCELNAY, J. C. Studies on the mechanism of gastrointestinal absorption of melphalan and chlorambucil. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 17, n. 1, p. 95-98, 1986.
- AGGARWAL, S.; KIM, S. W.; RYU, S. H.; CHUNG, W. C.; KOO, J. S. Growth suppression of lung cancer cells by targeting cyclic AMP response element-binding protein. **Cancer Research**, v. 68, n. 4, p. 981-988, 2008.
- AKIBA, S.; KAWAUCHI, T.; OKA, T.; HASHIZUME, T.; SATO, T. Inhibitory effect of the leaf extract of Ginkgo biloba L. on oxidative stress-induced platelet aggregation. **Biochemistry & Molecular Biology International**, v. 46, n. 6, p. 1243-1248, 1998.
- AL-WADEI, H. A.; TAKAHASHI, T.; SCHULLER, H. M. Caffeine stimulates the proliferation of human lung adenocarcinoma cells and small airway epithelial cells via activation of PKA, CREB and ERK1/2. **Oncology Reports**, v. 15, n. 2, p. 431-435, 2006.
- ALBERG, A. J.; BROCK, M. V.; SAMET, J. M. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 14, p. 3175-3185, 2005.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANDERSEN, T.; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. **J Hum Nutr Diet**, v. 14, n. 3, p. 243-250, 2001.
- ANTUNES, E.; GORDO, W. M.; DE OLIVEIRA, J. F.; TEIXEIRA, C. E.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by the herbal medicine Catuama and its constituents. **Phytother Res**, v. 15, n. 5, p. 416-421, 2001.

ANVISA. A realidade e o futuro do controle de qualidade de alimentos e fitoterápicos. 2007. Disponível em: < www.anvisa.gov.br >. Acesso em: 10 Jun 2008.

ARMITAGE, P.; DOLL, R. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. **Br J Cancer**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 1954.

ARUMUGAM, H.; LIU, X.; COLOMBO, P. J.; CORRIVEAU, R. A.; BELOUSOV, A. B. NMDA receptors regulate developmental gap junction uncoupling via CREB signaling. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 12, p. 1720-1726, 2005.

AVANZO, J. L.; MENNECIER, G.; MESNIL, M.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; FUKUMASU, H.; DA SILVA, T. C.; RAO, K. V.; DAGLI, M. L. Deletion of a single allele of Cx43 is associated with a reduction in the gap junctional intercellular communication and increased cell proliferation of mouse lung pneumocytes type II. **Cell Proliferation**, v. 40, n. 3, p. 411-421, 2007.

AVANZO, J. L.; MESNIL, M.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; DA SILVA, T. C.; FUKUMASU, H.; MORI, C. M.; YAMASAKI, H.; DAGLI, M. L. Altered expression of connexins in urethane-induced mouse lung adenomas. **Life Sciences**, v. 79, n. 23, p. 2202-2208, 2006.

AVANZO, J. L.; MESNIL, M.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; MACKOWIAK, II; MORI, C. M.; DA SILVA, T. C.; OLORIS, S. C.; GARATE, A. P.; MASSIRONI, S. M.; YAMASAKI, H.; DAGLI, M. L. Increased susceptibility to urethane-induced lung tumors in mice with decreased expression of connexin43. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 10, p. 1973-1982, 2004.

AYALOGU, E. O.; SNELLING, J.; LEWIS, D. F.; TALWAR, S.; CLIFFORD, M. N.; IOANNIDES, C. Induction of hepatic CYP1A2 by the oral administration of caffeine to rats: lack of association with the Ah locus. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1272, n. 2, p. 89-94, 1995.

BACCHI, C. E.; GOWN, A. M. Detection of cell proliferation in tissue sections. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 26, n. 7, p. 677-687, 1993.

BAES, M.; GULICK, T.; CHOI, H. S.; MARTINOLI, M. G.; SIMHA, D.; MOORE, D. D. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. **Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 3, p. 1544-1552, 1994.

BAILEY, D. G.; DRESSER, G. K.; LEAKE, B. F.; KIM, R. B. Naringin is a major and selective clinical inhibitor of organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) in grapefruit juice. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 81, n. 4, p. 495-502, 2007.

BARRETT, B.; KIEFER, D.; RABAGO, D. Assessing the risks and benefits of herbal medicine: an overview of scientific evidence. **Altern Ther Health Med**, v. 5, n. 4, p. 40-49, 1999.

BARTEL, F.; PINKERT, D.; FIEDLER, W.; KAPPLER, M.; WURL, P.; SCHMIDT, H.; TAUBERT, H. Expression of alternatively and aberrantly spliced transcripts of the MDM2 mRNA is not tumor-specific. **International Journal of Oncology**, v. 24, n. 1, p. 143-151, 2004.

BASILE, A.; FERRARA, L.; DEL PEZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 32-36, 2005.

BASKIN-BEY, E. S.; HUANG, W.; ISHIMURA, N.; ISOMOTO, H.; BRONK, S. F.; BRALEY, K.; CRAIG, R. W.; MOORE, D. D.; GORES, G. J. Constitutive androstane receptor (CAR) ligand, TCPOBOP, attenuates Fas-induced murine liver injury by altering Bcl-2 proteins. **Hepatology**, v. 44, n. 1, p. 252-262, 2006.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.

BEERS, R. F., JR.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, n. 1, p. 133-140, 1952.

BEIER, F.; LEE, R. J.; TAYLOR, A. C.; PESTELL, R. G.; LUVALLE, P. Identification of the cyclin D1 gene as a target of activating transcription factor 2 in chondrocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 4, p. 1433-1438, 1999.

BENT, S.; KO, R. Commonly used herbal medicines in the United States: a review. **American Journal of Medicine**, v. 116, n. 7, p. 478-485, 2004.

BERENBLUM, I.; SHUBIK, P. An experimental study of the initiating state of carcinogenesis, and a re-examination of the somatic cell mutation theory of cancer. **British Journal of Cancer**, v. 3, n. 1, p. 109-118, 1949.

BERGOFFEN, J.; SCHERER, S. S.; WANG, S.; SCOTT, M. O.; BONE, L. J.; PAUL, D. L.; CHEN, K.; LENSCH, M. W.; CHANCE, P. F.; FISCHBECK, K. H. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. **Science**, v. 262, n. 5142, p. 2039-2042, 1993.

BOCK, K. W.; KOHLE, C. Coordinate regulation of drug metabolism by xenobiotic nuclear receptors: UGTs acting together with CYPs and glucuronide transporters. **Drug Metabolism Reviews**, v. 36, n. 3-4, p. 595-615, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n., p. 248-254, 1976.

BUTERWECK, V.; DERENDORF, H. Pharmacokinetics of Botanical Products. In: LAM, F. Y.; HUANG, S. M.; HALL, S. D. (Ed.). **Herbal Supplements-Drug Interactions**. New York: Taylor & Francis, v. 162, 2006. p.205-244.

BYDLOWSKI, S. P.; DAMICO, E. A.; CHAMONE, D. A. F. An Aqueous Extract of Guarana (Paullinia-Cupana) Decreases Platelet Thromboxane Synthesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 4, p. 421-424, 1991.

BYDLOWSKI, S. P.; YUNKER, R. L.; SUBBIAH, M. T. R. A Novel Property of an Aqueous Guarana Extract (Paullinia-Cupana) - Inhibition of Platelet-Aggregation Invitro and Invivo. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, n. 3, p. 535-538, 1988.

CADIGAN, K. M. Wnt/beta-catenin signaling: turning the switch. **Developmental Cell**, v. 14, n. 3, p. 322-323, 2008.

CADIGAN, K. M.; NUSSE, R. Wnt signaling: a common theme in animal development. **Genes & Development**, v. 11, n. 24, p. 3286-3305, 1997.

CAMARGO, M. C. R.; TFOUNI, S. A. V.; VITORINO, S. H. P.; MENEGÁRIO, T. F.; TOLEDO, M. C. D. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) in guaraná powder (Paullinia cupana) | [Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) em guaraná em pó (Paullinia cupana)]. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 4, 2006.

CAMPOS, A. R.; BARROS, A. I. S.; ALBUQUERQUE, F. A. A.; LEAL, L. K. A. M.; RAO, V. S. N. Acute effects of guarana (Paullinia cupana Mart.) on mouse behaviour in forced swimming and open field tests. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 5, p. 441-443, 2005.

