

EFEITO DO TRATAMENTO COM ISOFLAVONA NO CRESCIMENTO DO TUMOR SÓLIDO DE EHRlich

Michelle Corrêa da Rocha¹
João Alexandre Valentim de Oliveira²
Dulce Helena Jardim Constantino³

¹Mestranda em
Análises Clínicas
na subárea
de Imunologia.

²Graduado em
Farmácia pela
Universidade
do Sagrado
Coração,
Bauru.

³Doutora e Docente
do Centro de
Ciências da Saúde
pela universidade do
Sagrado Coração.

Recebido em: 19/8/2004.
Aceito em: 29/4/2005.

ROCHA, Michelle Corrêa da; OLIVEIRA, João Alexandre Valentim de. Efeito do tratamento com Isoflavona no crescimento do Tumor Sólido de Ehrlich. *Salusvita*, Bauru, v. 24, n. 3, p. 393-401, 2005.

RESUMO

Estudos epidemiológicos revelam que o consumo regular de soja reduz ou suprime o câncer de mama, sendo esse fato associado à presença de isoflavonas, fitoestrógenos contidos nesses grãos. Atribui-se ao estrogênio a facilitação do crescimento de neoplasias mamárias humanas e, por consequência, o uso do fitoestrogênio vem se mostrando uma terapia alternativa ao uso de estrogênio. Neste estudo, avaliou-se a ação das isoflavonas sobre o crescimento do tumor de Ehrlich, baseando-se nas determinações de peso, área e proliferação celular. Para tanto, administrou-se uma suspensão de isoflavona, via intraperitoneal, na dose de 20 mg/kg de peso, por 20 dias. Constatou-se que o tratamento com isoflavona é capaz de interferir no ciclo de divisão celular, pois o número de figuras de mitose foi significativamente reduzido no grupo tratado. O peso e as dimensões da massa tumoral não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, fato que merece investigação futura.

INTRODUÇÃO

Dentre as neoplasias mais freqüentes na espécie humana, destacam-se os tumores mamários, como o adenocarcinoma mamário. O crescimento desses tumores é influenciado por estrógenos, cuja função é a indução de mitoses em células iniciadas (EHRlich, P.; APLANT, H., 1905; LEE, D. S. et al., 2001).

Há evidências de que esse hormônio feminino interfira na expressão do gene bcl-23, que controla o processo de apoptose. Sabe-se que, em células tumorais, a apoptose ou morte celular programada geneticamente é atrasada e que a concentração do estrogênio é responsável pelo crescimento tumoral (CUEVAS, J.; SIRBASKU, D., 2000; SUH, K. S., 2003).

Assim, o uso do estrogênio em terapias de reposição hormonal passou a ser questionado. Um grande avanço nessa área foi a obtenção de um componente natural da soja: a genisteína, uma isoflavona agonista do estrogênio, que passou a ser utilizada em terapias de reposição hormonal com sucesso, sem apresentar os efeitos colaterais associados ao estrogênio (MESSINA, M. J. et al., 1994).

Estudos com esse flavonóide revelaram seu efeito antitumoral, quando associado a anticorpos específicos, no tratamento de leucemia linfóide (UPADHYAY, S. et al., 2001). O emprego da genisteína, em associação com droga antineoplásica, melhora a taxa de maturação celular e inibe a proliferação das células leucêmicas (LOWENTHAL, H.; JAHN, G., 1932).

Em estudos envolvendo tumores, cujo crescimento é influenciado por hormônios, como os tumores mamários e o de próstata, a genisteína apresentou importante efeito quimiopreventivo (THIS et al., 2001).

Seu uso também se mostrou capaz de reduzir a incidência de metástases em tumores em fases avançadas (SHAO, Z. M. et al., 1998). Em neoplasia de bexiga, o tratamento com isoflavona demonstrou-se efetivo por meio de uma combinação de efeitos diretos nas células tumorais e efeitos indiretos na angiogênese do tumor (ZAVA, D. T.; DUWE, G., 1997).

