

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

**POSSÍVEIS EFEITOS DO EXTRATO DE GINKGO BILOBA (EGB₇₆₁) EM
ANIMAIS PORTADORES DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich**

RAFAELA MARONO FAVA

BAURU

2010

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

**POSSÍVEIS EFEITOS DO EXTRATO DE GINKGO BILOBA (EGB₇₆₁) EM
ANIMAIS PORTADORES DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH**

RAFAELA MARONO FAVA

Orientadora: Dulce Helena Jardim Constantino

Monografia apresentada ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para a obtenção do título de Licenciatura no Curso de Ciências Biológicas.

BAURU

2010

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS:

Á Professora Doutora Dulce Helena Jardim Constantino, por acreditar em meu potencial e me auxiliar no momento em que mais precisei, sem você esse trabalho certamente não seria o mesmo.

Á bióloga e amiga Franciane Quintanilha Gallego, pelas tardes e noites inacabáveis de discussões, formatações e pesquisas.

E principalmente á Deus, pois nada seria possível sem ele.

POSSIVEIS EFEITOS DO EXTRATO DE GINKGO BILOBA EM ANIMAIS PORTADORES DO TUMOR ASCÍTICO E EHRLICH.

RAFAELA MARONO FAVA - Licenciatura em Ciências Biológicas. DULCE HELENA

JARDIM CONSTANTINO - Prof^ª. Doutora (USC).

RESUMO

Como um parasita ou até mesmo um predador, o câncer compete com seu hospedeiro por alimento, irrigação sanguínea e espaço. Destrói e invade estruturas adjacentes, compromete o funcionamento de órgãos, e se não diagnosticado precocemente, leva o indivíduo a óbito. É visível o crescente interesse sobre fatores de risco ou combate a essa doença. Este trabalho visou verificar os possíveis efeitos do extrato de *Ginkgo biloba* (EGB₇₆₁), vegetal de origem asiática amplamente utilizado no tratamento de diversas doenças, em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich, uma neoplasia murina muito empregada como modelo experimental em estudos relacionados à oncologia. Para tanto foram empregados doze camundongos da linhagem suíça, divididos em dois grupos: grupo teste e grupo controle. Todos os animais foram inoculados com 10⁴ células tumorais por via intraperitoneal e após 24 horas do inóculo iniciou-se o tratamento. Os animais foram tratados com extrato de (EGB₇₆₁) ou com solução fisiológica, por via intraperitoneal uma vez ao dia, 0,1 ml, durante sete dias. Posteriormente eutanasiados com dose letal de Ketamina e Xylasina para obtenção do lavado peritoneal, contagem de células tumorais e quantificação da produção de óxido nítrico. O tratamento com (EGB₇₆₁) em nossas condições experimentais favoreceu o crescimento tumoral significativamente (controle: 13,8x10⁵±5,17 células tumorais/mL; teste: 50,0x10⁵±15,25 células tumorais/mL). O óxido nítrico não está relacionado a esta facilitação do crescimento tumoral (controle: 1,13ug/mL±0,17; teste: 0,99ug/mL±0,16).

PALAVRAS-CHAVE: *Ginkgo biloba*, neoplasia, óxido nítrico, tumor de Ehrlich.

POSSIBLE EFFECTS OF GINKGO BILOBA EXTRACT IN ANIMALS WITH EHRLICH ASCISTES TUMOR.