CAMPOS, A. R.; BARROS, A. I. S.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Guarana (Paullinia cupana Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 10, p. 1199-1202, 2003.

CAMUS, A. M.; GENESTE, O.; HONKAKOSKI, P.; BEREZIAT, J. C.; HENDERSON, C. J.; WOLF, C. R.; BARTSCH, H.; LANG, M. A. High variability of nitrosamine metabolism among individuals: role of cytochromes P450 2A6 and 2E1 in the dealkylation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in mice and humans. **Molecular Carcinogenesis**, v. 7, n. 4, p. 268-275, 1993.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione-Reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, n., p. 484-490, 1985.

CARLINI, E. A. Efeito adaptógeno ou resistógeno de algumas plantas. In: BUCHILLET, D. (Ed.). **Medicinas tradicionais e medicina ocidental na Amazônia**. Belém: Edições Cejup,, v., 1991. p.45-59.

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, n. 3, p. 501-512, 2003.

CESEN-CUMMINGS, K.; FERNSTROM, M. J.; MALKINSON, A. M.; RUCH, R. J. Frequent reduction of gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in human and mouse lung carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 1, p. 61-67, 1998.

CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G., JR. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 65-72, 2005.

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 8, p. 563-572, 2002.

CHANDLER, D. S.; SINGH, R. K.; CALDWELL, L. C.; BITLER, J. L.; LOZANO, G. Genotoxic stress induces coordinately regulated alternative splicing of the p53 modulators MDM2 and MDM4. **Cancer Research**, v. 66, n. 19, p. 9502-9508, 2006.

CHANG, T. K.; WAXMAN, D. J. Synthetic drugs and natural products as modulators of constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR). **Drug Metabolism Reviews**, v. 38, n. 1-2, p. 51-73, 2006.

CHEN, L.; BONDOC, F. Y.; LEE, M. J.; HUSSIN, A. H.; THOMAS, P. E.; YANG, C. S. Caffeine induces cytochrome P4501A2: induction of CYP1A2 by tea in rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 24, n. 5, p. 529-533, 1996.

CLARK, D. J.; BALDWIN, R. L.; BAYNE, K. A.; BROWN, M. J.; GEBHART, G. F.; GONDER, J. C.; GWATHMEY, J. K.; KEELING, M. E.; KOHN, D. F.; ROBB, J. W.; SMITH, O. A.; STEGGERDA, J. D.; VANDERBERGH, J. G.; WHITE, W. J.; WILLIAMS-BLANGERO, S.; VANDEBERG, J. L. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals** ed. Washington, D.C. : National Academy Press 1996

CONKRIGHT, M. D.; MONTMINY, M. CREB: the unindicted cancer co-conspirator. **Trends in Cell Biology**, v. 15, n. 9, p. 457-459, 2005.

COPPLE, I. M.; GOLDRING, C. E.; KITTINGHAM, N. R.; PARK, B. K. The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. **Toxicology**, v. 246, n. 1, p. 24-33, 2008.

COSTA, R. H.; KALINICHENKO, V. V.; TAN, Y.; WANG, I. C. The CAR nuclear receptor and hepatocyte proliferation. **Hepatology**, v. 42, n. 5, p. 1004-1008, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; YANG, S. S. Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience. **The Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 488-498, 2006.

DAGLI, M. L.; YAMASAKI, H.; KRUTOVSKIKH, V.; OMORI, Y. Delayed liver regeneration and increased susceptibility to chemical hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing a dominant-negative mutant of connexin32 only in the liver. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 4, p. 483-492, 2004.

DE KOK, J. B.; ROELOFS, R. W.; GIESENDORF, B. A.; PENNING, J. L.; WAAS, E. T.; FEUTH, T.; SWINKELS, D. W.; SPAN, P. N. Normalization of gene expression measurements in tumor

tissues: comparison of 13 endogenous control genes. **Laboratory Investigations**, v. 85, n. 1, p. 154-159, 2005.

DONOVAN, J. L.; DEVANE, C. L.; CHAVIN, K. D.; WANG, J. S.; GIBSON, B. B.; GEFROH, H. A.; MARKOWITZ, J. S. Multiple night-time doses of valerian (*Valeriana officinalis*) had minimal effects on CYP3A4 activity and no effect on CYP2D6 activity in healthy volunteers. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 12, p. 1333-1336, 2004.

DRAGNEV, K. H.; FREEMANTLE, S. J.; SPINELLA, M. J.; DMITROVSKY, E. Cyclin proteolysis as a retinoid cancer prevention mechanism. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 952, n., p. 13-22, 2001.

DUBEY, A. K.; SHANKAR, P. R.; UPADHYAYA, D.; DESHPANDE, V. Y. Ginkgo biloba--an appraisal. **Kathmandu University Medical Journal**, v. 2, n. 3, p. 225-229, 2004.

DULLOO, A. G.; MILLER, D. S. The thermogenic properties of ephedrine/methylxanthine mixtures: human studies. **Int J Obes**, v. 10, n. 6, p. 467-481, 1986.

DULLOO, A. G.; MILLER, D. S. Reversal of Obesity in the Genetically-Obese Fa/Fa Zucker Rat with an Ephedrine Methylxanthines Thermogenic Mixture. **Journal of Nutrition**, v. 117, n. 2, p. 383-389, 1987.

EDWARDS, D. J.; BELLEVUE, F. H., 3RD; WOSTER, P. M. Identification of 6',7'-dihydroxybergamottin, a cytochrome P450 inhibitor, in grapefruit juice. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 24, n. 12, p. 1287-1290, 1996.

ELLIOTT, R. L.; BLOBE, G. C. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 9, p. 2078-2093, 2005.

EROWID. Erowid Caffeine Vault. 2007. Disponível em: <
http://www.erowid.org/chemicals/caffeine/caffeine_info1.shtml#2>. Acesso em: 13 Jun 2008.

ESPINOLA, E. B.; DIAS, R. F.; MATTEI, R.; CARLINI, E. A. Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart) in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n. 3, p. 223-229, 1997.

ETHERIDGE, A. S.; BLACK, S. R.; PATEL, P. R.; SO, J.; MATHEWS, J. M. An in vitro evaluation of cytochrome P450 inhibition and P-glycoprotein interaction with goldenseal, Ginkgo biloba, grape seed, milk thistle, and ginseng extracts and their constituents. **Planta Medica**, v. 73, n. 8, p. 731-741, 2007.

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759-767, 1990.

FENTON, J. I.; HORD, N. G. Stage matters: choosing relevant model systems to address hypotheses in diet and cancer chemoprevention research. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 5, p. 893-902, 2006.

FERO, M. L.; RANDEL, E.; GURLEY, K. E.; ROBERTS, J. M.; KEMP, C. J. The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. **Nature**, v. 396, n. 6707, p. 177-180, 1998.

FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 453-458, 2003.

FISONE, G.; BORGKVIST, A.; USIELLO, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 7-8, p. 857-872, 2004.

FRYE, R. F.; FITZGERALD, S. M.; LAGATTUTA, T. F.; HRUSKA, M. W.; EGORIN, M. J. Effect of St John's wort on imatinib mesylate pharmacokinetics. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 76, n. 4, p. 323-329, 2004.

FUCHIKAMI, H.; SATOH, H.; TSUJIMOTO, M.; OHDO, S.; OHTANI, H.; SAWADA, Y. Effects of herbal extracts on the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, n. 4, p. 577-582, 2006.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; HEIDOR, R.; SILVA, T. C.; ATROCH, A.; MORENO, F. S.; DAGLI, M. L. Protective effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 6, p. 862-867, 2006a.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; NAGAMINE, M. K.; BARBUTO, J. A.; RAO, K. V.; DAGLI, M. L. Z. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guarana, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 4, p. 305-310, 2008.

FUKUMASU, H.; DA SILVA, T. C.; AVANZO, J. L.; DE LIMA, C. E.; MACKOWIAK, I. I.; ATROCH, A.; SPINOSA, H. D.; MORENO, F. S.; DAGLI, M. L. Z. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, the guarana, on mouse hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 233, n. 1, p. 158-164, 2006b.

FUKUMASU, H.; LATORRE, A. O.; SILVA, T. C.; RAO, K. V.; DAGLI, M. L. Guarana (*Paullinia Cupana*) Shows Hepatotoxicity in BALB/c but not in C57Bl/6 Mice: Effects on Liver Weight, Serum Alanine-Aminotransferase, and Cholesterol. In: 26th Annual Symposium of the Society of Toxicologic Pathology, 2007, Puerto Rico. **[Proceedings.]**: Sage Publications. 164 p.