O mecanismo de ação da genisteína está relacionado à sua afinidade pelo receptor b no epitélio glandular mamário, enquanto o estrogênio se liga a dois tipos de receptores – a e b –, e tal mecanismo de ação pode levar à proteção do câncer de mama devido à ação na proliferação e diferenciação que exerce na glândula mamária

ROCHA, Michelle Corrêa da;
OLIVEIRA, João Alexandre Valentim de; CONSTANTINO, Dulce Helena Jardim. Efeito do tratamento com Isoflavona no crescimento do Tumor Sólido de Ehrlich. *Salusvita*, Bauru, v. 24, n. 3, p. 393-401, 2005.

(CONTRONEO et al., 2002). Acredita-se que a genisteína reduz os níveis de hormônio ovariano circulante em mulheres na pré-menopausa. A diminuição dos níveis desses hormônios é capaz de reduzir a proliferação das células da mama e de reduzir o risco de câncer de mama (MAZZUR, W.; ADLERCREUTZ, H., 1998).

Neste estudo, avaliamos o efeito das isoflavonas no crescimento do tumor sólido de Ehrlich (GOODMAN, G. et al., 1996; LU, L. et al., 2000), tumor murino, originalmente mamário, transplantado com sucesso para o tecido subcutâneo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados camundongos suíços, machos, com idade entre 30 e 45 dias, procedentes do biotério da Universidade do Sagrado Coração, Bauru.

Após ter sido empregado o tumor de Ehrlich, as células neoplásicas foram mantidas *in vivo* por repiques semanais nos camundongos, para o implante de 10^7 células tumorais nos camundongos pela via subcutânea. Na obtenção de inóculos para implante do tumor, o fluido ascítico foi retirado, por punção, da cavidade peritoneal, e a suspensão foi lavada com solução salina tamponada apirrogênica (1500 rpm, 10 minutos) e ajustada concentração de 10^8 células/mL.

Para investigar a viabilidade celular, utilizou-se o teste de exclusão pelo azul de Tripán. Em todos os protocolos, foram empregadas somente as suspensões que apresentaram viabilidade superior a 95%.

A isoflavona foi administrada diariamente, via intraperitoneal, na dose diária de 20 mg/kg (EHRlich; APOLANT, 1905), durante 20 dias.

Os tumores foram removidos dos animais, fixados e processados rotineiramente para H.E.

A avaliação do crescimento tumoral procedeu-se por meio dos seguintes itens: *peso tumoral* – foi avaliado por pesagem em balança analítica; *dimensões da massa tumoral* – foram verificadas com o auxílio de um paquímetro, tomando-se como base o comprimento da maior extensão do tumor; *contagem do número de mitoses* – foi realizada pela microscopia de cortes de tecidos tumorais corados pelo H.E.

Utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney e os resultados foram discutidos com 5% de significância.

RESULTADOS

Verificamos que, em nossas condições experimentais, não houve variação significativa no peso tumoral entre o grupo tratado e o controle (TABELA 1).

TABELA 1 – Efeito do tratamento com isoflavona no peso do tumor sólido de Ehrlich.

	Tratamento		
	Isoflavona	Controle	Teste estatístico
Peso	0,25 \bar{I} 0,05* (0,10; 0,60)**	0,30 \bar{I} 0,35 (0,05; 1,10)	0,67* **

* Mediana semi-amplitude interquartilica.

** Valor mínimo; valor máximo.

*** $P > 0,05$.

Da mesma forma, não foram constatadas diferenças entre as dimensões da massa tumoral ao comparar o grupo tratado com o grupo controle, dados que podem ser observados na TABELA 2.

TABELA 2 – Efeito do tratamento com isoflavona nas dimensões do tumor sólido de Ehrlich.

Variável	Tratamento		
	Isoflavona	Controle	Teste estatístico
D maior	1,00 \bar{I} 0,16* (0,60; 3,00)* *	1,20 \bar{I} 0,50 (0,60; 2,00)	0,44***
D menor	0,75 \bar{I} 0,11 (0,50; 1,00)	0,90 \bar{I} 0,30 (0,40; 1,90)	1,55
Área	0,64 \bar{I} 0,17 (0,28; 1,41)	0,85 \bar{I} 0,53 (0,19; 2,69)	0,96

* Mediana semi-amplitude interquartilica.