ABSTRACT

As a parasite or even a predator the cancer competes with its host for food, blood supply and space. Destroys and Invades adjacent structures, affects the function of organs if not diagnosed early and leads the individual to death. It is visible the growing interest in risk factors or fighting this disease. This study aimed to evaluate the effects of the extract of *Ginkgo biloba* (EGB₇₆₁), Asian plant widely used in treating various diseases, in animals with Ehrlich ascites tumor, a murine tumor often used as an experimental model in studies related to oncology. Were used in this study twelve mice of Swiss strain divided into two groups: test group and control group. All animals were inoculated with 10^4 tumor cells intraperitoneally. 24 hours after the inoculum began treatment. The animals were treated with (EGB₇₆₁) extract or with physiologic serum Intraperitoneally once a day, 0.1 ml for seven days. Later the animals were euthanized with a lethal dose of ketamine and Xylazin, for obtaining peritoneal, Counting tumor cells and quantification of nitric oxide production, the treatment with (EGB₇₆₁) in our experimental conditions favors the tumor growth significantly. (the group control: $13,8 \times 10^5 \pm 5,17$ tumor cells/mL; the test group : : $50,0 \times 10^5 \pm 15,25$ tumor cells/mL) The nitric oxide is not related to this facilitation of tumor growth, because we found no significant difference in the group treated with G.B and control group (the control group: $1,13 \mu\text{g/mL} \pm 0,17$; the test group: $0,99 \mu\text{g/mL} \pm 0,16$).

Key-Word: Cancer, *Ginkgo biloba*

INTRODUÇÃO

Estima-se que em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas em todo o mundo, o Câncer tenha sido responsável por aproximadamente 13%; o que representa um total de 13 milhões de óbitos (INCA, 2008).

Na literatura, existem algumas definições sobre o que é uma neoplasia, a mais aceita foi dada por Willis, eminente oncologista inglês, segundo ele uma neoplasia é: “Uma massa anormal de tecido cujo crescimento excede e está descoordenado daquele dos tecidos normais, persistindo de mesma maneira excessiva após o término do estímulo que induziu a alteração” (Kumar et al., 1994).

Uma neoplasia é essencialmente caracterizada pela proliferação descontrolada de células anormais do nosso organismo, que após sofrerem sucessivas divisões assumem a forma de um tumor, que por sua vez, é capaz de induzir o crescimento de novos vasos sanguíneos, processo essencial para sua nutrição e vascularização sanguínea, denominado como *angiogênese*. Levando-se em consideração que essa massa apesar de ter funções independentes, não pode ser considerada totalmente autônoma, pois depende inteiramente de seu hospedeiro para sobreviver, uma vez que sem ele não possuiria alimentação necessária para seu desenvolvimento (Porth, 2004).

Algumas substâncias exercem importantes funções em relação a essa doença: O TNF (fator de necrose tumoral) desempenha um papel essencial na iniciação da resposta imunológica inflamatória à infecção, resposta essa que é também observada em transtornos neoplásicos, podendo ser classificado em: TNF- β e TNF- α ; temos, que esse último é produzido por diversos tipos de células, incluindo: macrófagos, linfócitos T e células NK (Roitt; Brostoff; Male, 1999).

Alguns estudos sugerem que o extrato de *Ginkgo biloba* (EGB₇₆₁) possua potencial antitumoral, em experimento realizado com células do carcinoma hepatocelular, demonstrou-se que esse composto é capaz de inibir a proliferação de células neoplásicas (Chao et al., 2004).

(EGB₇₆₁) é um extrato padronizado de folhas secas de *Ginkgo biloba*, contendo: flavonoides e terpenóides, presentes em concentrações iguais a 24% e 6 % respectivamente (Su et al., 2000). Caracterizado também pela presença de flavonoides equivalentes em quercetina (Banov et al.; 2005).

Extratos preparados a partir de plantas medicinais, ou então de outras fontes naturais possuem em sua composição uma grande variedade de moléculas com uma significativa

atividade biológica. Infelizmente, isso frequentemente é difícil de analisar, devido aos seus compostos naturais e a possibilidade de terem ou não um efeito favorável para o indivíduo. (Watanabe et al., 2001).

O *Ginkgo biloba* é uma árvore de origem asiática, podendo alcançar 40 metros de altura e sobreviver até 4 milhões de anos, considerada sagrada no oriente desde os tempos ancestrais, pode ser constantemente encontrada em templos japoneses e chineses (Tyler, 1992).

