



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ENVOLVIMENTO DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO NO TRATAMENTO E NA PATOGENIA DA  
HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Clarissa Amorim Silva de Cordova

Departamento de Ciências Fisiológicas – Biofísica – CCB/UFSC

Fevereiro/2001



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ENVOLVIMENTO DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO NO TRATAMENTO E NA PATOGENIA DA  
HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de  
Mestre em Neurociências

Orientadora: Profª. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Clarissa Amorim Silva de Cordova

Departamento de Ciências Fisiológicas – Biofísica – CCB/UFSC

Fevereiro/2001

**“ENVOLVIMENTO DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO NO TRATAMENTO E NA PATOGENIA  
DA HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA”**

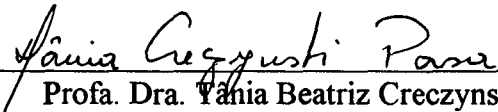
**CLARISSA AMORIM SILVA DE CORDOVA**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

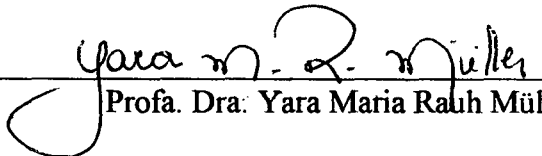
**MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS**

na Área de Neurofisiologia e Comportamento aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

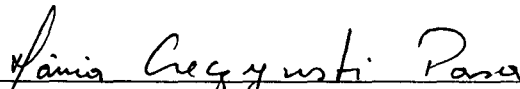
Orientadora

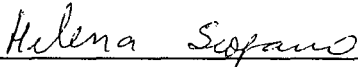
  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa

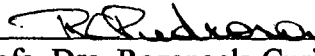
Coordenadora do Curso

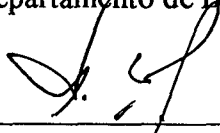
  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Yara Maria Rauh Müller

Banca examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa (Presidente)  
Departamento de Ciências Fisiológicas – CCB – UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Helena Maria Scofano  
Departamento de Bioquímica Médica – ICB – UFRJ

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa  
Departamento de Bioquímica – CCB – UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho (Suplente)  
Departamento de Ecologia e Zoologia – CCB – UFSC

## AGRADECIMENTOS

À Tânia Beatriz Creczynski Pasa, pela sua orientação, amizade e exemplo de dedicação. E, principalmente por ter me apresentado para a pesquisa, sendo a pessoa mais importante para o início da minha vida científica.

À Rozangela Curi Pedrosa e Danilo Wilhelm Filho, pelo empréstimo dos laboratórios e equipamentos, pelo tempo dedicado para discussões e acima de tudo pela amizade e por terem sido, praticamente meus co-orientadores neste trabalho.

À Carla Cristina Thober Charão, pela produção da *Escherichia coli* e pela amizade.

Ao Prof. Dr. João Batista Calixto, do Departamento de Farmacologia/CCB/UFSC, por ter cedido o seu laboratório e equipamentos para que uma parte deste trabalho fosse realizada.

Ao grupo do Prof. Dr. Rozendo Yunes, do Departamento de Química/CFM/UFSC, pelo fornecimento da fração butanólica da *Calendula officinalis*.

Ao Prof. Dr. Celso Pilati, do Departamento de Clínica e Patologia/CAV/UDESC, pelo auxílio na avaliação histológica realizada neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia/CCB/UFSC, pelo empréstimo do equipamento para realização das fotos das lâminas histológicas.

Às professoras Fátima Regina Mena Barreto Silva e Regina Vasconcellos Antônio, pelo companheirismo.

Aos professores da Pós-Graduação em Neurociências pelo apoio e dedicação nos cursos ministrados.

Ao Nivaldo, secretário da Pós Graduação em Neurociências, pela sua dedicação aos alunos.

À CAPES, pela bolsa que financiou pelo menos parte do período do curso.

Ao Biotério Central da UFSC, pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho.

A todos os colegas dos laboratórios da Rozangela, do Danilo e da Fátima pela boa convivência e companheirismo: Andreza, Claudriana, Michele, Luciana, Fabíola, Vilma, Luís Flávio, Irma, Jean, Reginaldo, Ariane, Sabrina e Karine. E especialmente, aos colegas do nosso laboratório: Marcos Paulo, Juliano, Marco, Patrícia, Ramon, Jair, Heloísa e Gustavo.

Aos funcionários da Biofísica Dona Glória e Zeca, pelo apoio no laboratório.

À minha família que sempre me deu apoio e incentivo: Pai, Mãe, Fernando e Juliana.

Ao meu marido Fabiano, pelo amor e paciência.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE QUADROS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xi
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
1- INTRODUÇÃO .....	1
1.1- ÓXIDO NÍTRICO .....	1
1.1.1- Histórico .....	1
1.1.2- Propriedades .....	2
1.1.3- Biossíntese .....	3
1.1.4- Funções .....	6
1.1.5- Óxido Nítrico como Neurotransmissor .....	7
1.1.5.1- <i>Óxido Nítrico no Sistema Nervoso Periférico</i> .....	8
1.1.5.2- <i>Óxido Nítrico no Sistema Nervoso Central (Cérebro)</i> .....	8
1.1.6- Papel para o Óxido Nítrico na Função Prostática .....	9
1.2- DEFESAS ANTIOXIDANTES .....	10
1.3- PRÓSTATA .....	12
1.4- HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA .....	13
1.4.1- Definição .....	13
1.4.2- Etiologia .....	14
1.4.3- Sintomas .....	16
1.4.4- Tratamento .....	16
1.5- RELAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO COM A HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA .....	19

1.6- RELAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO COM A PRÓSTATA.....	20
1.7- CALENDULA OFFICINALIS.....	21
2- OBJETIVOS.....	24
2.1- OBJETIVO GERAL.....	24
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1- ANIMAIS.....	25
3.2- MATERIAIS.....	25
3.2.1- Reagentes.....	25
3.2.1.1- <i>Reagentes da Sigma®</i> .....	26
3.2.1.2- <i>Reagentes da Merck®</i> .....	27
3.2.1.3- <i>Reagentes de outras marcas</i> .....	28
3.2.2- Medicamentos.....	28
3.2.3- Fração butanólica da <i>Calendula officinalis</i> .....	29
3.2.4- Equipamentos.....	29
3.3- MODELO EXPERIMENTAL.....	30
3.4- AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MICÇÃO NO MODELO EXPERIMENTAL.....	33
3.5- COLETA DAS AMOSTRAS.....	33
3.6- PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	34
3.6.1- Soro Sanguíneo.....	34
3.6.2- Fígado.....	34
3.6.2.1- <i>Homogenato</i> .....	34
3.6.2.2- <i>Extrato Ácido</i> .....	35
3.6.3- Próstata.....	35
3.6.4- Cerebelo.....	36
3.7- DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO.....	36
3.8- DOSAGEM DA ATIVIDADE DA NO SINTASE.....	37
3.9- AVALIAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO TECIDUAL.....	38
3.10- ANÁLISE DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS.....	38
3.10.1- Atividade da Catalase.....	38
3.10.2- Atividade da Glutathione Redutase (GR).....	39
3.10.3- Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx).....	40