** Valor mínimo; valor máximo.

*** $P > 0,05$.

O tratamento com isoflavona afetou significativamente o número de figuras de mitoses no parênquima tumoral, e o grupo tratado apresentou o menor número de células em fase mitótica quan-

ROCHA, Michelle Corrêa da; OLIVEIRA, João Alexandre Valentim de; CONSTANTINO, Dulce Helena Jardim. Efeito do tratamento com Isoflavona no crescimento do Tumor Sólido de Ehrlich. *Salusvita*, Bauru, v. 24, n. 3, p. 393-401, 2005.

ROCHA, Michelle Corrêa da;
OLIVEIRA, João Alexandre Valentim de; CONSTANTINO, Dulce Helena Jardim. Efeito do tratamento com Isoflavona no crescimento do Tumor Sólido de Ehrlich. *Salusvita*, Bauru, v. 24, n. 3, p. 393-401, 2005.

do comparado ao número de mitoses encontradas nas células do tumor do grupo controle, conforme TABELA 3. O fato sugere que o tratamento com isoflavona interferiu no ciclo celular, afetando, conseqüentemente, o crescimento tumoral no modelo empregado neste estudo.

TABELA 3 – Efeito do tratamento com isoflavona no número de mitoses presentes no tecido tumoral.

	Tra tamento		
	Isoflavona	Controle	Teste estatístico
Número de mitoses	8,50 $\bar{\pm}$ 1,50* (5,00; 14,00)**	17,00 $\bar{\pm}$ 1,50 (5,00; 20,00)	3,96** *

* Mediana \pm semi-amplitude interquartilica.

** Valor mínimo; valor máximo.

*** $P < 0,0001$.

DISCUSSÃO

O tratamento com genisteína, um dos componentes da isoflavona, inibe a proliferação de receptores estrogênicos positivos e negativos em linhagens de células cancerosas de mama, caracterizada, dentre outros fatores, pela contenção específica na fase G2/M do ciclo celular (CONSTANTINO, 1998), acompanhado pela diminuição do número de células na fase G1 e S (SHAO, 1998).

Neste estudo, constatou-se que o tratamento com isoflavona afirmou a capacidade inibitória do crescimento tumoral por sua propriedade antimitótica.

O peso e as dimensões tumorais não se alteraram, porém, os tipos celulares foram encontrados em proporções diferentes, ou seja, houve maior número de células em mitose encontradas no grupo controle do que no grupo tratado, fato que se deve, provavelmente, ao bloqueio da progressão do ciclo celular e, possivelmente, associado à ativação do gene p21^{waf1}, o qual, juntamente com a inativação do gene bcl-2, induz à apoptose (CONSTANTINO, 1998, UPADHYAY, 2001). Essa apoptose é a via comum pela qual todas as células tumorais tratadas com genisteína são destruídas, contendo, assim, o crescimento tumoral (ZHOU, 1998, CONSTANTINO, 1998, UPADHYAY, 2001, SUH, 2003).

A diminuição de células viáveis, como observada nos tumores dos camundongos do grupo tratado e associada ao fenômeno apoptótico, em neoplasias metastáticas, reduz a incidência de metástases. Conforme Setchell (1998), a genisteína é capaz de reduzir a disseminação metastática em tumores em fases avançadas, como no tumor de bexiga de ratos, em que Zhou (1998) verificou que as isoflavonas da soja, além do potencial de inibição do crescimento tumoral pelo fenômeno apoptótico, é capaz de conter a angiogênese, contendo a proliferação das células tumorais e a neovasculatura tumoral.