GALDUROZ, J. C.; CARLINI, E. A. The effects of long-term administration of guarana on the cognition of normal, elderly volunteers. **Sao Paulo Med J**, v. 114, n. 1, p. 1073-1078, 1996.

GALE, G. R.; ATKINS, L. M.; SMITH, A. B.; WALKER, E. M., JR. Effects of caffeine on acetaminophen-induced hepatotoxicity and cadmium redistribution in mice. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v. 51, n. 3, p. 337-350, 1986.

GEBHARDT, R. Anticholestatic activity of flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) and of their metabolites. **Medical Science Monitor**, v. 7 Suppl 1, n., p. 316-320, 2001.

GOASDUFF, T.; DREANO, Y.; GUILLOIS, B.; MENEZ, J. F.; BERTHOU, F. Induction of liver and kidney CYP1A1/1A2 by caffeine in rat. **Biochemical Pharmacology**, v. 52, n. 12, p. 1915-1919, 1996.

GONCALVES, J. F. D. C.; ULYSSES, M. D. S.; DA SILVA, J. F.; DE ARRUDA, M. R.; BONATES, L. C. D.; FERNANDES, A. V. Physiological and anatomical characteristics of leaves of two clones of guarana. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 393-398, 2006.

GUENGERICH, F. P. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. **The Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, n., p. 1-17, 1999.

GULCIN, I.; KUFREVIOGLU, O. I.; OKTAY, M.; BUYUKOKUROGLU, M. E. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 2-3, p. 205-215, 2004.

GUO, G. L.; LAMBERT, G.; NEGISHI, M.; WARD, J. M.; BREWER, H. B., JR.; KIEWER, S. A.; GONZALEZ, F. J.; SINAI, C. J. Complementary roles of farnesoid X receptor, pregnane X receptor, and constitutive androstane receptor in protection against bile acid toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 46, p. 45062-45071, 2003.

GUO, G. L.; MOFFIT, J. S.; NICOL, C. J.; WARD, J. M.; ALEKSUNES, L. A.; SLITT, A. L.; KIEWER, S. A.; MANAUTOU, J. E.; GONZALEZ, F. J. Enhanced acetaminophen toxicity by activation of the pregnane X receptor. **Toxicological Sciences**, v. 82, n. 2, p. 374-380, 2004.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Mol Aspects Med**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HARTVEIT, F. The immediate cause of death in mice with Ehrlich's ascites carcinoma. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, v. 65, n. 3, p. 359-365, 1965.

HASKELL, C. F.; KENNEDY, D. O.; WESNES, K. A.; MILNE, A. L.; SCHOLEY, A. B. A double-blind, placebo-controlled, multi-dose evaluation of the acute behavioural effects of guarana in humans. **Journal of Psychopharmacology**, v. 21, n. 1, p. 65-70, 2007.

HEALTH, U. S. National Center for Health Statistics. CONGRESS, L. O. 2007.

HECHT, S. S. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, n. 6, p. 559-603, 1998.

HECHT, S. S.; MORSE, M. A.; AMIN, S.; STONER, G. D.; JORDAN, K. G.; CHOI, C. I.; CHUNG, F. L. Rapid single-dose model for lung tumor induction in A/J mice by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and the effect of diet. **Carcinogenesis**, v. 10, n. 10, p. 1901-1904, 1989.

HENMAN, A. R. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central Amazon basin. **J Ethnopharmacol**, v. 6, n. 3, p. 311-338, 1982a.

HENMAN, A. R. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central Amazon basin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 311-338, 1982b.

HENMAN, A. R. **Vida natural - O guaraná: sua cultura, propriedades, formas de preparação e uso**. ed. São Paulo, Brazil: Global/Ground, 1986

HENNEMANN, H.; SUCHYNA, T.; LICHTENBERG-FRATE, H.; JUNGBLUTH, S.; DAHL, E.; SCHWARZ, J.; NICHOLSON, B. J.; WILLECKE, K. Molecular cloning and functional expression of mouse connexin40, a second gap junction gene preferentially expressed in lung. **The Journal of Cell Biology**, v. 117, n. 6, p. 1299-1310, 1992.

HIDAKA, M.; FUJITA, K.; OGIKUBO, T.; YAMASAKI, K.; IWAKIRI, T.; OKUMURA, M.; KODAMA, H.; ARIMORI, K. Potent inhibition by star fruit of human cytochrome P450 3A (CYP3A) activity. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 6, p. 581-583, 2004.

HIGDON, J. V.; DELAGE, B.; WILLIAMS, D. E.; DASHWOOD, R. H. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 3, p. 224-236, 2007.

HOFFMANN, D.; ADAMS, J. D.; BRUNNEMANN, K. D.; RIVENSON, A.; HECHT, S. S. Tobacco specific N-nitrosamines: occurrence and bioassays. **IARC Scientific Publications**, v., n. 41, p. 309-318, 1982.

HOFFMANN, D.; HECHT, S. S. Nicotine-derived N-nitrosamines and tobacco-related cancer: current status and future directions. **Cancer Research**, v. 45, n. 3, p. 935-944, 1985.

HOFFMANN, D.; HOFFMANN, I.; EL-BAYOUMY, K. The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, n. 7, p. 767-790, 2001.

HOFFMANN, D.; LAVOIE, E. J.; HECHT, S. S. Nicotine: a precursor for carcinogens. **Cancer Letters**, v. 26, n. 1, p. 67-75, 1985.

HOLTMANN, G.; ADAM, B.; HAAG, S.; COLLET, W.; GRUNEWALD, E.; WINDECK, T. Efficacy of artichoke leaf extract in the treatment of patients with functional dyspepsia: a six-week placebo-controlled, double-blind, multicentre trial. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 18, n. 11-12, p. 1099-1105, 2003.

HONG, W. K.; SPITZ, M. R.; LIPPMAN, S. M. Cancer chemoprevention in the 21st century: Genetics, risk modeling, and molecular targets. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 21, p. 9S-18S, 2000.

HONKAKOSKI, P.; ZELKO, I.; SUEYOSHI, T.; NEGISHI, M. The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 10, p. 5652-5658, 1998.

HOUGHTON, P. J. The biological activity of Valerian and related plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 121-142, 1988.

INCA, I. N. D. C., Ed. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer**. Rio de Janeiro, p.92ed. 2003.

INCA, I. N. D. C. Estimativa 2006: Incidência de Câncer no Brasil 2005.

ITO, A.; WATABE, K.; KOMA, Y.; KITAMURA, Y. An attempt to isolate genes responsible for spontaneous and experimental metastasis in the mouse model. **Histology and Histopathology**, v. 17, n. 3, p. 951-959, 2002.

JAW, S.; JEFFERY, E. H. Interaction of caffeine with acetaminophen. 1. Correlation of the effect of caffeine on acetaminophen hepatotoxicity and acetaminophen bioactivation following treatment of mice with various cytochrome P450 inducing agents. **Biochemical Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 493-501, 1993.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; MURRAY, T.; THUN, M. J. Cancer statistics, 2008. **CA: a Cancer Journal for Clinician**, v. 58, n. 2, p. 71-96, 2008.

JIA, W.; GAO, W.; TANG, L. Antidiabetic herbal drugs officially approved in China. **Phytother Res**, v. 17, n. 10, p. 1127-1134, 2003.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet**, v. 3, n. 6, p. 415-428, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

KAMANGAR, F.; DORES, G. M.; ANDERSON, W. F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 14, p. 2137-2150, 2006.

KANDASWAMI, C.; LEE, L. T.; LEE, P. P.; HWANG, J. J.; KE, F. C.; HUANG, Y. T.; LEE, M. T. The antitumor activities of flavonoids. **In Vivo**, v. 19, n. 5, p. 895-909, 2005.

KANNO, Y.; AOKI, S.; MOCHIZUKI, M.; MORI, E.; NAKAHAMA, T.; INOUE, Y. Expression of constitutive androstane receptor splice variants in rat liver and lung and their functional properties. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 11, p. 2058-2062, 2005.

KASPER, M.; TRAUB, O.; REIMANN, T.; BJERMER, L.; GROSSMANN, H.; MULLER, M.; WENZEL, K. W. Upregulation of gap junction protein connexin43 in alveolar epithelial cells of rats with radiation-induced pulmonary fibrosis. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 106, n. 4, p. 419-424, 1996.