3.10.4- Atividade da Glutathione S-transferase (GST).....	41
3.11- ANÁLISE DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO-ENZIMÁTICAS .....	41
3.11.1- Glutathione Reduzida (GSH).....	41
3.12- DOSAGEM DE PROTEÍNA.....	42
3.13- PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS PARA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	43
3.14- ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	44
4- RESULTADOS .....	45
4.1- ANÁLISE DO MODELO EXPERIMENTAL.....	46
4.1.1- Aspecto Macroscópico da Próstata .....	46
4.1.2- Histologia.....	48
4.1.3- Avaliação dos Parâmetros de Micção .....	51
4.2- PESO DO RATO E DA PRÓSTATA E NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO NO SORO .....	53
4.2.1- Tratamento de 15 dias .....	54
4.2.2- Tratamento de 30 dias .....	56
4.3- ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES NO FÍGADO.....	59
4.3.1- Peroxidação Lipídica.....	60
4.3.2- Defesa Antioxidante Não-Enzimática.....	60
4.3.3- Defesas Antioxidantes Enzimáticas .....	61
4.4- ATIVIDADE DA NOS NO CEREBELO .....	63
DISCUSSÃO .....	65
CONCLUSÕES .....	71
PERSPECTIVAS.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74
ANEXOS.....	83



## LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Peso da próstata de ratos normais, falso castrados e tratados com óleo vegetal, e de ratos castrados e tratados com 0,4 mg/rato de testosterona por 3, 7, 15 e 30 dias.....	47
Figura 02- Aspecto macroscópico da próstata de um rato normal (N) e de um rato considerado com hipertrofia prostática (HP) neste modelo. ....	48
Figura 03- Aspecto microscópico da próstata dos ratos normais e com hipertrofia prostática utilizados neste modelo. ....	49
Figura 04- Diâmetro das glândulas prostáticas de um rato normal e um rato considerado com hipertrofia prostática neste modelo. ....	50
Figura 05- Percentual ocupado pelas glândulas prostáticas em cortes histológicos da próstata de um rato normal e um rato considerado com hipertrofia prostática neste modelo. ....	50
Figura 06- Volume de urina eliminada em 24 horas por ratos normais, falso castrados e tratados com óleo vegetal, e por ratos castrados e tratados com 0,4 mg/rato de testosterona por 3, 7, 15 e 30 dias (n=6).....	52
Figura 07- Número de micções por hora realizadas por ratos normais, falso castrados e tratados com óleo vegetal, e por ratos castrados e tratados com 0,4 mg/rato de testosterona por 3, 7, 15 e 30 dias (n=6).....	52
Figura 08- Volume de urina por micção em ratos normais, falso castrados e tratados com óleo vegetal, e em ratos castrados e tratados com testosterona por 30 dias (n=6).....	53
Figura 09- Peso dos ratos normais (N) e com hipertrofia prostática submetidos a 15 dias de tratamento com óleo vegetal (HP), Permixon® (P) e finasterida (F). ....	55
Figura 10- Peso da próstata (g) por 100 g de peso do animal em ratos normais (N) e com hipertrofia prostática submetidos a 15 dias de tratamento com óleo vegetal (HP), Permixon® (P) e finasterida (F). ....	55

Figura 11- Níveis de óxido nítrico no soro de ratos normais (N) e com hipertrofia prostática submetidos a 15 dias de tratamento com óleo vegetal (HP), Permixon® (P) e finasterida (F).....	56
Figura 12- Peso dos ratos normais tratados com óleo vegetal (N) ou Isordil® (N+Iso) e com hipertrofia prostática submetidos a 30 dias de tratamento com óleo vegetal (HP), Permixon® (P), finasterida (F), fração butanólica da <i>Calendula officinalis</i> (F.B.), L-NOARG (I), associação do L-NOARG com a fração butanólica (I+F.B.) ou com o Permixon® (I+P), e com o Isordil® (Iso).....	58
Figura 13- Peso da próstata calculado por 100 g de peso do animal em ratos normais tratados com óleo vegetal (N) ou Isordil® (N+Iso) e com hipertrofia prostática submetidos a 30 dias de tratamento com óleo vegetal (HP), Permixon® (P), finasterida (F), fração butanólica da <i>Calendula officinalis</i> (F.B.), L-NOARG (I), associação do L-NOARG com a fração butanólica (I+F.B.) ou com o Permixon® (I+P), e com o Isordil® (Iso).....	58
Figura 14- Níveis de óxido nítrico no soro de ratos normais tratados com óleo vegetal (N) ou Isordil® (N+Iso) e com hipertrofia prostática submetidos a 30 dias de tratamento com óleo vegetal (HP), Permixon® (P), finasterida (F), fração butanólica da <i>Calendula officinalis</i> (F.B.), L-NOARG (I), associação do L-NOARG com a fração butanólica (I+F.B.) ou com o Permixon® (I+P), e com o Isordil® (Iso).....	59
Figura 15- Análise comparativa do dano celular no fígado de ratos normais (N) e ratos com hipertrofia prostática (HP).....	60
Figura 16- Concentração de GSH em extrato ácido de fígado de ratos normais (N) e ratos com hipertrofia prostática (HP).....	61
Figura 17- Atividade da Catalase em homogenatos de fígado de ratos normais (N) e ratos com hipertrofia prostática (HP).....	62
Figura 18- Atividade da Glutaciona Peroxidase em homogenatos de fígado de ratos normais (N) e ratos com hipertrofia prostática (HP).....	62
Figura 19- Atividade da Glutaciona Redutase em homogenatos de fígado de ratos normais (N) e ratos com hipertrofia prostática (HP).....	63
Figura 20- Atividade da Glutaciona S-transferase em homogenatos de fígado de ratos normais (N) e ratos com hipertrofia prostática (HP).....	63
Figura 21- Atividade da nNOS em homogenatos de cerebelo de ratos normais (N) e ratos com hipertrofia prostática (HP).....	64
Figura 22- Atividade da iNOS em homogenatos de cerebelo de ratos normais (N) e ratos com hipertrofia prostática (HP).....	64