Outra propriedade da genisteína, apontada por Conklin (2000), parece garantir a inibição do crescimento tumoral, ou seja, a inativação das enzimas: tirosina-quinase, responsável pela proteção das células contra o fenômeno apoptótico (NEDLJKOVIAE, 2001, CLARCK, 1996) e topoisomerase II, essencial à replicação de células cancerosas, especialmente as da mama (CONKLIN, 2000). O modelo tumoral empregado neste estudo é um tumor originalmente mamário e espontâneo que, ao ser transplantado para a cavidade peritoneal, adaptou-se, perdendo algumas de suas características genéticas originais; porém, supostamente, ainda pôde manter algumas de suas características primárias.

Sendo assim, pode-se, também, atribuir a atividade antiproliferativa de células tumorais da genisteína devido a essas duas propriedades, acima descritas.

Outro fato a ser destacado é que, no grupo tratado com isoflavona, a área de necrose aparenta ser mais extensa do que a dos tumores do grupo-controle, fazendo-se necessária uma avaliação da área de necrose em estudos posteriores, para constatação se o fato observado é estatisticamente significativo.

Embora em nossa pesquisa não tenha sido avaliado o efeito da isoflavona em fêmeas, estudos posteriores também são necessários para esclarecer a capacidade da genisteína em competir com o estrogênio por receptores estrogênicos.

CONCLUSÃO

O tratamento com isoflavona foi capaz de influenciar no crescimento do tumor sólido de Ehrlich. O fato pode ser evidenciado pelo reduzido número de mitoses presentes no tecido tumoral quando os animais receberam a suspensão de isoflavonas.

Estudos posteriores são necessários para quantificar as áreas de necrose e qual a sua influência no peso e nas dimensões tumo-

ROCHA, Michelle Corrêa da;
OLIVEIRA, João Alexandre Valentim de; CONSTANTINO, Dulce Helena Jardim. Efeito do tratamento com Isoflavona no crescimento do Tumor Sólido de Ehrlich. *Salusvita*, Bauru, v. 24, n. 3, p. 393-401, 2005..

ROCHA, Michelle
Corrêa da;
OLIVEIRA, João
Alexandre Valentim
de; CONSTANTINO,
Dulce Helena Jardim.
Efeito do
tratamento com
Isoflavona no
crescimento do
Tumor Sólido de
Ehrlich. *Salusvita*,
Bauru, v. 24, n. 3,
p. 393-401, 2005.

rais, pois, neste estudo, a despeito do reduzido número de mitoses no grupo tratado com isoflavona, não se constatou diferenças em relação a esses parâmetros.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq/PIBIC e USC, pelo apoio financeiro, bem como a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. CLARCK, J. W. et al. Effects of tyrosine kinase inhibitors on the proliferation of human breast cancer cell lines and proteins important in the ras signaling pathway. *Int. J. Cancer*, Providence, v. 65, p. 186-191, April 1996.
2. CONKLIN, K. A. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutics effectiveness and development of side effects. *Nutrition and cancer*, v. 37, n. 1, p. 1-18, 2000.
3. CONSTANTINO, A. I., KAMATH, N.; MURLEY, J. S. Genistein inactivates bcl-2, delays the G2/M phase of the cell cycle, and induces apoptosis of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Eur. Jr. Cancer*, v. 34, n. 12, p. 1.927-1.934, March 1998.
4. COTRONEO, M. S., et al. Genistein action in the prepubertal mammary gland in a chemoprevention model. *Carcinogenesis*, v. 23, n. 9, p. 1.467-1.474, 2002.
5. CUEVAS, J., SIRBASKU, D. Estrogen mitogenic action III. Is phenol "red herring"? *In vitro cell. Dev. Bio. Houston*, v. 36, p. 447-464, July/August 2000.
6. EHRLICH, P.; APOLANT, H. Beobachtungen iiber maligne mausetumoren. *Berl. Klin. Wschr.*, v. 28, p. 871-874, 1905.
7. GOODMAN, G. et al. Agentes Antiproliferativos. In: _____. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 848.
8. LEE, D. S. et al. Genistein, a soy isoflavone, is a potent a-glucosidase inhibitor. *FEBS Letters*, v. 501, p. 84-86, April 2001.
9. LI, W., WEBER, G. Synergistic action of tiazofurin and genistein