KENNEDY, D. O.; HASKELL, C. F.; WESNES, K. A.; SCHOLEY, A. B. Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with *Panax ginseng*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 79, n. 3, p. 401-411, 2004.

KENNEDY, D. O.; KOJIMA, A.; MOFFATT, J.; YAMAGIWA, H.; YANO, Y.; HASUMA, T.; OTANI, S.; MATSUI-YUASA, I. Cellular thiol status-dependent inhibition of tumor cell growth via modulation of retinoblastoma protein phosphorylation by (-)-epigallocatechin. **Cancer Letters**, v. 179, n. 1, p. 25-32, 2002.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KIM, N. D.; KIM, E. M.; KANG, K. W.; CHO, M. K.; CHOI, S. Y.; KIM, S. G. Ginsenoside Rg3 inhibits phenylephrine-induced vascular contraction through induction of nitric oxide synthase. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, n. 4, p. 661-670, 2003.

KIM, Y. T.; ZHAO, M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. **Yonsei Medical Journal**, v. 46, n. 5, p. 597-613, 2005.

KIMURA, Y. New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation of the antitumor and antimetastatic actions of various compounds isolated from medicinal plants. **In Vivo**, v. 19, n. 1, p. 37-60, 2005.

KING, T. J.; LAMPE, P. D. The gap junction protein connexin32 is a mouse lung tumor suppressor. **Cancer Research**, v. 64, n. 20, p. 7191-7196, 2004.

KINOSHITA, A.; WANIBUCHI, H.; MORIMURA, K.; WEI, M.; SHEN, J.; IMAOKA, S.; FUNAE, Y.; FUKUSHIMA, S. Phenobarbital at low dose exerts hormesis in rat hepatocarcinogenesis by reducing oxidative DNA damage, altering cell proliferation, apoptosis and gene expression. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 8, p. 1389-1399, 2003.

KLIEWER, S. A.; MOORE, J. T.; WADE, L.; STAUDINGER, J. L.; WATSON, M. A.; JONES, S. A.; MCKEE, D. D.; OLIVER, B. B.; WILLSON, T. M.; ZETTERSTROM, R. H.; PERLMANN, T.; LEHMANN, J. M. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. **Cell**, v. 92, n. 1, p. 73-82, 1998.

KNUDSON, A. G. Two genetic hits (more or less) to cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, n. 2, p. 157-162, 2001.

KODAMA, S.; KOIKE, C.; NEGISHI, M.; YAMAMOTO, Y. Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 18, p. 7931-7940, 2004.

KODAMA, S.; MOORE, R.; YAMAMOTO, Y.; NEGISHI, M. Human nuclear pregnane X receptor cross-talk with CREB to repress cAMP activation of the glucose-6-phosphatase gene. **The Biochemical Journal**, v. 407, n. 3, p. 373-381, 2007.

KOFINK, M.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; GALENSA, R. Enantioseparation of catechin and epicatechin in plant food by chiral capillary electrophoresis. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 3-4, p. 569-577, 2007.

KOHLE, C.; BOCK, K. W. Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 7, p. 795-805, 2006.

KOT, M.; DANIEL, W. A. Effect of cytochrome P450 (CYP) inducers on caffeine metabolism in the rat. **Pharmacology Reports**, v. 59, n. 3, p. 296-305, 2007.

KRINGSTEIN, P.; CEDERBAUM, A. I. Boldine prevents human liver microsomal lipid peroxidation and inactivation of cytochrome P4502E1. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 3, p. 559-563, 1995.

KUDOLO, G. B.; DORSEY, S.; BLODGETT, J. Effect of the ingestion of Ginkgo biloba extract on platelet aggregation and urinary prostanoid excretion in healthy and Type 2 diabetic subjects. **Thrombosis Research**, v. 108, n. 2-3, p. 151-160, 2002.

KUHLMANN, J.; MUCK, W. Clinical-pharmacological strategies to assess drug interaction potential during drug development. **Drug Safety**, v. 24, n. 10, p. 715-725, 2001.

KUMAR, R. S.; SUNDERAM, R. S.; SIVAKUMAR, T.; SIVAKUMAR, P.; SURESHKUMAR, R.; KANAGASABI, R.; VIJAYA, M.; PERUMAL, B. P.; GUPTA, M.; MAZUMDAR, U. K.; KUMAR, M. S.; KUMAR, K. A. Effect of Bauhinia racemosa stem bark on N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 35, n. 1, p. 103-114, 2007.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 7. ed. New York: Elsevier Saunders, 2004

LAAG, E.; MAJIDI, M.; CEKANOVA, M.; MASI, T.; TAKAHASHI, T.; SCHULLER, H. M. NNK activates ERK1/2 and CREB/ATF-1 via beta-1-AR and EGFR signaling in human lung adenocarcinoma and small airway epithelial cells. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 7, p. 1547-1552, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEE, C. H.; ITO, Y.; YANAGIBA, Y.; YAMANOSHITA, O.; KIM, H.; ZHANG, S. Y.; KAMIJIMA, M.; GONZALEZ, F. J.; NAKAJIMA, T. Pyrene-induced CYP1A2 and SULT1A1 may be regulated by CAR and not by AhR. **Toxicology**, v. 238, n. 2-3, p. 147-156, 2007.

LEFEBVRE, T.; FOSTER, B. C.; DROUIN, C. E.; KRANTIS, A.; LIVESEY, J. F.; JORDAN, S. A. In vitro activity of commercial valerian root extracts against human cytochrome P450 3A4. **J Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 2, p. 265-273, 2004.

LELO, A.; BIRKETT, D. J.; ROBSON, R. A.; MINERS, J. O. Comparative pharmacokinetics of caffeine and its primary demethylated metabolites paraxanthine, theobromine and theophylline in man. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 177-182, 1986.

LIMA, W. P.; CARNEVALI, L. C.; EDER, R.; ROSA, L. F. B. P. C.; BACCHI, E. M.; SEELAENDER, M. C. L. Lipid metabolism in trained rats: Effect of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. **Clinical Nutrition**, v. 24, n. 6, p. 1019-1028, 2005.

LIU, W. K.; XU, S. X.; CHE, C. T. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. **Life Sciences**, v. 67, n. 11, p. 1297-1306, 2000.

LIU, X.; LIU, W.; YANG, L.; XIA, B.; LI, J.; ZUO, J.; LI, X. Increased connexin 43 expression improves the migratory and proliferative ability of H9c2 cells by Wnt-3a overexpression. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 6, p. 391-398, 2007.

LIU, Y.; MA, H.; ZHANG, J. W.; DENG, M. C.; YANG, L. Influence of ginsenoside Rh1 and F1 on human cytochrome p450 enzymes. **Planta Medica**, v. 72, n. 2, p. 126-131, 2006a.

LIU, Y.; ZHANG, J. W.; LI, W.; MA, H.; SUN, J.; DENG, M. C.; YANG, L. Ginsenoside metabolites, rather than naturally occurring ginsenosides, lead to inhibition of human cytochrome P450 enzymes. **Toxicological Sciences**, v. 91, n. 2, p. 356-364, 2006b.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOCKE, D. Gap junctions in normal and neoplastic mammary gland. **The Journal of Pathology**, v. 186, n. 4, p. 343-349, 1998.

LOCKER, J.; TIAN, J.; CARVER, R.; CONCAS, D.; COSSU, C.; LEDDA-COLUMBANO, G. M.; COLUMBANO, A. A common set of immediate-early response genes in liver regeneration and hyperplasia. **Hepatology**, v. 38, n. 2, p. 314-325, 2003.

LU, F.; GLADDEN, A. B.; DIEHL, J. A. An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene. **Cancer Research**, v. 63, n. 21, p. 7056-7061, 2003.

MA, Q.; LU, A. Y. CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies. **Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals**, v. 35, n. 7, p. 1009-1016, 2007.

MAGLICH, J. M.; STOLTZ, C. M.; GOODWIN, B.; HAWKINS-BROWN, D.; MOORE, J. T.; KLIEWER, S. A. Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. **Molecular Pharmacology**, v. 62, n. 3, p. 638-646, 2002.

MAGLICH, J. M.; WATSON, J.; MCMILLEN, P. J.; GOODWIN, B.; WILLSON, T. M.; MOORE, J. T. The nuclear receptor CAR is a regulator of thyroid hormone metabolism during caloric restriction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 19, p. 19832-19838, 2004.

