

Análise da ação da *Himatanthus drasticus* na progressão do câncer de pulmão induzido por uretana em camundongos

Analysis of the action of *Himatanthus drasticus* in progression of urethane-induced lung cancer in mice

Wendy Caroline de Souza Costa França¹, Ana Cláudia Rodrigues Lopes Amaral de Souza¹, José Antônio Cordeiro¹, Patricia Maluf Cury¹

RESUMO

Objetivo: Avaliar a ação da janaguba na inibição do desenvolvimento de câncer de pulmão em modelo experimental induzido por uretana. **Métodos:** Foram injetados 3 mg/kg de uretana em 51 camundongos Balb-C, com 7 a 13 semanas de vida. Janaguba foi administrada via oral diariamente em duas doses: 0,04 mL (Grupo 2, G2) e 0,06 mL (Grupo 3, G3), por 20 semanas. Após esse período, os camundongos foram sacrificados e o número de lesões, contado. **Resultados:** A média de peso do Grupo 2 foi menor que a do Grupo 3, e que a do Grupo 1 (Controle, G1) (G1 = 35,533 g; G2 = 33,359 g; G3 = 37,125 g). O número de nódulos não diferiu entre os grupos (média G1 = G2 = G3 = 1; p = 0,88). **Conclusão:** A janaguba apresentou um efeito no crescimento dos camundongos, mas não apresentou influência na progressão do câncer de pulmão neste modelo.

Descritores: Neoplasias pulmonares; Camundongos; Uretana; Fitoterapia experimental

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of janaguba in inhibiting the development of lung cancer in an experimental urethane-induced model. **Methods:** a total of 3 mg/kg urethane was injected in 51 Balb-C mice aged 7-13 weeks of life. Janaguba was administered orally daily in two doses: 0.04 mL (Group 2, G2) and 0.06 mL (Group 3, G3), for 20 weeks. After this period, the mice were sacrificed and the number of lesions counted. **Results:** The mean weight of Group 2 was lower than that of Group 3, and that of Group 1 (Control, G1) (G1 = 35.533 g; G2 = 33.359 g; G3 = 37.125 g). The number of nodules did not differ between groups (mean G1 = G2 = G3 = 1; p = 0.88). **Conclusion:** Janaguba had an effect on the growth of mice, but had no influence on the progression of lung cancer in this model.

Keywords: Lung neoplasms; Mice; Urethane; Phytotherapy, experimental

INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão é, atualmente, a causa que lidera os relatos de casos de neoplasias que foram a óbito em ambos os sexos, e sua incidência fica em primeiro lugar entre as neoplasias malignas (cerca de 1,2 milhão de casos novos no mundo)⁽¹⁾. Na população masculina, o hábito de fumar é responsável por mais de 80% dos casos diagnosticados de câncer de pulmão; entre as mulheres, 45% dos casos de câncer pulmonar também são atribuídos ao tabagismo⁽¹⁾. A maioria dos diagnósticos é realizada quando o tumor se encontra em estágio III ou estágio IV com metástase, uma vez que tumores iniciais não costumam produzir sintomas que justifiquem investigação, o que torna o prognóstico pobre para grande parte desses pacientes. Isso aponta para a necessidade de medidas de detecção precoce, já que a ressecção cirúrgica, única abordagem terapêutica que oferece cura potencial atualmente, é efetiva somente em estádios clínicos precoces⁽²⁾.

A janaguba é uma planta do gênero *Himatanthus*, da família das Apocináceas. Esse gênero encontra-se distribuído nos trópicos e subtropicais da América do Sul, possui 13 espécies, compreendendo 8 variedades. Estudos químicos revelaram a presença de depsídeos, terpênos e iridoides em *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson⁽³⁾. Atualmente, estudos farmacológicos evidenciaram as atividades anti-inflamatória e analgésica dos iridoides presentes na casca de seu caule e no látex⁽⁴⁾, o efeito cicatrizante e uma baixa toxicidade reprodutiva e teratogênica em ratas, indicando que seu consumo é seguro na espécie humana no tratamento de gastrites e hemorroidas⁽⁵⁾.