- on growth inhibition and differentiation of K-562 human leukemic cells. *Life Sciences*, v. 63, n. 22, p. 1.975-1.981, Sept. 1998.
10. LOWENTHAL, H.; JAHN, G. Übertragungsversuche mit carcinomatöser mause-ascitesflüssigkeit und ihr verhalten gegen physikalische und chemische einwirkungen. *Z. Krebsforsch.*, v. 37, p. 439-47, 1932.
 11. LU, L. et al. Decreased ovarian hormones during a soya diet: Implications for breast cancer prevention. *Cancer Research*, v. 60, p. 4.112-4.121, August 2000.
 12. MAZZUR, W., ADLERCREUTZ, H. Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment: Naturally occurring oestrogens in food. *Pure and Applied chemistry*. Helsinque, v. 70, n. 9, p. 1.759-1.776, 1998.
 13. MESSINA, M. J. et al. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer*, v. 21, p. 113-131, 1994.
 14. MURRIL, W. B. et al. Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats. *Carcinogenesis*, v. 17, n. 7, p. 1.451-1.457, 1996.
 15. NEDELJKOVIAE, A. Pleiotropic effect of genistein makes it a promising cancer protective compound. *Archive of Oncology*, v. 9, n. 3, p. 171-174, 2001.
 16. ROBBINS, S.L., et al. Neoplasias. In:_____. *Patologia estru - tural e funcional*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, cap.7, p. 213-269.
 17. SETCHELL, Kenneth D. R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soyisoflavones. *Journal Clinical Nutrition*, Cincinnati, v. 68, p. 1.333-1.346, 1998.
 18. SHAO, Z. M. et al. Genistein inhibits proliferation similarly in estrogen receptor positive and negative human breast carcinoma cell lines characterized by P21WAF1/CIP1 induction, G2/M arrest and apoptosis. *J. Cell Biochem*, v. 69, p. 44-54, 1998.
 19. SIRBASKU, D., CUEVAS, J. Estrogen mitogenic action II. Negative regulation of the steroid hormone-responsive growth of cell lines derived from human and rodent target tissue tumors and conceptual implication. *In vitro cell. Dev. Bio. Houston*, n. 36, p. 428-446, July/August 2000.
 20. SUH, K. S. Soybean inhibit tumor necrosis factor a-induced apoptosis and the production of interleukin-6 and prostaglandin E2 in osteoblastic cells. *Phytochemistry*, v. 63, p. 209-215, Jan. 2003.
 21. THIS et al. Phytoestrogens after breast cancer. *Endocrinology*, n. 8, p. 129-134, 2001.

ROCHA, Michelle
Corrêa da;
OLIVEIRA, João
Alexandre Valentim
de; CONSTANTINO,
Dulce Helena Jardim.
Efeito do
tratamento com
Isoflavona no
crescimento do
Tumor Sólido de
Ehrlich. *Salusvita*,
Bauru, v. 24, n. 3,
p. 393-401, 2005.

ROCHA, Michelle
Corrêa da;
OLIVEIRA, João
Alexandre Valentim
de; CONSTANTINO,
Dulce Helena Jardim.
Efeito do
tratamento com
Isoflavona no
crescimento do
Tumor Sólido de
Ehrlich. *Salusvita*,
Bauru, v. 24, n. 3,
p. 393-401, 2005.

22. UPADHYAY, S. et al. Differential sensitivity of normal and malignant breast epithelial cells to genistein is partly mediated by p21WAF1. *Clinical Cancer Research*, v. 7, p. 1.782-1.789, 2001.
23. ZAVA, D. T.; DUWE, G. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer in vitro. *Nutr Cancer*, v. 27, n. 1, p. 31-40, 1997.
24. ZHOU, J. et al. Inhibition of murine bladder tumorigenesis by soy isoflavones via alterations in the cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. *Cancer Research*, v. 58, p. 5.231-5.238, 1998.