MAJHENIC, L.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1258-1268, 2007.

MALKINSON, A. M.; DWYER-NIELD, L. D.; RICE, P. L.; DINSDALE, D. Mouse lung epithelial cell lines--tools for the study of differentiation and the neoplastic phenotype. **Toxicology**, v. 123, n. 1-2, p. 53-100, 1997.

MANNEL, M. Drug interactions with St John's wort : mechanisms and clinical implications. **Drug Safety**, v. 27, n. 11, p. 773-797, 2004.

MARAKIS, G.; WALKER, A. F.; MIDDLETON, R. W.; BOOTH, J. C.; WRIGHT, J.; PIKE, D. J. Artichoke leaf extract reduces mild dyspepsia in an open study. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 694-699, 2002.

MARRIOTT, B. M. Functional foods: an ecologic perspective. **Am J Clin Nutr**, v. 71, n. 6 Suppl, p. 1728S-1734S, 2000.

MATHIJSEN, R. H. J.; VERWEIJ, J.; DE BRUIJN, P.; LOOS, W. J.; SPARREBOOM, A. Effects of St. John's wort on irinotecan metabolism. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 16, p. 1247-1249, 2002.

MATTEI, R.; DIAS, R. F.; ESPINOLA, E. B.; CARLINI, E. A.; BARROS, S. B. Guarana (Paullinia cupana): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidants activity in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 2, p. 111-116, 1998a.

MATTEI, R.; DIAS, R. F.; ESPINOLA, E. B.; CARLINI, E. A.; BARROS, S. B. Guarana (Paullinia cupana): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidants activity in vitro. **J Ethnopharmacol**, v. 60, n. 2, p. 111-116, 1998b.

MAYER, K. D. The pathogenicity of the Ehrlich ascites tumour. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 47, n. 5, p. 537-544, 1966.

MCLACHLAN, E.; SHAO, Q.; LAIRD, D. W. Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. **The Journal of Membrane Biology**, v. 218, n. 1-3, p. 107-121, 2007.

MEIJERMAN, I.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. Herb-drug interactions in oncology: focus on mechanisms of induction. **Oncologist**, v. 11, n. 7, p. 742-752, 2006.

MELLOY, P. G.; KUSNIERCZYK, M. K.; MEYER, R. A.; LO, C. W.; DESMOND, M. E. Overexpression of connexin43 alters the mutant phenotype of midgestational wnt-1 null mice resulting in recovery of the midbrain and cerebellum. **The Anatomical Record Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 283, n. 1, p. 224-238, 2005.

MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 493-500, 2007.

MESNIL, M. Connexins and cancer. **Biology of the Cell**, v. 94, n. 7-8, p. 493-500, 2002.

MESNIL, M. [Gap junctions and cancer: implications and perspectives]. **Medical Sciences (Paris)**, v. 20, n. 2, p. 197-206, 2004.

MESNIL, M.; CRESPI, S.; AVANZO, J. L.; ZAIDAN-DAGLI, M. L. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1719, n. 1-2, p. 125-145, 2005.

MESNIL, M.; KRUTOVSKIKH, V.; OMORI, Y.; YAMASAKI, H. Role of blocked gap junctional intercellular communication in non-genotoxic carcinogenesis. **Toxicology Letters**, v. 82-83, n., p. 701-706, 1995a.

MESNIL, M.; KRUTOVSKIKH, V.; PICCOLI, C.; ELFGANG, C.; TRAUB, O.; WILLECKE, K.; YAMASAKI, H. Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin species specificity. **Cancer Research**, v. 55, n. 3, p. 629-639, 1995b.

MESNIL, M.; PICCOLI, C.; YAMASAKI, H. A tumor suppressor gene, Cx26, also mediates the bystander effect in HeLa cells. **Cancer Research**, v. 57, n. 14, p. 2929-2932, 1997.

MIAO, W.; HU, L.; SCRIVENS, P. J.; BATIST, G. Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 21, p. 20340-20348, 2005.

MOLDOVAN, G. L.; PFANDER, B.; JENTSCH, S. PCNA, the maestro of the replication fork. **Cell**, v. 129, n. 4, p. 665-679, 2007.

MONZON, S.; LEZAUN, A.; SAENZ, D.; MARQUINEZ, Z.; BERNEDO, N.; URIEL, O.; COLAS, C.; DUCE, F. Anaphylaxis to boldo infusion, a herbal remedy. **Allergy**, v. 59, n. 9, p. 1019-1020, 2004.

MOON, R. T.; KOHN, A. D.; DE FERRARI, G. V.; KAYKAS, A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 9, p. 691-701, 2004.

MOORE, L. B.; PARKS, D. J.; JONES, S. A.; BLEDSOE, R. K.; CONSLER, T. G.; STIMMEL, J. B.; GOODWIN, B.; LIDDLE, C.; BLANCHARD, S. G.; WILLSON, T. M.; COLLINS, J. L.; KLIEWER, S. A. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 20, p. 15122-15127, 2000.

MOREAU, A.; VILAREM, M. J.; MAUREL, P.; PASCUSI, J. M. Xenoreceptors CAR and PXR activation and consequences on lipid metabolism, glucose homeostasis, and inflammatory response. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 1, p. 35-41, 2008.

MULHOLLAND, D. J.; DEDHAR, S.; COETZEE, G. A.; NELSON, C. C. Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? **Endocrine Reviews**, v. 26, n. 7, p. 898-915, 2005.

NAIR, V. D.; FOSTER, B. C.; THOR ARNASON, J.; MILLS, E. J.; KANFER, I. In vitro evaluation of human cytochrome P450 and P-glycoprotein-mediated metabolism of some phytochemicals in extracts and formulations of African potato. **Phytomedicine**, v. 14, n. 7-8, p. 498-507, 2007.

NELSON, D. R.; ZELDIN, D. C.; HOFFMAN, S. M.; MALTAIS, L. J.; WAIN, H. M.; NEBERT, D. W. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. **Pharmacogenetics**, v. 14, n. 1, p. 1-18, 2004.

NIH. **Principles of laboratory animal care**. ed. Bethesda, EUA: U. S. National Institutes of Health 1985

NIH. Clinical Trials. U. S. National Institutes of Health 2008. Disponível em: < www.ClinicalTrials.gov >. Acesso em: 5 Jun 2008.

NIKITIN, A. Y.; ALCARAZ, A.; ANVER, M. R.; BRONSON, R. T.; CARDIFF, R. D.; DIXON, D.; FRAIRE, A. E.; GABRIELSON, E. W.; GUNNING, W. T.; HAINES, D. C.; KAUFMAN, M. H.; LINNOILA, R. I.; MARONPOT, R. R.; RABSON, A. S.; REDDICK, R. L.; REHM, S.; ROZENGURT, N.; SCHULLER, H. M.; SHMIDT, E. N.; TRAVIS, W. D.; WARD, J. M.; JACKS, T. Classification of proliferative pulmonary lesions of the mouse: recommendations of the mouse models of human cancers consortium. **Cancer Research**, v. 64, n. 7, p. 2307-2316, 2004.

NUMAZAWA, S.; SHINDO, S.; MARUYAMA, K.; CHIBANA, F.; KAWAHARA, Y.; ASHINO, T.; TANAKA, S.; YOSHIDA, T. Impaired nuclear translocation of CAR in hepatic preneoplastic lesions: association with an attenuated CYP2B induction by phenobarbital. **FEBS Letters**, v. 579, n. 17, p. 3560-3564, 2005.

O'BRIEN, P.; CARRASCO-POZO, C.; SPEISKY, H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. **Chemico-biological Interactions**, v. 159, n. 1, p. 1-17, 2006.

OMENN, G. S.; GOODMAN, G.; THORNQUIST, M.; GRIZZLE, J.; ROSENSTOCK, L.; BARNHART, S.; BALMES, J.; CHERNIACK, M. G.; CULLEN, M. R.; GLASS, A.; ET AL. The beta-carotene and retinol efficacy trial (CARET) for chemoprevention of lung cancer in high risk populations: smokers and asbestos-exposed workers. **Cancer Research**, v. 54, n. 7 Suppl, p. 2038s-2043s, 1994.

OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C.; NAGAE, R.; MARTINS, J. V.; SELA, V. R.; DE MELLO, J. C.; AUDI, E. A. Effect of lyophilized extracts from guarana seeds [Paullinia cupana var. sorbilis (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. **Phytother Res**, v. 21, n. 6, p. 531-535, 2007.