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, São José do Rio Preto (SP), Brasil.

¹ Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, São José do Rio Preto (SP), Brasil.

Autor correspondente: Wendy Caroline de Souza Costa França – Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 – Vila São Pedro – CEP 15090-000 – São José do Rio Preto (SP), Brasil – Tel.: (17) 3201-5700 ramal 5842 - E-mail: wendyfranca@gmail.com

Data de submissão: 16/3/11 - Data de aceite: 13/9/2011

Conflitos de interesse: não há

Dentre os iridoides encontrados, a fulvoplumierina, a isoplumericina e a plumericina apresentam comprovada ação antineoplásica, antiflogística e antimicrobiana. Os depsídeos isolados de *H. sucuuba* apresentaram atividade como inibidores da enzima beta monoaminoxidase (MAO-B)⁽³⁾. Souza et al., em 2006, comprovaram a ação imunorreguladora da *H. sucuuba in vitro* sobre o óxido nítrico e o interferon gama, sugerindo ser essa a via de ação anticancerígena⁽⁶⁾.

A uretana, um éster etílico do ácido carbâmico, é um carcinógeno amplamente utilizado em estudos de carcinogênese química experimental desenvolvendo, por exemplo, adenocarcinomas em pulmão de camundongos^(7,8). Ela pode ser administrada por via oral ou injetável, constituindo um carcinógeno adequado a uma produção de tumor em um curto período de tempo. Além disso, detém baixa toxicidade, que repercute em uma reduzida taxa de mortalidade de animais. Em estudos prévios, analisamos os efeitos da poluição atmosférica em relação ao câncer de pulmão, em modelo experimental em camundongos^(7,8).

OBJETIVO

Avaliar a ação da janaguba no desenvolvimento de câncer de pulmão, em modelo experimental induzido pela uretana.

MÉTODOS

Extração da janaguba

O produto priorizado para o presente estudo, como citado, é o leite da janaguba (*Himatanthus drasticus*), que foi coletado por fornecedor especializado na serra do Araripe (CE), conforme orientação do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA). Trata-se da seiva do caule da planta, adicionado de água (utilizada no momento da extração da seiva na planta).

A partir desse “leite”, como é popularmente chamado, realizou-se o processo de extração com solventes orgânicos e purificação, até obtenção de um pó amorfo, na Universidade Federal do Ceará (UFC), para melhor estudo da substância.

Para isso, a extração do leite foi feita com acetato de etila e auxílio de funil de separação. Foram realizadas cinco extrações sucessivas. O extrato acetato de etila foi evaporado à temperatura ambiente e posteriormente submetido à Flash Cromatografia de amido de milho com auxílio de pressão, utilizando como eluente diclorometano/acetona, em polaridade crescente. Obteve-se um sólido esbranquiçado (HD) com alto rendimento (1 L de leite - 10 g). Esse sólido foi submetido à purificação em coluna de sílica, utilizando-se como eluente hexano/diclorometano em polaridade crescente.

Devido à impossibilidade de reprodução dessa técnica em nossa instituição (Faculdade de Medicina de

São José do Rio Preto – FAMERP) foi utilizado somente o leite fornecido pelo Departamento de Farmácia/Laboratório de Farmacognosia da UFC.

Procedimentos

Foram utilizados inicialmente 51 camundongos Balb-c com 7 a 13 semanas de vida. No primeiro dia do experimento, os animais foram pesados e em cada um foram injetados 3 mg/kg de uretana, a partir de uma solução mestra de 10 mL de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% por via intraperitoneal, fracionada em duas doses de 1,5 mg/kg com intervalo de 48 horas entre as mesmas.