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 01- Inibidores da NOS. ....	6
Quadro 02- Presença de evidência anatômica ou microscópica da HPB de acordo com a idade.....	14
Quadro 03- Doses utilizadas nos tratamentos.....	31
Quadro 04- Grupos e protocolos experimentais.....	32
Quadro 05- Abreviaturas utilizadas nos gráficos. ....	46
Quadro 06- Peso da próstata (g) por 100g de peso em ratos normais e em rato castrados e tratados com testosterona por 3, 7, 15 e 30 dias. ....	47
Quadro 07- Resumo dos dados obtidos nos experimentos para avaliação dos parâmetros de micção no modelo experimental. ....	51
Quadro 08- Resumo dos dados obtidos após 15 dias de tratamento referentes ao peso corporal, peso da próstata e níveis de óxido nítrico no soro. ....	54
Quadro 09- Resumo dos dados obtidos após 30 dias de tratamento referentes ao peso corporal, peso da próstata e níveis de óxido nítrico no soro. ....	57
Quadro 10- Resumo dos dados obtidos na determinação da atividade das enzimas catalase, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase e glutathiona S-transferase em ratos normais e em ratos com hipertrofia prostática. ....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

1. **•OH**: radical hidroxil
2. **7-NI**: 7-nitroindazole
3. **AVC**: acidente vascular cerebral
4. **CAT**: catalase
5. **CDNB**: 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
6. **CO<sub>2</sub>**: dióxido de carbono
7. **DHT**: dihidrotestosterona
8. **DNA**: ácido desoxiribonucléico
9. **DPTA**: ácido dietilenotriaminopentacético
10. **EDTA**: ácido etileno-dinitrilo-tetracético
11. **EGTA**: ácido etilenoglicol-tetracético
12. **eNOS**: óxido nítrico sintase endotelial
13. **ERO**: espécie reativa de oxigênio
14. **FAD**: flavina adenina dinucleotídeo
15. **FMN**: flavina mononucleotídeo
16. **GMPc**: guanosina monofosfato cíclico
17. **GPx**: glutationa peroxidase
18. **GR**: glutationa redutase
19. **GSH**: glutationa reduzida
20. **GSSG**: glutationa oxidada
21. **GSTs**: glutationas S-transferases
22. **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: peróxido de hidrogênio
23. **HP**: hipertrofia prostática
24. **HPB**: hiperplasia prostática benigna
25. **IM**: intramuscular

26. **iNOS**: óxido nítrico sintase induzida
27. **IP**: intraperitonal
28. **LHRH**: hormônio liberador do hormônio luteinizante
29. **L-NA**: N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina
30. **L-NAA**: N<sup>G</sup>-amino-L-arginina
31. **L-NAME**: N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil ester
32. **L-NIO**: N<sup>G</sup>-iminoetil-L-ornitina
33. **L-NMA**: N<sup>G</sup>-metil-L-arginina
34. **L-NMMA**: N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina
35. **L-NNA**: N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina
36. **L-NOARG**: N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginina
37. **NADPH**: nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida
38. **NANC**: não-adrenérgica-não-colinérgica
39. **NMDA**: N-metil- D- aspartato
40. **nNOS**: óxido nítrico sintase neuronal
41. **NO**: óxido nítrico
42. **NO<sub>2</sub><sup>-</sup>**: nitrito
43. **NO<sub>3</sub><sup>-</sup>**: nitrato
44. **NOS**: óxido nítrico sintase
45. **O<sub>2</sub>**: oxigênio molecular
46. **O<sub>2</sub><sup>•-</sup>**: radical ânion superóxido
47. **ONOO<sup>-</sup>**: peroxinitrito
48. **PKC**: proteína quinase C
49. **PSA**: antígeno prostático específico
50. **SOD**: superóxido dismutase
51. **TBH<sub>4</sub>**: tetrahydrobiopterina
52. **t-BuOOH**: ter-butilhidroperóxido
53. **TH**: tirosina hidroxilase
54. **TNB**: ânion tiolato
55. **TUIP**: incisão transuretral da próstata
56. **TURP**: ressecção transuretral da próstata
57. **VO**: via oral

**RESUMO****ENVOLVIMENTO DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO NO TRATAMENTO E NA PATOGENIA  
DA HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA**

O óxido nítrico (NO) exerce uma variedade de funções nos mais diversos sistemas biológicos, atuando como vasodilatador no controle do fluxo sanguíneo e da pressão arterial, como modulador da resposta inflamatória, e como mediador da neurotransmissão não-adrenérgica-não-colinérgica. O envolvimento do NO na ereção do pênis através de sua ação vasodilatadora e de relaxamento do corpo cavernoso já foi demonstrado. O NO produzido pela nNOS também parece estar envolvido no relaxamento da musculatura lisa da uretra, bexiga e próstata, responsável pela micção e ejaculação do fluido seminal. Estas evidências do envolvimento do NO na função prostática nos levou a estudar o envolvimento deste na Hiperplasia Prostática Benigna (HPB). A HPB caracteriza-se por um crescimento lento e progressivo das estruturas fibromuscular e epitelial dentro da glândula prostática, ocorrendo em cerca de 50% dos homens acima de 50 anos. A etiologia desta patologia ainda não está bem definida e diversos fatores podem estar envolvidos. Os andrógenos testiculares e os estrogênios parecem ter papel primordial. Dois componentes são identificados na sintomatologia obstrutiva da HPB, um mecânico e um dinâmico. O componente mecânico consiste no crescimento do tecido glandular, e o dinâmico está relacionado ao aumento do tônus da musculatura lisa da próstata e uretra, estimulada pelos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos e onde o NO pode exercer um papel regulatório. Atualmente, na terapia médica, os principais tratamentos consistem na finasterida, um inibidor da 5 $\alpha$ -redutase e no Permixon®, um extrato lipidoesterólico da planta *Serenoa repens*, cujo mecanismo de ação ainda não está bem esclarecido. Este trabalho buscou relacionar o envolvimento do NO na patogenia e nos efeitos dos tratamentos para a HPB. Para isso foi utilizado um modelo de hipertrofia prostática (HP) em ratos, os quais foram tratados com finasterida, Permixon®, fração butanólica da *Calendula officinalis*, um inibidor da óxido nítrico sintase (L-NOARG), e um doador de