PAGLIARUSSI, R. S.; FREITAS, L. A. P.; BASTOS, J. K. A quantitative method for the analysis of xanthine alkaloids in Paullinia cupana (guarana) by capillary column gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 25, n. 5-6, p. 371-374, 2002.

PANOSSIAN, A.; WIKMAN, G.; WAGNER, H. Plant adaptogens III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action. **Phytomedicine**, v. 6, n. 4, p. 287-300, 1999.

PANTEL, K.; BRAKENHOFF, R. H. Dissecting the metastatic cascade. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 6, p. 448-456, 2004.

PASCUSSI, J. M.; BUSSON-LE CONIAT, M.; MAUREL, P.; VILAREM, M. J. Transcriptional analysis of the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (NR1I3) gene promoter: identification of a distal glucocorticoid response element. **Molecular Endocrinology**, v. 17, n. 1, p. 42-55, 2003.

PASCUSSI, J. M.; ROBERT, A.; MOREAU, A.; RAMOS, J.; BIOULAC-SAGE, P.; NAVARRO, F.; BLANC, P.; ASSENAT, E.; MAUREL, P.; VILAREM, M. J. Differential regulation of constitutive androstane receptor expression by hepatocyte nuclear factor4alpha isoforms. **Hepatology**, v. 45, n. 5, p. 1146-1153, 2007.

PATEL, R. D.; HOLLINGSHEAD, B. D.; OMIECINSKI, C. J.; PERDEW, G. H. Aryl-hydrocarbon receptor activation regulates constitutive androstane receptor levels in murine and human liver. **Hepatology**, v. 46, n. 1, p. 209-218, 2007.

PETTY, W. J.; DRAGNEV, K. H.; DMITROVSKY, E. Cyclin D1 as a target for chemoprevention. **Lung Cancer**, v. 41 Suppl 1, n., p. S155-161, 2003.

PISCAGLIA, F.; LEONI, S.; VENTURI, A.; GRAZIELLA, F.; DONATI, G.; BOLONDI, L. Caution in the use of boldo in herbal laxatives: a case of hepatotoxicity. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 40, n. 2, p. 236-239, 2005.

PITTLER, M. H.; ERNST, E. Dietary supplements for body-weight reduction: a systematic review. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 4, p. 529-536, 2004.

PITTLER, M. H.; WHITE, A. R.; STEVINSON, C.; ERNST, E. Effectiveness of artichoke extract in preventing alcohol-induced hangovers: a randomized controlled trial. **Canadian Medical Association Journal**, v. 169, n. 12, p. 1269-1273, 2003.

POIRIER, M. C. Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 8, p. 630-637, 2004a.

POIRIER, M. C. Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 8, p. 630-637, 2004b.

POLAND, A.; MAK, I.; GLOVER, E.; BOATMAN, R. J.; EBETINO, F. H.; KENDE, A. S. 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene, a potent phenobarbital-like inducer of microsomal monooxygenase activity. **Molecular Pharmacology**, v. 18, n. 3, p. 571-580, 1980.

POTTER, M. Percivall Pott's contribution to cancer research (including a reproduction of Pott's original article). **National Cancer Institute Monographs**, v. 10, n., p. 12, 1963.

PREVENTION, C. F. D. C. A. **The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon Genera**. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta GA. 2004.

PUGINE, S. M. P.; BRITO, P. D.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; COSTA, E. J. X.; CURI, R.; DE MELO, M. P. Effect of indole-3-acetic acid administration by gavage and by subcutaneous injection on rat leukocytes. **Cell Biochemistry and Function**, v. 25, n. 6, p. 723-730, 2007.

REAUME, A. G.; DE SOUSA, P. A.; KULKARNI, S.; LANGILLE, B. L.; ZHU, D.; DAVIES, T. C.; JUNEJA, S. C.; KIDDER, G. M.; ROSSANT, J. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. **Science**, v. 267, n. 5205, p. 1831-1834, 1995.

REHM, S.; WARD, J. M.; SASS, B. Tumours of the lungs. In: TURUSOV, V. S.; MOHR, U. (Ed.). **Pathology of tumours in laboratory animals Tumours of the mouse**. Lyon: International Agency for Research on Cance, v. 2, 1994. p.325-355.

REHM, S.; WCISLO, A.; DEERBERG, F. Non-neoplastic lesions of female virgin Han:NMRI mice, incidence and influence of food restriction throughout life span. II: Respiratory tract. **Laboratory Animals**, v. 19, n. 3, p. 224-235, 1985.

REN, P.; RUCH, R. J. Inhibition of gap junctional intercellular communication by barbiturates in long-term primary cultured rat hepatocytes is correlated with liver tumour promoting activity. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 10, p. 2119-2124, 1996.

RENDIC, S.; DI CARLO, F. J. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. **Drug Metabolism Reviews**, v. 29, n. 1-2, p. 413-580, 1997.

REYA, T.; CLEVERS, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 843-850, 2005.

RICHARD, G.; SMITH, L. E.; BAILEY, R. A.; ITIN, P.; HOHL, D.; EPSTEIN, E. H., JR.; DIGIOVANNA, J. J.; COMPTON, J. G.; BALE, S. J. Mutations in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratoderma variabilis. **Nature Genetics**, v. 20, n. 4, p. 366-369, 1998a.

RICHARD, G.; WHITE, T. W.; SMITH, L. E.; BAILEY, R. A.; COMPTON, J. G.; PAUL, D. L.; BALE, S. J. Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma. **Human Genetics**, v. 103, n. 4, p. 393-399, 1998b.

ROSE, B.; MEHTA, P. P.; LOEWENSTEIN, W. R. Gap-junction protein gene suppresses tumorigenicity. **Carcinogenesis**, v. 14, n. 5, p. 1073-1075, 1993.

ROSENFELD, J. M.; VARGAS, R., JR.; XIE, W.; EVANS, R. M. Genetic profiling defines the xenobiotic gene network controlled by the nuclear receptor pregnane X receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 17, n. 7, p. 1268-1282, 2003.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, n., p. 365-386, 2000.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Ed.). **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Totowa NJ: Humana Press, v., 2006. p.365–386.

RUCH, R. J.; CESEN-CUMMINGS, K.; MALKINSON, A. M. Role of gap junctions in lung neoplasia. **Experimental Lung Research**, v. 24, n. 4, p. 523-539, 1998.

RUSCIANO, D.; LORENZONI, P.; BURGER, M. Murine models of liver metastasis. **Invasion Metastasis**, v. 14, n. 1-6, p. 349-361, 1994.

RUXTON, C. H. S.; KIRKWOOD, L.; MCMILLAN, B.; ST JOHN, D.; EVANS, C. E. L. Effectiveness of a herbal supplement (Zotrim (TM)) for weight management. **British Food Journal**, v. 109, n. 6, p. 416-428, 2007.

SAI, K.; KANNO, J.; HASEGAWA, R.; TROSKO, J. E.; INOUE, T. Prevention of the down-regulation of gap junctional intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 9, p. 1671-1676, 2000.

SAINI, S. P.; SONODA, J.; XU, L.; TOMA, D.; UPPAL, H.; MU, Y.; REN, S.; MOORE, D. D.; EVANS, R. M.; XIE, W. A novel constitutive androstane receptor-mediated and CYP3A-independent pathway of bile acid detoxification. **Molecular Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 292-300, 2004.

SAITO-KATSURAGI, M.; ASADA, H.; NIIZEKI, H.; KATOH, F.; MASUZAWA, M.; TSUTSUMI, M.; KUNIYASU, H.; ITO, A.; NOJIMA, H.; MIYAGAWA, S. Role for connexin 26 in metastasis of

human malignant melanoma: communication between melanoma and endothelial cells via connexin 26. **Cancer**, v. 110, n. 5, p. 1162-1172, 2007.

SAKAI, M.; FONSECA, E. S.; OLORIS, S. C.; MATSUZAKI, P.; OTAKE, A. H.; LEITE, K. R.; MASSOCO, C. O.; DAGLI, M. L.; PALERMO-NETO, J. Effects of peripheral-type benzodiazepine receptor ligands on Ehrlich tumor cell proliferation. **European Journal of Pharmacology**, v. 550, n. 1-3, p. 8-14, 2006.