Os animais foram divididos em três grupos:

- Grupo 1: com 16 camundongos (controle), recebeu apenas uretana ;
- Grupo 2: com 17 camundongos, recebeu uretana e leite da janaguba na dose de 0,04 mL por camundongo diluída na água trocada diariamente. Essa dose foi baseada proporcionalmente na dose usada em humanos;
- Grupo 3: com 17 camundongos, recebeu uretana e leite da janaguba na dose de 0,06 mL por camundongo diluída na água trocada diariamente.

Esses grupos foram mantidos durante 20 semanas, sendo alimentados com ração e água (que continha leite de janaguba nos Grupos 2 e 3). Os animais foram pesados semanalmente e a média de peso por grupo foi registrada. Os animais foram mantidos em gaiolas à temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$, umidade relativa do ar de 60% e dieta baseada em água e ração ad libitum.

Após 20 semanas do início do experimento, eles foram sacrificados após inalação por gás carbônico. Posteriormente, o trato respiratório foi retirado e fixado por instilação intratraqueal de solução 10% de formalina tamponada. Foi realizada necrópsia em todos os animais com retirada de pulmões e coração. Rins, fígado e baço foram retirados dos primeiros cinco camundongos sacrificados de cada grupo para análise do efeito do fitoterápico nesses órgãos. Todo o material foi fixado em formalina para posterior fabricação de lâminas histológicas. Estas foram coradas com hematoxilina-eosina após processamento de rotina. O número de lesões foi avaliado estatisticamente pelos métodos não paramétricos de Kruskal- Wallis e Mann-Whitney.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética por meio do Protocolo Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) n.º 6006/2008 no dia 29 de Julho de 2009.

RESULTADOS

Em relação ao peso dos camundongos no final do experimento (Figura 1), houve diferença estatisticamente significativa entre a média de peso do Grupo 2, que usava

a dose de janaguba equivalente a usada por humanos (0,04 mL/dia), e a do Grupo 3, que usava uma dose maior de janaguba (0,06 mL/dia), tendo o Grupo 3 a maior média (G1 = 35,533 g, G2 = 33,359 g, G3 = 37,125 g).

Já em relação ao número de nódulos neoplásicos (Figuras 2 e 3) analisado nas lâminas, não houve diferença significativa entre o grupo controle e os grupos que fizeram uso de janaguba durante o experimento (média de G1 = G2 = G3 = 1; $p = 0,88$). A avaliação histológica dos outros órgãos estudados não demonstrou nenhuma alteração significativa.

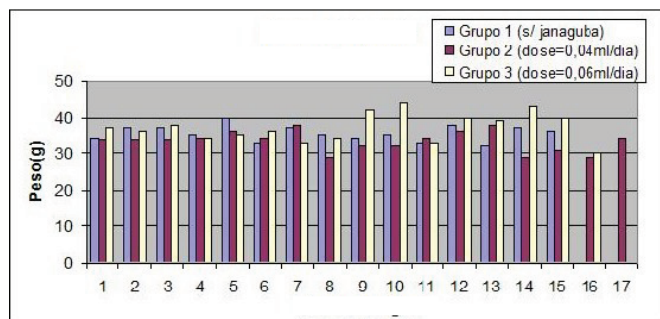


Figura 1. Peso dos camundongos no final do experimento em relação ao tratamento recebido. One-way ANOVA: peso versus tratamento – há evidência de diferença entre as médias ($vp = 0,004$): janaguba_(Grupo 1) < janaguba_(Grupo 2) (vp de Bonferroni = 0,012)