Esse vegetal está entre os produtos botânicos mais comercializados na Europa e nos Estados Unidos, encontra-se na farmacopeia chinesa para o tratamento de disfunções cardiopulmonares. Sendo descrito também como agente terapêutico para doenças cardiovasculares, e pelo seu possível potencial em retardar os sintomas referentes à doenças relacionadas a perda de memória (Lorenzi; Matos, 2000).

Em estudo realizado na Universidade do Sagrado Coração, constatou-se que esse extrato é capaz de interferir na gestação reduzindo o número de fetos em fêmeas de *Rattus norvegicus*, o que indica uma possível perda pré-implantação (Cuan; Pedroso; Heubel, 2009).

METODOLOGIA Delineamento experimental:

Neste estudo serão utilizados 12 camundongos da linhagem suíça, distribuídos em dois grupos: grupo teste e grupo controle. Todos os animais serão inoculados com 10^4 células tumorais por via intraperitoneal e após 24 horas do inoculo será iniciado o tratamento. Os animais serão tratados com extrato de Ginkgo Biloba ou com solução fisiológica, por via intraperitoneal uma vez ao dia, 0,1 ml.

Após 6 dias os animais serão eutanasiados com dose letal de ketamina e xylasina. Será recolhido o lavado peritoneal e posteriormente realizada: Avaliação do crescimento tumoral e quantificação da produção de óxido nítrico.

Animais:

Foram utilizados camundongos suíços, machos, com idade entre 30 e 45 dias e procedentes do Biotério Central da Universidade do Sagrado Coração. Durante os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno. Foram tratados com ingestão de água e ração comercial específica para camundongos "*ad libitum*", em condições controladas de luz e temperatura.

Neoplasia:

Foi empregado o tumor de Ehrlich (Ehrlich e Apollant, 1905) As células neoplásicas foram mantidas *in vivo* por repiques semanais, através do implante de 10^4 células tumorais por via intraperitoneal (i.p.). A determinação do número total de células neoplásicas inoculadas por animal foi realizada através da contagem em câmara de Neubauer, empregando-se apenas as suspensões onde a viabilidade celular foi superior a 95% (teste de exclusão do Azul Trypan).

Tratamento:

Os animais foram tratados com extrato de Ginkgo Biloba (EGB₇₆₁) diluído em etanol e água destilada na dose de 80mg/kg de peso uma vez ao dia, por via intraperitoneal, num volume de 0,1ml.

Obtenção do lavado peritoneal para avaliação da produção de óxido nítrico e contagem de células.

Com auxílio de seringa descartável foram inoculados 3ml de solução fisiológica na cavidade peritoneal. O abdome do animal foi massageado e posteriormente realizado uma incisão no abdome com o objetivo de se introduzir uma pipeta automática e recolher o lavado peritoneal. Todo este procedimento foi realizado após a eutanásia do animal.

Contagem de células tumorais:

Após a obtenção do lavado peritoneal, foi realizada a contagem de células em câmara de Neubauer.

Quantificação da produção de N.O:

A determinação da concentração de nitrito é uma forma indireta de se determinar a concentração de óxido nítrico (NO). Este procedimento foi feito utilizando-se o método de Griess, este método quantifica indiretamente a produção de NO pela determinação de nitritos e nitratos acumulados no sobrenadante das células, após o tratamento (Moshage, 1995). Para tanto a cada 0,2ml de lavado peritoneal foi acrescido de 1,8ml do reativo de Griess (sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e Naphtylenediamina a 0,1% em água destilada). Como branco do teste empregamos 1,8ml de solução fisiológica acrescido de 0,2ml do lavado peritoneal. A reação ocorreu num período de 20min, após o qual foi realizada a leitura em espectrofotômetro (CELM) em comprimento de onda 540nm. O cálculo dos resultados foi realizado através da comparação do comprimento de onda dos testes com o comprimento de onda de um padrão com 100ug de nitrito/ml.