SALDANA, M. D. A.; ZETZL, C.; MOHAMED, R. S.; BRUNNER, G. Extraction of methylxanthines from guarana seeds, mate leaves, and cocoa beans using supercritical carbon dioxide and ethanol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4820-4826, 2002.

SATO, C.; IZUMI, N. Mechanism of increased hepatotoxicity of acetaminophen by the simultaneous administration of caffeine in the rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 248, n. 3, p. 1243-1247, 1989.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 182, n. 3, p. 311-322, 2000.

SCHULLER, H. M. Neurotransmitter receptor-mediated signaling pathways as modulators of carcinogenesis. **Progress in Experimental Tumor Research**, v. 39, n., p. 45-63, 2007.

SCRIPTURE, C. D.; FIGG, W. D. Drug interactions in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 7, p. 546-558, 2006.

SHANKAR, D. B.; SAKAMOTO, K. M. The role of cyclic-AMP binding protein (CREB) in leukemia cell proliferation and acute leukemias. **Leukemia & Lymphoma**, v. 45, n. 2, p. 265-270, 2004.

SHAROM, F. J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. **Pharmacogenomics**, v. 9, n. 1, p. 105-127, 2008.

SHARPE, P. A.; BLANCK, H. M.; WILLIAMS, J. E.; AINSWORTH, B. E.; CONWAY, J. M. Use of complementary weight control and alternative medicine for in the United States. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 13, n. 2, p. 217-222, 2007.

SHERR, C. J. Mammalian G1 cyclins. **Cell**, v. 73, n. 6, p. 1059-1065, 1993.

SHERR, C. J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. **Cancer Research**, v. 60, n. 14, p. 3689-3695, 2000.

SHIELS, A.; MACKAY, D.; IONIDES, A.; BERRY, V.; MOORE, A.; BHATTACHARYA, S. A missense mutation in the human connexin50 gene (GJA8) underlies autosomal dominant "zonular pulverulent" cataract, on chromosome 1q. **American Journal of Human Genetics**, v. 62, n. 3, p. 526-532, 1998.

SHINOZUKA, K.; UMEGAKI, K.; KUBOTA, Y.; TANAKA, N.; MIZUNO, H.; YAMAUCHI, J.; NAKAMURA, K.; KUNITOMO, M. Feeding of Ginkgo biloba extract (GBE) enhances gene expression of hepatic cytochrome P-450 and attenuates the hypotensive effect of nicardipine in rats. **Life Sciences**, v. 70, n. 23, p. 2783-2792, 2002.

SHIOZAWA, T.; SHIOHARA, S.; KANAI, M.; KONISHI, I.; FUJII, S.; NIKAI, T. Expression of the cell cycle regulator p27(Kip1) in normal squamous epithelium, cervical intraepithelial neoplasia, and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Immunohistochemistry and functional aspects of p27(Kip1). **Cancer**, v. 92, n. 12, p. 3005-3011, 2001.

SHITASHIGE, M.; HIROHASHI, S.; YAMADA, T. Wnt signaling inside the nucleus. **Cancer Science**, v. 99, n. 4, p. 631-637, 2008.

SIERPINA, V. S.; WOLLSCHLAEGER, B.; BLUMENTHAL, M. Ginkgo biloba. **American Family Physician**, v. 68, n. 5, p. 923-926, 2003.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SIRTORI, C. R. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 3, p. 183-193, 2001.

SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, H. R.; SIMONIC, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 89, n. 2, p. 191-198, 2005.

SMIRLIS, D.; MUANGMOONCHAI, R.; EDWARDS, M.; PHILLIPS, I. R.; SHEPHARD, E. A. Orphan receptor promiscuity in the induction of cytochromes p450 by xenobiotics. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 16, p. 12822-12826, 2001.

SMITH, G. J.; BENNETT, F. A.; STEELE, J. G.; BENTEL, J. M. Onset of neoplastic phenotype in an epithelial cell strain from adult BALB/c mouse lung alveolus. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 76, n. 1, p. 73-79, 1986.

SMITH, G. J.; LYKKE, A. W. Characterization of a neoplastic epithelial cell strain derived by dexamethasone treatment of cultured normal mouse type 2 pneumocytes. **The Journal of Pathology**, v. 147, n. 3, p. 165-172, 1985.

SMITH, N. F.; BAKER, S. D.; GONZALEZ, F. J.; HARRIS, J. W.; FIGG, W. D.; SPARREBOOM, A. Modulation of erlotinib pharmacokinetics in mice by a novel cytochrome P450 3A4 inhibitor, BAS 100. **British Journal of Cancer**, v. 98, n. 10, p. 1630-1632, 2008.

SNOW. Die Werthbestimmung der Guarana. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 757, 1887.

SPORN, M. B. Combination Chemoprevention of Cancer. **Nature**, v. 287, n. 5778, p. 107-108, 1980.

SPORN, M. B.; DUNLOP, N. M.; NEWTON, D. L.; SMITH, J. M. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). **Federation Proceedings**, v. 35, n. 6, p. 1332-1338, 1976.

SPORN, M. B.; SUH, N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 7, p. 537-543, 2002a.

SPORN, M. B.; SUH, N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 7, p. 537-543, 2002b.

STEVINSON, C.; ERNST, E. Valerian for insomnia: a systematic review of randomized clinical trials. **Sleep Medicine**, v. 1, n. 2, p. 91-99, 2000.

STIEWE, T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 3, p. 165-168, 2007.

STINCHCOMBE, S.; BUCHMANN, A.; BOCK, K. W.; SCHWARZ, M. Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 6, p. 1271-1275, 1995.

STOKER, M. G. Transfer of growth inhibition between normal and virus-transformed cells: autoradiographic studies using marked cells. **Journal of Cell Science**, v. 2, n. 3, p. 293-304, 1967.

STONER, G.; CASTO, B.; RALSTON, S.; ROEBUCK, B.; PEREIRA, C.; BAILEY, G. Development of a multi-organ rat model for evaluating chemopreventive agents: efficacy of indole-3-carbinol. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 2, p. 265-272, 2002.

SURH, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 10, p. 768-780, 2003a.

SURH, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 10, p. 768-780, 2003b.

TAKAHASHI-YANAGA, F.; SASAGURI, T. The Wnt/beta-catenin signaling pathway as a target in drug discovery. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 104, n. 4, p. 293-302, 2007.

TASCILAR, M.; DE JONG, F. A.; VERWEIJ, J.; MATHIJSSEN, R. H. Complementary and alternative medicine during cancer treatment: beyond innocence. **Oncologist**, v. 11, n. 7, p. 732-741, 2006.

TETSU, O.; MCCORMICK, F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. **Nature**, v. 398, n. 6726, p. 422-426, 1999.

TFOUNI, S. A. V.; CAMARGO, M. C. R.; VITORINO, S. H. P.; MENEGARIO, T. F.; TOLEDO, M. C. D. Contribution of guarana powder (*Paullinia cupana*) as a source of caffeine in the diet. **Revista De Nutricao-Brazilian Journal of Nutrition**, v. 20, n. 1, p. 63-68, 2007.

THANGAPAZHAM, R. L.; SINGH, A. K.; SHARMA, A.; WARREN, J.; GADDIPATI, J. P.; MAHESHWARI, R. K. Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Letters**, v. 245, n. 1-2, p. 232-241, 2007.

TOLEDO, F.; WAHL, G. M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 12, p. 909-923, 2006.

TRAUB, O.; ECKERT, R.; LICHTENBERG-FRATE, H.; ELFGANG, C.; BASTIDE, B.; SCHEIDTMANN, K. H.; HULSER, D. F.; WILLECKE, K. Immunochemical and electrophysiological characterization of murine connexin40 and -43 in mouse tissues and transfected human cells. **European Journal of Cell Biology**, v. 64, n. 1, p. 101-112, 1994.

TROSKO, J. E. Gap junctional intercellular communication as a biological "Rosetta stone" in understanding, in a systems biological manner, stem cell behavior, mechanisms of epigenetic toxicology, chemoprevention and chemotherapy. **The Journal of Membrane Biology**, v. 218, n. 1-3, p. 93-100, 2007.

TZAMELI, I.; PISSIOS, P.; SCHUETZ, E. G.; MOORE, D. D. The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 9, p. 2951-2958, 2000.

UDAKA, N.; MIYAGI, Y.; ITO, T. Connexin expression in mouse lung tumor. **Cancer Letters**, v. 246, n. 1-2, p. 224-229, 2007.