nitratos (Isordil®). Não foi observada nenhuma diferença significativa na dosagem de NO no soro dos animais nos tratamentos por 15 dias. No entanto, após 30 dias de tratamento, ocorreu uma redução nestes níveis nos animais com HP. Os extratos de plantas utilizados neste trabalho, extrato lipidoesterólico da *Serenoa repens* e fração butanólica da *Calendula officinalis*, aumentaram a concentração de NO no soro dos animais para níveis próximos ou superiores aos dos animais normais, e este efeito foi abolido pela administração concomitante de um inibidor da óxido nítrico sintase (L-NOARG). A finasterida não provocou alteração nos níveis de NO. A diminuição nos níveis de NO na próstata com HPB pode influenciar os sintomas obstrutivos no homem, resultantes de uma exacerbação dos efeitos  $\alpha$ -adrenérgicos sobre a contração da musculatura lisa prostática. O efeito do Permixon®, aumentando os níveis de NO, pode representar um dos mecanismos de ação deste medicamento na melhora dos sintomas clínicos associados à HPB. Ficou caracterizada uma condição de estresse oxidativo vinculada à hipertrofia prostática, através dos níveis diminuídos de três enzimas antioxidantes concomitante ao aumento do dano celular (níveis de TBARS) no fígado de ratos. Fitoterápicos com propriedades antioxidantes poderão ser utilizados para o atenuamento desta condição vinculada à hipertrofia prostática. Neste mesmo sentido, a fração butanólica da *Calendula officinalis* pode ser apontada como um medicamento alternativo para ser utilizado no tratamento dos sintomas desta patologia.

## ABSTRACT

### INVOLVEMENT OF NITRIC OXIDE IN THE PATHOLOGY AND THERAPY OF BENIGN PROSTATE HYPERPLASIA

Nitric oxide (NO) is an important messenger molecule and exerts many functions in a variety of biological systems. The involvement of nitric oxide in penis erection through its relaxant activity on blood vessels and smooth muscle has been demonstrated. The nitric oxide produced by nNOS seems to be involved in smooth muscle relaxation in the urethra, bladder and prostate. This evidence for a role for nitric oxide in prostate function led us to study the involvement of this molecule in benign prostate hyperplasia (BPH). BPH is characterised by a slow and progressive growth of the prostate gland fibromuscular and epithelial structures occurring in 50% of men above 50 of age. The aetiology of BPH is still undefined and diverse factors may be involved. The testicular androgens seem to have primary importance. Two components are identified in the symptoms of BPH, one mechanical and the other dynamic. The mechanical component results from overgrowth of the glandular tissue and the dynamic component is related to an increase in prostate and urethra smooth muscle tonus mediated by the  $\alpha$ 1-adrenergic receptor. Nitric oxide can exert a regulatory role on the  $\alpha$ 1-adrenergic receptor. Finasteride, an inhibitor of  $5\alpha$ -reductase, is the main drug used in medical therapy. A second drug in current use is Permixon, a lipidosterolic extract of the *Serenoa repens* plant, whose mechanism of action is still unclear. This work describes the involvement of nitric oxide in the pathology and therapy of BPH. A rat model of prostate hypertrophy (HP) was used. Treatments were finasteride, Permixon®, butanolic fraction of the *Calendula officinalis* plant and an inhibitor of nitric oxide synthase (L-NOARG). No significant differences in the nitric oxide levels were observed after 15 days of treatment. However, after 30 days, a reduction in these levels occurred in the animals with HP. The plants extracts used in this work, *S. repens* lipidosterolic extract and butanolic fraction of *C. officinalis*, increased serum nitric oxide levels. Nitric oxide levels in these animals were higher than those found in control animals and this effect was abolished by the concomitant administration of an NOS inhibitor (L-NOARG). Finasteride did not alter NO levels. A reduction in nitric oxide levels in the prostate with BPH can influence the obstructive symptoms in man. This results from increased stimulation of  $\alpha$ 1-adrenergic receptors leading to smooth muscle contraction. Increased nitric oxide levels may underlye the mechanism of action of Permixon® and, thus, lead to an improvement in BPH clinical symptoms. The increased TBARS levels associated with the decreases observed in three antioxidant enzymes (GR, GPx and GST) in rat livers with BPH, suggest an oxidative stress condition related to this pathology. Antioxidants, such as flavonoids present in many plants, could be useful to counteract the oxidative stress derived from BPH. The butanolic fraction of *C. officinalis*, may be a useful alternative for the treatment of BPH symptoms.



## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1- ÓXIDO NÍTRICO

#### 1.1.1- Histórico

A evidência inicial da presença de óxidos de nitrogênio no metabolismo surgiu a partir de experimentos que mostraram a produção de nitratos em ratos (GREEN, TANNENBAUM & GOLDMANN, 1981).

Em 1985, STUEHR & MARLETTA observaram que macrófagos de camundongos ativados por lipopolissacarídeos bacterianos (*Escherichia coli*) levavam à produção de nitritos e nitratos. Alguns anos após, foi demonstrado que a L- arginina era o substrato para a formação de nitrato e nitrito por macrófagos ativados por lipopolissacarídeos bacterianos, e que a L-citrulina era formada como co-produto (HIBBS, TAINOR & VAVRIN, 1987). Na seqüência, MARLETTA *et al.* (1988), mostraram que o óxido nítrico era um intermediário nesta reação de oxidação da L-arginina resultando em nitrito, nitrato e L-citrulina. Simultaneamente, FURCHGOTT *et al.* (1984) investigavam um fator de relaxamento associado ao endotélio vascular, e 3 anos mais tarde foi demonstrado que este fator era o óxido nítrico (NO) (IGNARRO *et al.*, 1987).

A partir destas observações, cresceu o interesse da comunidade científica por esta molécula, sendo demonstradas inúmeras funções para o óxido nítrico nos mais diversos sistemas biológicos.

Em 1992, o óxido nítrico foi escolhido como a “Molécula do Ano” pelos editores da revista *Science* (CULOTTA & KOSHLAND, 1992) e, no ano seguinte, considerada a “nova estrela surpreendente da bioquímica” pela revista *Chemical and Engineering News* (FELDMAN, GRIFFITH & STUEHR, 1993).