Análise estatística:

Foi empregado o Teste T de student na comparação da variável tratamento sobre os parâmetros crescimento tumoral e a produção de óxido de nítrico. O estudo estatístico foi realizado com auxílio do software Sigma Stat, versão 3.1 (Jandel Scientific).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento com o extrato (EGB₇₆₁) em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich. Para tanto, foram avaliados os seguintes parâmetros: crescimento tumoral e produção de óxido nítrico.

Após a análise, constatamos que, em nossas condições experimentais, o tratamento com o extrato favoreceu significativamente o crescimento tumoral. Resultados demonstrados na tabela 01 e gráfico 01.

O crescimento neoplásico é acompanhado da produção de uma resposta imune antitumor. Porém à medida que o tumor evolui esta resposta deixa de ser eficaz e células de defesa são “recrutadas” para trabalhar a favor do tumor. Esta resposta é modulada positiva ou negativamente por uma grande variedade de mediadores químicos, a maioria de natureza proteica e de baixo peso molecular. Dentre eles se destaca o TNF- α (fator de necrose tumoral- α) é produzido por diversos tipos de células, incluindo: macrófagos, linfócitos T e linfócitos natural killer (NK). Além de também apresentar uma atividade estimulante em relação a essas células imunológicas (Sharon, 1998) (Roitt; Brostoff; Male, 1999).

A imunidade celular exerce papel fundamental no controle do crescimento neoplásico, com participação principal de linfócitos T, linfócitos NK e macrófagos. Linfócitos T, quando expostos a células tumorais liberam linfocinas e inibem crescimento de células neoplásicas, as células NK são capazes de provocar a lise de células tumorais, e os macrófagos as eliminam de nosso organismo pelo mesmo mecanismo que utilizam para eliminação de microrganismos (Lamano, 2008) (Roitt; Brostoff; Male, 1999), ou seja, através da lise induzida por enzimas digestivas e pela produção de substâncias tóxicas derivadas do oxigênio (EROs).

Comprovadamente, o (EGB₇₆₁) levou a redução dos níveis de TNF- α em experimento realizado com ratos Wistar (Jiao et al.; 2005) (Yan-Hong et al.;2006). Além disso, (Kotakadi et al., 2008) demonstrou que o (EGB-761) suprime a ativação de macrófagos e causa a apoptose em células T citotóxicas. Outros experimentos realizados com o extrato demonstram também uma diminuição dos níveis de TNF- α (Chen et al.; 2003).

Em nosso modelo iniciamos o tratamento tumoral com EGB-761 em uma fase de seu desenvolvimento onde há participação efetiva de macrófagos e linfócitos NK no controle do crescimento tumoral.

Além disso, o desenvolvimento neoplásico, nem sempre é constante, sendo

frequentemente modificado por alguns fatores, entre eles: suprimento sanguíneo (Porth, 2004).

Podemos afirmar que um ambiente altamente vascularizado é ideal para esse crescimento. Dessa forma, atribuímos também, que esse aumento neoplásico deve-se a intensificação do fluxo sanguíneo, pois o (EGB₇₆₁) além de causar vasodilatação auxilia também no aumento da circulação do hospedeiro (Wu et al., 2007).

Através do experimento realizado com o extrato de (EGB₇₆₁) em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich, obtivemos resultados os quais nos levam a afirmar que: esse composto aplicado dentro de nossas condições experimentais efetivamente auxiliou no desenvolvimento neoplásico dos animais. Crescimento esse que podemos atribuir a possível redução das células de defesa do hospedeiro e também devido ao fato de *Ginkgo biloba* aumentar a circulação sanguínea, o que proporciona um ambiente bastante vascularizado que é considerado extremamente favorável para o desenvolvimento de células tumorais, pois é certo que essas novas células necessitem de energia e alimentação para sobreviverem e se desenvolverem adequadamente.