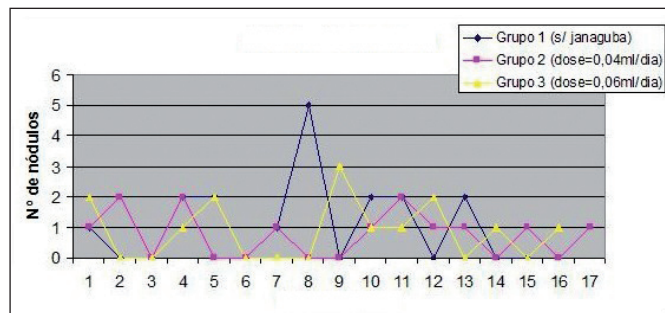


Figura 2. Número de nódulos pulmonares em relação ao tratamento recebido. Kruskal-Wallis Test: número de nódulos versus tratamento – não há evidência de diferença ($p = 0,88$)

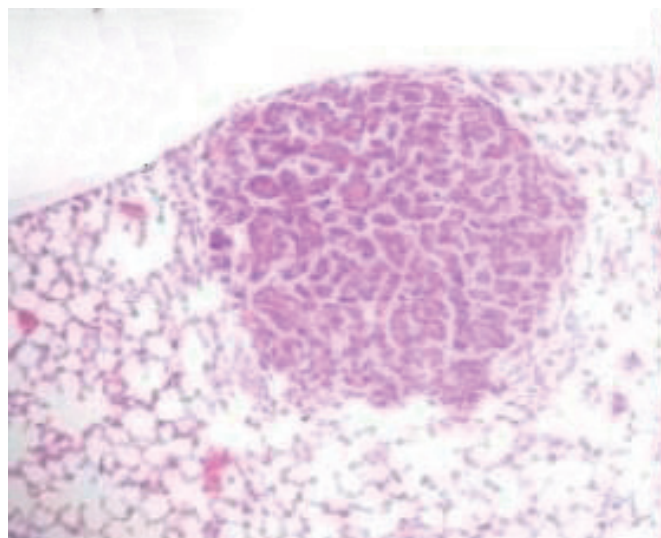


Figura 3. Fotomicrografia do nódulo de pulmão corado em hematoxilina-eosina, 100x

DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que a janaguba, nas duas doses utilizadas, não apresentou efeito antitumoral no modelo estudado. Não houve também, alterações histológicas significativas em outros órgãos. Curiosamente, entretanto, observou-se uma diferença significativa de peso entre o grupo que recebeu dose menor e o que recebeu dose maior desse fitoterápico.

Essa diferença de peso não foi vista em outros experimentos que usaram a uretana para induzir câncer de pulmão. Roomi et al. utilizando camundongos A/J que foram submetidos a carcinogênese por uretana e foram alimentados com mistura de alimentos composta por lisina, prolina, arginina, ácido ascórbico, extrato de chá verde, N-acetilcisteína, selênio, cobre e magnésio, não observaram diferença significativa entre o peso dos camundongos que usaram a mistura e os do grupo controle⁽⁹⁾. Resultado semelhante foi encontrado em camundongos Balb-C que foram expostos ao tabaco após indução de câncer de pulmão por uretana, em nosso grupo⁽¹⁰⁾.

As medicações atualmente utilizadas no tratamento do câncer geralmente levam à consumpção. Em estudo realizado com camundongos A/J em uso de erlotinibe após 16 semanas da indução de carcinogênese por uretana, verificou-se que doses altas, como 100 mg/kg, levaram a uma perda de peso de 9 a 12% em 24 horas após o uso da medicação. Ao reduzir a dose para 30 mg/kg, a perda de peso ainda foi significativa após 5 dias do tratamento e, somente quando os pesquisadores reduziram a dose para 10mg/kg, a perda de peso foi considerada insignificante – ainda assim com redução de carga tumoral significativa em camundongos do sexo masculino⁽¹¹⁾.

Em nosso estudo, verificou-se peso significativamente maior no grupo que fazia uso da dose maior de janaguba em relação ao grupo que ingeria dose menor. Esse achado não pode ser relacionado com a eficácia do fitoterápico, já que não houve redução estatística do número de nódulos em relação ao grupo controle. Uma das possibilidades seria um efeito colateral da droga, constituído por edema intersticial generalizado, visto que não foram observadas outras alterações histológicas significativas em órgãos internos.