### 1.1.2- Propriedades

O óxido nítrico (NO) contém um número ímpar de elétrons e, por este motivo, é considerado um radical livre. Na temperatura ambiente, é um gás incolor e com pouca hidrossolubilidade. Pode atravessar as membranas biológicas por difusão simples, assim como o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) e o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Reage rapidamente com o O<sub>2</sub>, sendo inativado, formando nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), e durante este processo podem ocorrer diversas reações resultando na formação de espécies reativas de nitrogênio (ERN). Aerobicamente, o NO reage com o O<sub>2</sub> formando dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>) (Equação 1). A reação do NO<sub>2</sub> com o NO ou com outra molécula de NO<sub>2</sub> resulta na formação do trióxido de dinitrogênio (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e tetroxido de dinitrogênio (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) (Equações 2 e 3) (BLOODSWORTH, O'DONNELL & FREEMAN, 2000).



O NO reage também com outro radical livre endógeno, o superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), formando um intermediário altamente reativo, porém não constituindo um radical, que é o peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ) (Equação 4) (CLARKE & GAUL, 1993).

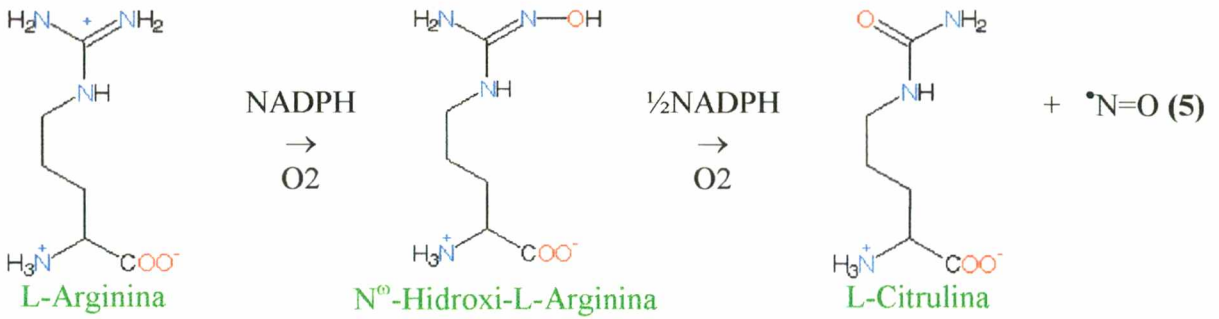


O NO origina um produto quimioluminescente a partir da reação com o ozônio e catalisa a diazotização do ácido sulfanílico em pH ácido. Estas duas reações podem ser utilizadas para detectar o NO. Além disso, hemoproteínas, tais como hemoglobina, mioglobina, citocromo C e guanilatos ciclases, reagem rapidamente com o NO, formando compostos nitrosilados. (KERVIN & HELLER, 1994).

### 1.1.3- Biosíntese

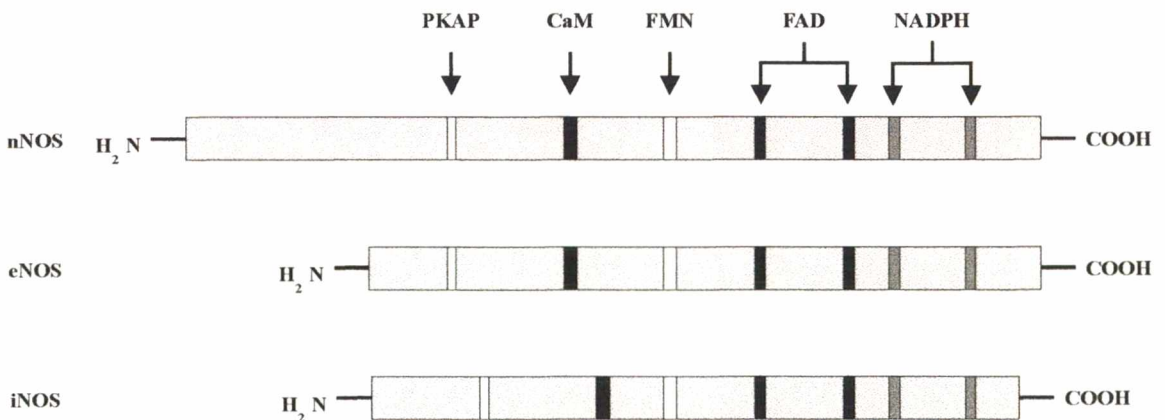
A síntese do óxido nítrico ocorre a partir da arginina e do  $O_2$  pela ação da óxido nítrico sintase (NOS), e requer a presença de alguns co-fatores como nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (NADPH), flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e tetrahydrobiopterina ( $TBH_4$ ) (KNOWLES & MONCADA, 1994).

O primeiro passo na reação de formação do óxido nítrico (NO) é a hidroxilação da L-arginina para formar N-hidroxi-L-arginina através da oxidação direta de 1 mol de NADPH pela NOS. O segundo passo é a formação de NO e L-citrulina a partir da N-hidroxi-L-arginina pela oxidação de 0,5 mol de NADPH e  $TBH_4$  (Equação 5) (AOKI, TAKEUCHI & SHOJI, 1995).



São conhecidas duas isoformas de NOS constitutivas e uma isoforma que é induzida por estímulo inflamatório. Entre as constitutivas, existe uma presente no endotélio dos vasos sanguíneos, chamada de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) ou tipo III, e outra presente no cérebro, medula espinhal e sistema nervoso periférico, chamada de óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) ou tipo I. Já a enzima que é induzida por estímulo inflamatório, é chamada de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) ou tipo II (MONCADA, HIGGS & FURCHGOTT, 1997).

As três isoformas da enzima NOS apresentam os sítios de ligação para o grupo heme, TBH<sub>4</sub>, FMN e FAD e interagem com a calmodulina. As seqüências de aminoácidos apresentam muitas semelhanças, o que explica a similaridade na função catalítica e a necessidade de cofatores (ver esquema abaixo<sup>1</sup>) (LOWE *et al.*, 1996).



<sup>1</sup> Adaptado de KNOWLES & MONCADA (1994)

As enzimas apresentam 3 regiões principais: a região C-terminal, que contém os sítios de ligação para FAD, FMN e NADPH, um sítio central de ligação à calmodulina, e uma região N-terminal com os sítios de ligação para o grupo heme, TBH<sub>4</sub> e a arginina. A região C-terminal é semelhante a P-450 redutase, enquanto que a região N-terminal é análoga ao citocromo P-450 (LOWE *et al.*, 1996).