O óxido nítrico possui uma grande complexidade de efeitos, podendo contribuir para a regressão de tumores, ou até mesmo auxiliar em seu desenvolvimento (Costa et al., 2003). Neste trabalho observamos que ele não está relacionado com a facilitação do crescimento tumoral, pois não constatamos diferenças significativas entre o grupo teste e o controle. Resultados descritos na tabela 02 e gráfico 02.

Tabela 01. Efeito do tratamento com (EGB₇₆₁) sobre o número de células tumorais presentes no lavado peritoneal de animais portadores do TAE.

Tratamento^a	Nº células tumorais (x10⁵/mL)
Soro Fisiológico	13,80 ± 5,17 ^{b,c}
<i>Ginkgo biloba</i>	50,00 ± 15,25 [*]

a- animais tratados com solução fisiológica (0,1ml, ip, 1x/dia), ou com GB (80mg/kg de peso, 0, 1 ml, ip, 1x/dia).

b- Resultados expressos em média ± desvio padrão;

c- n= 6 animais por grupo;

* P<0,005 na comparação com o grupo tratado com soro fisiológico.

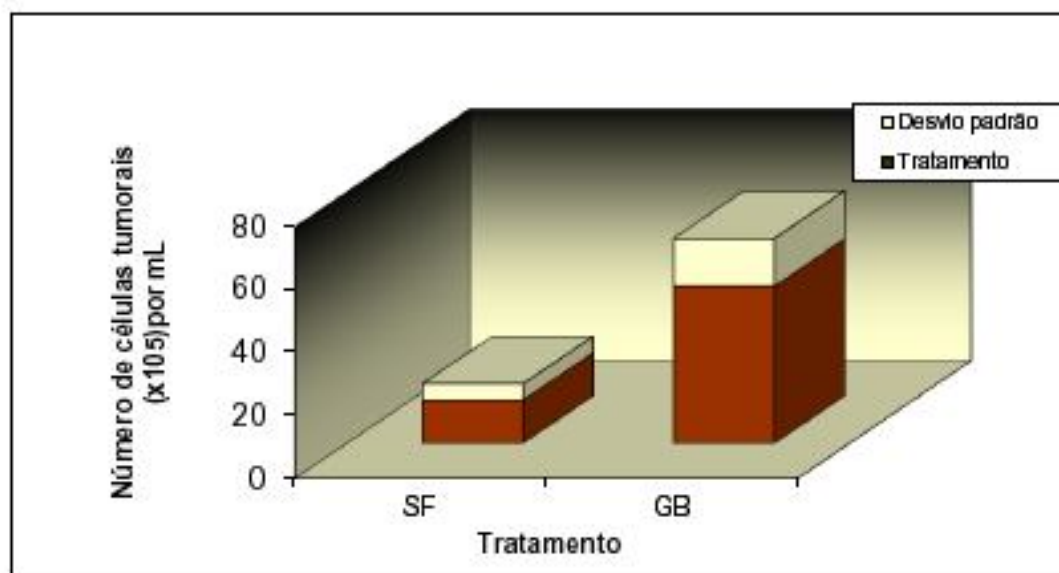


Gráfico 01. Efeito do tratamento com (EGB 761) sobre o n° de células tumorais.

Tabela 02. Efeito do tratamento com (EGB 761) sobre a produção de óxido nítrico (NO) no lavado peritoneal de animais portadores do TAE.

Tratamento ^a	NO (ug/100mL)
Soro Fisiológico	1,13 ± 0,17 ^{b,c}
<i>Gingko biloba</i>	0,99 ± 0,16

a- animais tratados com solução fisiológica (0,1ml, ip, 1x/dia), ou com GB (80mg/kg de peso, 0, 1 ml, ip, 1x/dia).

b- Resultados expressos em media ± desvio padrão;

c- n= 6 animais por grupo.