UMEGAKI, K.; SAITO, K.; KUBOTA, Y.; SANADA, H.; YAMADA, K.; SHINOZUKA, K. Ginkgo biloba extract markedly induces pentoxifyresorufin O-dealkylase activity in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 90, n. 4, p. 345-351, 2002.

USIA, T.; IWATA, H.; HIRATSUKA, A.; WATABE, T.; KADOTA, S.; TEZUKA, Y. CYP3A4 and CYP2D6 inhibitory activities of Indonesian medicinal plants. **Phytomedicine**, v. 13, n. 1-2, p. 67-73, 2006.

VALLONE, P. M.; BUTLER, J. M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. **Biotechniques**, v. 37, n. 2, p. 226-231, 2004.

VAN DER HEYDEN, M. A.; ROOK, M. B.; HERMANS, M. M.; RIJKSEN, G.; BOONSTRA, J.; DEFIZE, L. H.; DESTREE, O. H. Identification of connexin43 as a functional target for Wnt signalling. **Journal of Cell Science**, v. 111 (Pt 12), n., p. 1741-1749, 1998.

WARN-CRAMER, B. J.; LAU, A. F. Regulation of gap junctions by tyrosine protein kinases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1662, n. 1-2, p. 81-95, 2004.

WARNER, K. E. The role of research in international tobacco control. **American Journal of Public Health**, v. 95, n. 6, p. 976-984, 2005.

WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of cancer. **Cancer Research**, v. 45, n. 1, p. 1-8, 1985.

WEI, P.; ZHANG, J.; EGAN-HAFLEY, M.; LIANG, S.; MOORE, D. D. The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. **Nature**, v. 407, n. 6806, p. 920-923, 2000.

WEISS, R. A. Multistage carcinogenesis. **British Journal of Cancer**, v. 91, n. 12, p. 1981-1982, 2004.

WELCH, D. R. Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 15, n. 3, p. 272-306, 1997.

WHITE, T. W.; DEANS, M. R.; KELSELL, D. P.; PAUL, D. L. Connexin mutations in deafness. **Nature**, v. 394, n. 6694, p. 630-631, 1998.

WILLECKE, K.; EIBERGER, J.; DEGEN, J.; ECKARDT, D.; ROMUALDI, A.; GULDENAGEL, M.; DEUTSCH, U.; SOHL, G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. **Biological Chemistry**, v. 383, n. 5, p. 725-737, 2002.

WILLECKE, K.; TEMME, A.; TEUBNER, B.; OTT, T. Characterization of targeted connexin32-deficient mice: a model for the human Charcot-Marie-Tooth (X-type) inherited disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 883, n., p. 302-309, 1999.

WILLIS, R. A. **The Spread of Tumors in the Human Body**. ed.: London, Butterworth & Co, 1952

WILLSON, T. M.; KLIEWER, S. A. PXR, CAR and drug metabolism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 4, p. 259-266, 2002.

XIA, J. H.; LIU, C. Y.; TANG, B. S.; PAN, Q.; HUANG, L.; DAI, H. P.; ZHANG, B. R.; XIE, W.; HU, D. X.; ZHENG, D.; SHI, X. L.; WANG, D. A.; XIA, K.; YU, K. P.; LIAO, X. D.; FENG, Y.; YANG, Y. F.; XIAO, J. Y.; XIE, D. H.; HUANG, J. Z. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. **Nature Genetics**, v. 20, n. 4, p. 370-373, 1998.

XIE, W.; YEUEH, M. F.; RADOMINSKA-PANDYA, A.; SAINI, S. P.; NEGISHI, Y.; BOTTROFF, B. S.; CABRERA, G. Y.; TUKEY, R. H.; EVANS, R. M. Control of steroid, heme, and carcinogen metabolism by nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 7, p. 4150-4155, 2003.

YALE, S. H.; GLURICH, I. Analysis of the inhibitory potential of Ginkgo biloba, Echinacea purpurea, and Serenoa repens on the metabolic activity of cytochrome P450 3A4, 2D6, and 2C9. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 11, n. 3, p. 433-439, 2005.

YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, L. A.; CANTELI, V. C.; USHIROBIRA, T. M.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; DE MELLO, J. C. Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1950-1963, 2007.

YAMAMOTO, Y.; MOORE, R.; GOLDSWORTHY, T. L.; NEGISHI, M.; MARONPOT, R. R. The orphan nuclear receptor constitutive active/androstane receptor is essential for liver tumor promotion by phenobarbital in mice. **Cancer Research**, v. 64, n. 20, p. 7197-7200, 2004.

YAMASAKI, H.; KRUTOVSKIKH, V.; MESNIL, M.; COLUMBANO, A.; TSUDA, H.; ITO, N. Gap junctional intercellular communication and cell proliferation during rat liver carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 101 Suppl 5, n., p. 191-197, 1993.

YAMASAKI, H.; KRUTOVSKIKH, V.; MESNIL, M.; OMORI, Y. Connexin genes and cell growth control. **Archives of Toxicology Supplement**, v. 18, n., p. 105-114, 1996.

YAMASAKI, H.; KRUTOVSKIKH, V.; MESNIL, M.; TANAKA, T.; ZAIDAN-DAGLI, M. L.; OMORI, Y. Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences**, v. 322, n. 2-3, p. 151-159, 1999a.

YAMASAKI, H.; MESNIL, M.; OMORI, Y.; MIRONOV, N.; KRUTOVSKIKH, V. Intercellular communication and carcinogenesis. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 333, n. 1-2, p. 181-188, 1995.

YAMASAKI, H.; MIRONOV, N. Genomic instability in multistage carcinogenesis. **Toxicology Letters**, v. 112-113, n., p. 251-256, 2000.

YAMASAKI, H.; OMORI, Y.; KRUTOVSKIKH, V.; ZHU, W.; MIRONOV, N.; YAMAKAGE, K.; MESNIL, M. Connexins in tumour suppression and cancer therapy. **Novartis Foundation Symposium**, v. 219, n., p. 241-254; discussion 254-260, 1999b.

YAMAZAKI, H.; INUI, Y.; YUN, C. H.; GUENGERICH, F. P.; SHIMADA, T. Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. **Carcinogenesis**, v. 13, n. 10, p. 1789-1794, 1992.

YANG, H.; ROUSE, J.; LUKES, L.; LANCASTER, M.; VEENSTRA, T.; ZHOU, M.; SHI, Y.; PARK, Y. G.; HUNTER, K. Caffeine suppresses metastasis in a transgenic mouse model: a prototype molecule for prophylaxis of metastasis. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 21, n. 8, p. 719-735, 2004.

YU, S.; KONG, A. N. Targeting carcinogen metabolism by dietary cancer preventive compounds. **Current Cancer Drug Targets**, v. 7, n. 5, p. 416-424, 2007.

ZAYACHKIVSKA, O. S.; KONTUREK, S. J.; DROZDOWICZ, D.; BRZOZOWSKI, T.; GZHEGOTSKY, M. R. Influence of plant-originated gastroprotective and antiulcer substances on gastric mucosal repair. **Fiziolohichnyi zhurnal**, v. 50, n. 6, p. 9, 2004.

ZHAI, Y.; WU, R.; SCHWARTZ, D. R.; DARRAH, D.; REED, H.; KOLLIGS, F. T.; NIEMAN, M. T.; FEARON, E. R.; CHO, K. R. Role of beta-catenin/T-cell factor-regulated genes in ovarian endometrioid adenocarcinomas. **The American Journal of Pathology**, v. 160, n. 4, p. 1229-1238, 2002.

ZHANG, D.; KANEDA, M.; NAKAHAMA, K.; ARII, S.; MORITA, I. Connexin 43 expression promotes malignancy of HuH7 hepatocellular carcinoma cells via the inhibition of cell-cell communication. **Cancer Letters**, v. 252, n. 2, p. 208-215, 2007.

ZHANG, J.; HUANG, W.; CHUA, S. S.; WEI, P.; MOORE, D. D. Modulation of acetaminophen-induced hepatotoxicity by the xenobiotic receptor CAR. **Science**, v. 298, n. 5592, p. 422-424, 2002.

ZHANG, J.; HUANG, W.; QATANANI, M.; EVANS, R. M.; MOORE, D. D. The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 47, p. 49517-49522, 2004.

ZOU, L.; HARKEY, M. R.; HENDERSON, G. L. Effects of herbal components on cDNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity. **Life Sciences**, v. 71, n. 13, p. 1579-1589, 2002.