Uma crítica ao presente estudo seria a não realização do experimento em gaiolas metabólicas. Isso não foi planejado a princípio, pois o foco do trabalho era a avaliação do efeito antitumoral, no qual a análise do número de lesões pulmonares seria suficiente para a avaliação desse efeito, como realizado pelo nosso grupo, utilizando outras drogas como FTY720^(12,13). A possibilidade do aumento de peso estar relacionada ao aumento de ingesta oral de água não é provável, tendo em vista que os três grupos apresentavam ingesta semelhante. Uma nova abordagem para avaliação do aumento do peso dos animais, assim como dosagem sérica de proteínas, por exemplo, deverá ser feita.

O número de animais utilizados foi considerado adequado, pois foi semelhante e até maior do que em outros estudos do nosso grupo com resultados positivos^(12,13).

Modelos experimentais que usam a uretana como carcinógeno têm conseguido bons resultados em quimio-prevenção do câncer de pulmão. No entanto, experimentos que utilizam a uretana em camundongos Balb-C não são muito descritos na literatura atual, tendo como maior exemplo os desenvolvidos em nossa instituição^(10,12,13). Pesquisa realizada em camundongos A/J com silibinina, um inibidor do crescimento tumoral, levou à redução de multiplicidade tumoral estatisticamente significativa⁽¹⁴⁾. Já o uso de inibidores da FAS (*fatty acid synthase*), levou à redução tanto do número de tumores como da carga tumoral total em relação ao grupo controle⁽¹⁵⁾. A mistura de alimentos já citada, utilizada também em camundongos A/J, ingerida por 20 semanas – mesma duração do nosso experimento, ocasionou uma redução de 49% na média de tumores e uma diminuição de 18% na média de peso dos pulmões em relação ao grupo controle⁽⁹⁾.

Em animais transgênicos, também com carcinogênese induzida por uretana, drogas anti-inflamatórias gene ativadas 1 (NAG-1), que sabidamente inibem progressão de câncer gastrintestinal em ratos, provocaram redução do número e do tamanho dos nódulos pulmonares em comparação com o controle⁽¹⁶⁾.

Uma justificativa para nosso achado negativo em relação ao possível efeito antitumoral da janaguba seria o fato de termos usado apenas machos em nossa amostra. A literatura aponta para efeitos diferentes de drogas entre machos e fêmeas em modelos experimentais de camundongos. Em estudo realizado com camundongos A/J em uso de erlotinibe para câncer de pulmão induzido por uretana, os machos se mostraram mais sensíveis à droga, tendo uma redução da carga tumoral significativa. Por outro lado, as fêmeas apresentaram um aumento significativo de lesões⁽¹¹⁾. Sendo assim, além da possibilidade de não termos realmente um efeito antitumoral da janaguba em camundongos Balb-c, poderíamos pensar na hipótese dos camundongos machos serem menos sensíveis à ação da janaguba, possibilidade que poderia ser analisada em experimentos futuros com o fitoterápico em fêmeas.

CONCLUSÃO

A janaguba apresentou um efeito no crescimento ponderal dos camundongos Balb-C, evidenciado pela diferença de peso observada nos animais quando utilizadas em diferentes doses, mas não apresentou influência na progressão do câncer de pulmão induzido por uretana neste modelo. Novas doses ou o uso de outras cepas de animais poderiam ser interessantes para avaliar o efeito dessa substância.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Aline Holanda Silva e a Dr^a Mary Anne Medeiros Bandeira, da Faculdade de Farmácia,