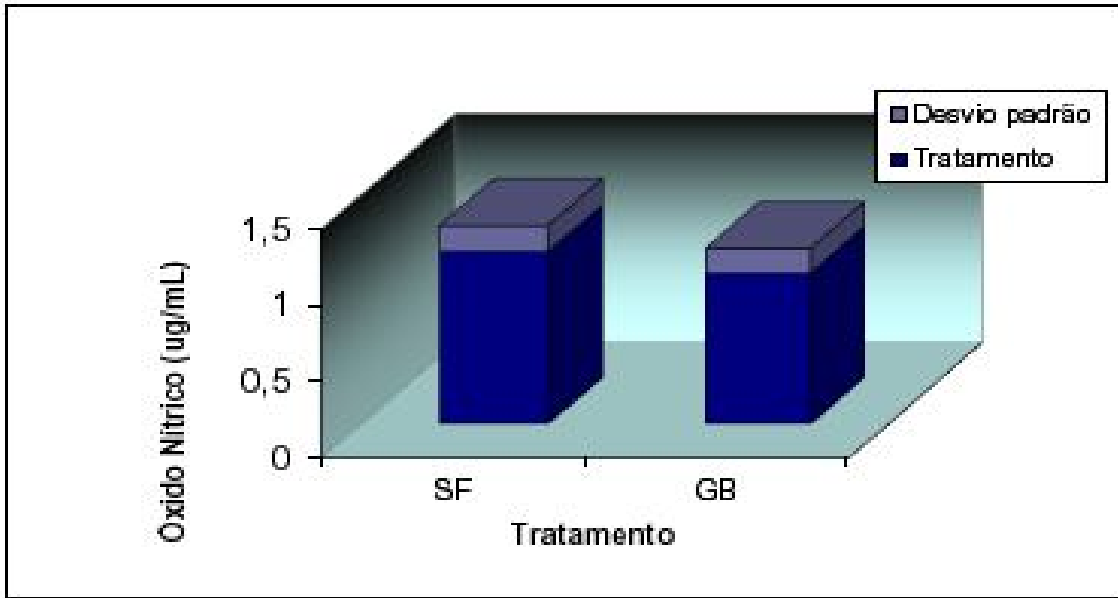


Gráfico 02. Efeito do tratamento com (EGB₇₆₁) sobre a produção de óxido nítrico.

CONCLUSÃO:

Concluimos que o extrato de Ginkgo Biloba (EGB761) dentro de nossas condições experimentais aumentou significativamente o número de células neoplásicas, atribuindo um crescimento tumoral nos animais tratados com essa substância em relação aos do grupo controle.

O óxido nítrico não foi alterado significativamente dentro desse experimento, permanecendo similar em ambos os grupos avaliados, constatamos dessa forma, que essa espécie reativa de oxigênio não teve influências sobre o aumento neoplásico do estudo.

REFERÊNCIAS:

Banov, D.; Baby, A. R.; Del Bosco L. M.; Kaneko, T.M.; Velasco, M. V. R.(2006). Caracterização do Extrato Seco de Ginkgo biloba L. em Formulações de Uso Tópico. *Acta Farm. Bonaerense*, 25 (2): 219-24

Chao, J. C. J.; Chu, C. C. (2004). Effects of Ginkgo biloba extract on cell proliferation and cytotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol*, 10(1): 37-41.

Costa, M. T.; Fabeni, C. R.; Aptekmann, K. P.; Machado, R. R. (2003) Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. *Ciência Rural*, 33(5): 967-974.

Chen, J. W.; Chen, Y. H.; Lin, F.Y.; Chen, L. Y.; Lin, S. J.(2003). Ginkgo biloba Extract Inhibits Tumor Necrosis Factor- α -Induced Reactive Oxygen Species Generation, Transcription Factor Activation, and Cell Adhesion Molecule Expression in Human Aortic Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23:1559-1566.