A atividade das duas isoformas constitutivas, eNOS e nNOS, de uma forma geral, é dependente de cálcio e calmodulina (MAYER & ANDREW, 1998), enquanto que a atividade da iNOS geralmente é dependente de calmodulina e independente de cálcio. Desta forma, a iNOS, quando induzida, permanece mais tempo ativa produzindo maiores quantidades de NO que as enzimas constitutivas (AOKI, TAKEUCHI & SHOJI, 1995).

A nNOS está expressa principalmente no sistema nervoso central e periférico, porém também está presente em outros tecidos, tais como, músculo esquelético, mácula densa e placenta (MAYER & ANDREW, 1998). No cérebro, é ativada por um influxo de cálcio a partir da ligação do glutamato ao seu receptor do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (KISS, 2000). A eNOS é encontrada principalmente nas células endoteliais vasculares e é ativada por estímulos hormonais ou físicos. O NO produzido por esta isoforma provoca o relaxamento da musculatura dos vasos sanguíneos e inibe a adesão e agregação plaquetária (MAYER & ANDREW, 1998). A iNOS é induzida por condições inflamatórias, principalmente devido à presença de endotoxinas e citocinas (AOKI, TAKEUCHI & SHOJI, 1995).

A síntese do óxido nítrico pode ser inibida pelo uso de inibidores das NOS e uma variedade de compostos estão disponíveis para serem utilizados como instrumento para estudar as funções do óxido nítrico. A maioria destes compostos não apresenta seletividade entre as isoformas, mas atualmente alguns têm sido demonstrados apresentando alguma

seletividade, e isto pode facilitar os estudos quanto às funções do óxido nítrico produzido por diferentes isoformas de NOS (MAYER & ANDREW, 1998).

São exemplos de inibidores da NOS: N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG, L-NA ou L-NNA), N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA), N<sup>G</sup>-hidroxi-L-arginina, N<sup>G</sup>-amino-L-arginina (L-NAA), N<sup>G</sup>-iminoetil-L-ornitina (L-NIO), N<sup>G</sup>-metil-L-arginina (L-NMA), 7-nitroindazole (7-NI), derivados das isotiuréias e aminoguanidinas (MURAD, 1994; MONCADA, HIGGS & FURCHGOTT, 1997; KISS, 2000). O 7-NI e os derivados das tiouréias apresentam seletividade pela nNOS e as aminoguanidinas são seletivas para iNOS (MAYER & ANDREW, 1998). Os demais inibidores citados anteriormente não têm seletividade por alguma das isoformas, mas apresentam potência inibitória variável, dependendo da isoforma da enzima, conforme demonstrado abaixo no quadro 01 (MONCADA, HIGGS & FURCHGOTT, 1997).

**Quadro 01-Inibidores da NOS.**

<b>Composto</b>	<b>Abreviação</b>	<b>Potência inibitória</b>
N <sup>G</sup> -monometil-L-arginina	L-NMMA	nNOS = eNOS > iNOS
N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina	L-NOARG	nNOS = eNOS >> iNOS
N <sup>G</sup> -amino-L-arginina	L-NAA	nNOS = iNOS > eNOS
N <sup>G</sup> -iminoetil-L-ornitina	L-NIO	iNOS > eNOS = nNOS

#### 1.1.4- Funções

O óxido nítrico é uma molécula mensageira que exerce uma variedade de funções nos mais diversos sistemas biológicos. Entre as funções postuladas ao óxido nítrico podem ser citadas: o controle do fluxo sanguíneo e da pressão arterial, através de sua ação

vasodilatadora, a modulação da resposta inflamatória no sistema imunológico, e a neurotransmissão no sistema nervoso central e periférico (AOKI, TAKEUCHI & SHOJI, 1995).

### **1.1.5- Óxido Nítrico como Neurotransmissor**

Os neurotransmissores clássicos são pequenas moléculas orgânicas que conduzem uma informação química de uma célula nervosa para outra. Estes neurotransmissores podem ser aminas biogênicas, acetilcolina, aminoácidos ou pequenas proteínas (peptídeos). Inibem ou estimulam as funções da célula-alvo através de uma interação com receptores, causando uma alteração bioquímica na membrana, citoplasma ou núcleo, caracterizando a neurotransmissão (SUNDBERG, 1995).

O óxido nítrico, apesar de funcionar muitas vezes como um neurotransmissor, não se assemelha e nem atua como qualquer outro neurotransmissor conhecido. Não é armazenado em vesículas especiais e nem apresenta mecanismos especiais de liberação, sendo produzido no local e no momento em que é necessário. Além disso, não necessita de receptores específicos para penetrar na célula, sendo capaz de difundir-se livremente até o seu sítio de ação (RANG, DALE & RITTER, 1997).

O óxido nítrico foi caracterizado como neurotransmissor no sistema nervoso central e periférico (GARTHWAITE, CHARLES & CHESS-WILLIANS, 1988; BREDT, HWANG & SNYDER, 1990; HOPE *et al.*, 1991; ADDICKS, BLOCH & FEELISCH, 1994).

#### **1.1.5.1- Óxido Nítrico no Sistema Nervoso Periférico**

A acetilcolina e a noradrenalina são os dois neurotransmissores principais do sistema nervoso periférico. Estes neurotransmissores atuam como mensageiros nas junções nervosas e neuromusculares. Porém, alguns nervos periféricos não utilizam a acetilcolina nem a noradrenalina como neurotransmissores, e recebem a denominação de não-adrenérgicos-não-colinérgicos (NANC). Estudos indicam o óxido nítrico como um mediador da neurotransmissão NANC (JEN *et al.*, 1996; HEDLUND *et al.*, 1996). JEN *et al.* (1996) realizaram um estudo, através de imunohistoquímica, em que examinaram a distribuição da NOS e da tirosina hidroxilase (TH), enzima responsável pela síntese de catecolaminas, em fibras nervosas do trato urogenital masculino em recém-nascidos humanos. Naquele estudo, observaram que, tanto os nervos noradrenérgicos quanto os não-noradrenérgicos, têm a capacidade de produzir NO, concluindo que o NO pode funcionar como um modulador dos efeitos catecolaminérgicos no trato urogenital masculino de recém-nascidos.

#### **1.1.5.2- Óxido Nítrico no Sistema Nervoso Central (Cérebro)**

No cérebro a produção neuronal do óxido nítrico inicia quando o neurônio pré-sináptico libera um mensageiro químico, o glutamato, que se difunde pelo espaço sináptico e se liga ao seu receptor específico do tipo NMDA no neurônio pós-sináptico. A ligação do glutamato ao receptor NMDA provoca a abertura de canais no neurônio pós-sináptico e a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , o qual se liga à calmodulina, formando um complexo que vai, por sua vez, ligar-se à NOS presente nas células nervosas (nNOS). A ligação do complexo na enzima promove a ativação desta e, conseqüentemente, a produção de NO, a partir da L-arginina. O



óxido nítrico pode, então, deixar a célula nervosa por difusão através da membrana (KRUKOFF, 1999).