Odontologia e Enfermagem do Departamento de Farmácia/Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal do Ceará -UFC, que forneceram o leite da janaguba com o qual esse experimento foi realizado. Agradecemos também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por ter concedido bolsa pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), em 2009-2010.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional do Câncer (INCA) [Internet]. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2008 – Introdução. [citado 2009 Maio 10]. Disponível em: www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=2.
2. Martins RG, Advincula G, Costa R, Aragão B, Santos W, Toscano E, et al. Weekly Docetaxel as first-line chemotherapy in stage IV nonsmall cell lung cancer: effective treatment with low toxicity. *Rev Bras Cancerol*. 2004; 50(4):279-86.
3. Silva JR, Amaral AC, Silveira CV, Rezende CM, Pinto AC. Quantitative determination by HPLC of irioids in the bark and latex of *Himatanthus succuba*. *Acta Amazônica*. 2007;37(1):119-22.
4. Silva JR, Rezende CM, Pinto AC, Pinheiro MLB, Cordeiro MC, Tamborini E, et al. Ésteres triterpênicos de *Himatanthus succuba* (Spruce) Woodson. *Quím Nova*. 1998;21(6):705-8.
5. Villegas LF, Fernández ID, Maldonado H, Torres R, Zavaleta A, Vaisberg AJ, et al. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Perú. *J Ethnopharmacol*. 1997;55(3):193-200.
6. Souza MS, Cordeiro MS, Rosasb EC, Henriquesb MG, Sianib AC. PHCOG MAG.: Research article inhibition of nitric oxide and interferon gamma production by irioids and triterpenes from the roots of *Himatanthus succuba*. *Pharmacognosy Mag*. 2006;2(8):216-9.
7. Reymão MS, Cury PM, Lichtenfels AJ, Lemos CN, Battlehner CN, Conceição GMS, et al. Urban air pollution enhances the formation of urethane-induced lung tumors in mice. *Environmental Res*. 1997;74(2):150-8.
8. Cury PM, Lichtenfelds AJ, Reymão MS, Conceição GM, Capelozzi VL, Saldiva PH. Urban levels of air pollution modifies the progression of urethane-induced lung tumors in mice. *Pathol Res Prat*. 2000;196(9):627-33.
9. Roomi MW, Roomi NW, Kalinovskiy T, Rath M, Niedzwiecki A. Chemopreventive effect of a novel nutrient mixture on lung tumorigenesis induced by urethane in male A/J mice. *Tumori*. 2009;95(4):508-13.
10. Santiago LN, de Camargo Fenley J, Braga LC, Cordeiro JA, Cury PM. The effect of different doses of cigarette smoke in a mouse lung tumor model. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009;2(2):176-81.
11. Zerbe LK, Dweyr-Nild LD, Fritz JM, Redente EF, Shroyer RJ, Conklim E, et al. Inhibition by erlotinib of primary lung adenocarcinoma at an early stage in male mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008;62(4):605-20.
12. Lucas da Silva LB, Ribeiro DA, Cury PM, Cordeiro JA, Bueno V. FTY720 treatment in experimentally urethane-induced lung tumors. *J Exp Ther Oncol*. 2008;7(1): 9-15.
13. Salinas NR, Oshima CT, Cury PM, Cordeiro JA, Bueno V. FTY720 and lung tumor development. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(6):689-93.
14. Singh RP, Deep G, Chittezhath M, Kaur M, Dwyer-Nield LD, Malkinson AM, et al. Effect of silibinin on the growth and progression of primary lung tumors in mice. *J Nat Cancer Inst*. 2006;98(12):846-55.
15. Orita H, Coulter J, Tully E, Kuhajda FP, Gabrielson EI. Inhibiting fatty acid synthase for chemoprevention of chemically induced lung tumor. *Clin Cancer Res*. 2008;14(8):2458-64.
16. Cekanova M, Lee SH, Donnell RL, Sukhthanka M, Eling TE, Fischer SM, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 expression inhibits urethane-induced pulmonary tumorigenesis in transgenic mice. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009;2(5):450-8.