Cuan, F.; Pedroso, J. R.; Heubel, M. D. (2009). *Possíveis efeitos embriotóxicos da infusão do Ginkgo biloba em fêmeas de Rattus norvegicus albinas*. 36p. (Trabalho de conclusão de curso) – Departamento de Biologia, Universidade Sagrado Coração, Bauru – SP.

Ehrlich, P.; Apolant, H. (1905). Beobachtungen iiber mligne mausetumoren. *Berl. Klin. Wschr*, 28:871-4.

INCA.Estimativa 2008 (2007). *Incidência de Câncer no Brasil*.
http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/estimativa_incidencia_cancer_2008.pdf.

Acessado em 18 de agosto de 2010.

Jiao, Y.; Rui, Y.; Li, T.; Yang, P.; Qiu, Y.(2005). Expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in brain of atherosclerotic rats and effects of Ginkgo biloba extract. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26 (7): 835–839.

Kumar, V.; Cotran, R. S.; Robbins, S. L.(1994). *Patologia básica*. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA.

Kotakadi, V.S.; Jin, Y.; Hofseth, A. B.; Ying, L.; Cui, X.; Volate, S.; Chumanovich, A.; Wood, P.A.; Price, R.L.; McNeal, A.; Singh, U. P.; Singh, N. P.; Nagarkatti, M.; Nagarkatti, P. S.; Matesic, L. E.; Auclair, K.; Wargovich, M. J.; Hofseth, L. J.(2008). Ginkgo biloba extract EGb 761 has anti-inflammatory properties and ameliorates colitis in mice by driving effector T cell apoptosis. *Department of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 29(9):1799-806.

Lamano, T. L. C.(2008). *Patologia geral- Neoplasias*. (Dissertação especializada em patologia) Departamento de Odontologia e Ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto- SP.

Lorenzi, H.; Matos, F. J. A. (2002). *Plantas medicinais no Brasil – Nativas e exóticas*. ed. São Paulo: NOVA ODESSA.

Moshage, H.; Kok, B.; Huizenga, J. R.; Jansen, P. L. (1995) Nitrite and nitrate determination in plasma: a critical evaluation. *Clinchen*, 41: 892-6.

Porth, C. M. (2004). *Fisiopatologia*. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA. Roitt, I.; Brostoff, J.;

Male, D.(1999).*Imunologia*.ed. São Paulo: MANOLE. Sharon, J.:(1998). *Imunologia básica*.

ed. Rio de Janeiro: GUANABARA.

Su, S. C. M.; Chuang, H. H., Chang, P. T.(2000). Studies on the cytotoxic mechanisms of ginkgetin in a human ovarian adenocarcinoma cell line. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 362(1): 82.

Tyler, V. E. (1992). *The honest herbal*. ed. Londres: PHARMACEUTICAL PRODUCTS PRESS.

Watanabe, C. M. H.; Wolfram, S.; Adert, P.; Rimbach, G.; Packer, L.; Maguire, J. J.; Schultz, P.; Gohil, K.(2001). The in vivo neuromodulatory effects of dicine ginkgo biloba. *PNAS*, 98(12): 6577.

Wu, Y.; Li, S.; Cui, W.; Zu, X.; Wang, F.; Du, J. (2007). Ginkgo biloba Extract Improves Coronary Blood Flow in Patients with Coronary Artery Disease: Role of Endothelium-Dependent Vasodilation. . *Pharmacology*, 73(7):624.

Yan, H. Z.; Jie, P. Y.; Yi F. L.; Xiao J. T.; Mei, M.; Peng, L.; Ping, A.; Shi, Q. L.; Hong, G. Y.(2006). Effects of Ginkgo biloba Extract on Inflammatory Mediators (SOD, MDA, TNF- α , NF- κ Bp65, IL-6) in TNBS-Induced Colitis in Rats. *Mediators of Inflammation*, 92642(2006): 1-9.