Alguns estudos sugerem que o NO pode atuar como um mensageiro retrógrado, difundindo-se do neurônio pós-sináptico e retornando ao neurônio pré-sináptico, onde ativa a enzima guanilato ciclase. Esta enzima catalisa a reação de produção do GMPc (guanosina monofosfato cíclico) a qual vai desencadear o processo resultante na liberação do glutamato, reiniciando o ciclo. Este processo cíclico vai fortalecer o contato sináptico contribuindo para o processo de aprendizado e formação de memória a longo prazo (BÖHME *et al.*, 1991;1993).

A destruição neuronal em decorrência de um acidente vascular cerebral (AVC) ocorre devido a uma liberação excessiva de glutamato, que, através de sua ação sobre os receptores NMDA, proporciona a produção de grande quantidade de NO, resultando na morte neuronal. Foi proposto que a morte neuronal neste caso ocorreria em virtude da reação do NO com o radical superóxido para formar o peroxinitrito, funcionando como um agente neurotóxico (QUEIROZ & BATISTA, 1999).

### **1.1.6- Papel para o Óxido Nítrico na Função Prostática**

Existem evidências imunohistoquímicas para a presença de uma NOS dependente de cálcio na glândula prostática humana e do rato (BURNETT *et al.*, 1995). ADDICKS *et al.* (1996) demonstraram a presença de uma extensa rede de nervos nitrérgicos associada aos vasos sanguíneos, células musculares lisas e células secretórias na próstata humana, indicando o envolvimento do óxido nítrico na regulação do fluxo sanguíneo, no tônus do músculo liso, na liberação de neurotransmissores, e na função secretória. Além disso, a atividade da NOS através da conversão da arginina em citrulina, foi demonstrada na glândula prostática de rato,

porco e coelho, sugerindo um papel para o óxido nítrico na função prostática nestas espécies (DI IULIO, LI & RAND, 1997).

A participação do óxido nítrico na ereção do pênis através de sua ação vasodilatadora e de relaxamento do corpo cavernoso já foi demonstrada (BURNETT *et al.*, 1992). Além disso, o NO produzido pela nNOS também parece estar envolvido no relaxamento da musculatura lisa da uretra, bexiga e próstata (MAGEE *et al.*, 1996; HEDLUND *et al.*, 1996; JEN *et al.*, 1996).

Estas evidências acumuladas, nas quais o NO atua na função prostática, conduziu o presente estudo do seu envolvimento na hiperplasia prostática benigna.

## 1.2- DEFESAS ANTIOXIDANTES

O oxigênio é o elemento mais abundante da crosta terrestre e sua principal fonte, como forma molecular gasosa, consiste no processo biossintético através das algas marinhas (GILBERT, 1981). A evolução dos organismos que utilizam o O<sub>2</sub> como um acceptor terminal de elétrons durante o processo respiratório constitui-se num paradoxo, pois, se por um lado o metabolismo aeróbico fornece alta energia, por outro a redução do O<sub>2</sub> até água pode levar à formação de espécies intermediárias altamente reativas e danosas ao organismo, chamadas espécies reativas de oxigênio (ERO) ou radicais livres de oxigênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Os radicais livres de oxigênio são definidos como espécies reativas capazes de independência própria e que contém um ou mais elétrons não pareados no seu último orbital. Eles são formados através da redução parcial do oxigênio até água, que ocorre através de

sucessivas reações univalentes. A transferência de um elétron para o  $O_2$  produz o primeiro intermediário reativo, o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) que sofre dismutação espontânea a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Qualquer reação posterior requer a quebra das ligações entre os átomos de  $O_2$  para formar radical hidroxil ( $^{\bullet}OH$ ), que pode ser catalisada por metais de transição (Reação de Fenton) ou pela combinação do  $O_2^{\bullet-}$  com o  $H_2O_2$  (Reação de Haber-Weiss) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Outras formas de oxiradicaís também estão envolvidas no dano celular, e, mais recentemente, o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), derivado da reação entre  $O_2^{\bullet-}$  e o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), ficou igualmente caracterizado por sua ação deletéria, apesar de não se tratar de uma ERO, e sim de uma espécie altamente reativa de nitrogênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A extensão e o tipo de dano causado pelos oxiradicaís dependem tanto da quantidade, como da qualidade ou natureza dos mesmos a que as células estão expostas, da zona celular em que são formados, bem como das defesas antioxidantes das células (FRAGA *et al.*, 1987; DAVIES, 1991).

O desequilíbrio entre os mecanismos que causam as condições oxidativas e as defesas antioxidantes celulares presentes nos organismos vivos, provoca uma série de mudanças fisiológicas, chamadas coletivamente de estresse oxidativo (CROFT, 1998). Para minimizar os efeitos deletérios associados à constante formação das ERO oriundas da presença e da utilização do oxigênio em seus tecidos, os organismos aeróbicos foram dotados, ao longo do tempo evolutivo, de distintas defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada com seu substrato oxidável, são capazes de retardar ou inibir a oxidação deste substrato (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

O principal sistema de defesas antioxidantes enzimático celular é composto pela superóxido dismutase (SOD), pela catalase (CAT) e pela glutathiona peroxidase (GPx). Estas enzimas constituem a primeira defesa endógena de neutralização das ERO. Através delas as células mantêm baixas as quantidades de radical  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ , evitando a formação do radical  $\bullet OH$ , que, embora de vida muito curta e em reduzida concentração, é extremamente reativo e danoso às células (BOVERIS & CADENAS, 1997).

As células apresentam ainda, enzimas coadjuvantes e importantes na ação antioxidante, como a glutathiona redutase (GR) e o conjunto das glutathionas S-transferases (GSTs). As glutathionas S-transferases, embora não atuem diretamente contra os radicais livres, são outra importante defesa celular, pois estão associadas à biotransformação de xenobióticos, como herbicidas, inseticidas e agentes carcinogênicos. Estas enzimas catalisam a reação de conjugação do tripeptídeo glutathiona em sua forma reduzida (GSH) com esses compostos, aumentando a sua solubilidade e facilitando a sua excreção (JOSEPHY, 1997).

Completando a ação enzimática, as células exibem antioxidantes não enzimáticos, que incluem compostos endógenos, como a glutathiona reduzida (GSH), e exógenos com propriedades antioxidantes intrínsecas, como a vitamina E, C e A (além de carotenóides como o licopeno e o  $\beta$ -caroteno) e compostos fenólicos, como por exemplo, os flavonóides e outras moléculas derivadas de fontes vegetais (SCANDALIOS, 1997).

### 1.3- PRÓSTATA

É uma glândula que pertence ao aparelho reprodutor masculino localizada logo abaixo da bexiga circundando a uretra. Tem a função de secretar um fluido leitoso rico em íons

citrato, cálcio e fosfato que irá enriquecer o fluido seminal (CRISTONI, DI PIERRO & BOMBARDELLI, 2000). Histologicamente, a próstata é composta de ácinos glandulares suportados por um estroma de tecido conjuntivo e músculo liso, envolvida por uma cápsula fibromuscular espessa (ETTINGER, 1992). A próstata do rato é formada por subdivisões em pares, que correspondem aos lobos, definidas como próstata ventral, próstata lateral e próstata dorsal. A próstata lateral apresenta uma organização ducto-acinar e consiste de duas porções distintas; a próstata lateral do tipo 1 com 5-7 longos ductos principais que se estendem cranialmente em direção às vesículas seminais e próstata dorsal e se ramificam próximo ao colo da bexiga, e a do tipo 2 com 5-6 ductos curtos que se ramificam caudalmente ao colo da bexiga. A próstata ventral possui 2-3 pares de ductos principais delgados de cada lado e apresenta uma estrutura completamente ductal. A próstata dorsal possui 5-6 pares de ductos principais de cada lado e apresenta uma estrutura ducto-acinar. A morfogênese das ramificações dos ductos completa-se aos 30 dias e estudos imunohistoquímicos com o anticorpo para DP-1, a principal proteína secretória da próstata dorsal, revelaram que a função secretória inicia aproximadamente 30 dias após o nascimento (HAYASHI *et al.*, 1991).

#### **1.4- HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA**

##### **1.4.1- Definição**

A hiperplasia prostática benigna (HPB), segundo MARANDOLA (1997), é definida como um crescimento lento e progressivo da próstata que ocorre como resultado da proliferação de estruturas estromais e glandulares. É um distúrbio benigno comum nos

homens acima de 50 anos de idade, independente de raça ou cultura (MARANDOLA, 1997), embora ZIADA, ROSENBLUM & CRAWFORD (1999) relatem que a sua incidência é maior nos africanos e americanos e menor nos japoneses nativos. A doença atinge aproximadamente 50% dos homens entre 51 e 60 anos e 80% dos homens acima de 80 anos (STEINER *et al.*, 1999). Dados obtidos em autópsias revelam que a presença de evidências anatômicas ou microscópicas da HPB aumenta com a idade (ZIADA, ROSENBLUM & CRAWFORD, 1999), esquema mostrado no quadro 02. É importante salientar que a incidência de HPB microscópica é superior à HPB clínica; no entanto, 25-50% dos homens com HPB microscópica apresentam sintomas clínicos (ZIADA, ROSENBLUM & CRAWFORD, 1999).

**Quadro 02- Presença de evidência anatômica ou microscópica da HPB de acordo com a idade.**

<b>Percentual de Evidência de HPB</b>	<b>Idade (anos)</b>
20%	40-50
40%	50-60
55%	60-70
80%	70-80
90%	80-90

#### **1.4.2- Etiologia**

A etiologia desta patologia ainda não está bem definida, e diversos fatores podem estar envolvidos como os hormônios sexuais, interações entre estroma e epitélio, células indiferenciadas, fatores de crescimento, insulina e prolactina, entre os quais os andrógenos testiculares e os estrogênios têm papel primordial (MARANDOLA *et al.*, 1997).

A testosterona, o principal andrógeno circulante, é sintetizada a partir do colesterol e as substâncias precursoras são a desidroepiandrosterona e a androstenediona. Ela atravessa a membrana celular por difusão e é transformada em dihidrotestosterona (DHT) pela 5 $\alpha$ -redutase dentro da glândula prostática (WRIGHT *et al.*, 1999). A DHT liga-se aos receptores androgênicos promovendo a síntese de mRNA, proteínas e fatores de crescimento. O aumento da DHT na próstata é reportado como um fator envolvido no desenvolvimento da HPB. Outro fator importante observado na HPB, é a interação estroma-epitélio (STEERS & ZORN, 1995). A razão estrogênio/andrógeno aumenta em homens com mais idade e com a incidência da HPB, e esta alteração pode estar envolvida com o desenvolvimento da patologia. Os estrógenos são formados no homem pela enzima aromatase, a partir da testosterona e androstenediona. Os estrógenos contribuem para a proliferação das células estromais e esta proliferação estimula o crescimento epitelial dependente de andrógenos. MEIKLE (1995) mostrou que os fatores de crescimento, em particular o b-FGF (fator de crescimento básico fibroblástico), está presente em maior quantidade no tecido com HPB. ISAACS & COFFEY (1989) formularam uma hipótese na qual um aumento no número das células precursoras (stem cells) prostáticas, que são células com propriedades proliferativas, poderia estar envolvido na HPB.

Além disso, o aumento de volume da próstata ocorre freqüentemente devido ao edema da glândula, resultante do aumento do fluxo sanguíneo e extravasamento de líquidos devido ao processo inflamatório após infecção bacteriana, o que indicaria um papel para as prostaglandinas e leucotrienos no desenvolvimento da HPB (MIERSCH, 1993).

### 1.4.3- Sintomas

Dois componentes são identificados no desenvolvimento da sintomatologia obstrutiva da HPB, um mecânico e um dinâmico. O componente mecânico consiste no crescimento do tecido glandular e o dinâmico está relacionado ao aumento do tônus da musculatura lisa da próstata e uretra, estimulado pelos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos (ZIADA, ROSENBLUM & CRAWFORD, 1999). A maioria dos sintomas da HPB se origina da obstrução uretral e da perda gradual da função da bexiga, resultando em um esvaziamento incompleto da mesma. Estes sintomas são variáveis, mas geralmente estão associados a problemas de micção como fluxo urinário fraco, interrompido e hesitante, urgência para urinar e aumento da frequência de micção, principalmente à noite (WILT *et al.*, 1998).

### 1.4.4- Tratamento

A HPB é uma doença que não acarreta risco de vida para o paciente. Desta forma, o tratamento só é necessário quando os sintomas são muito incômodos, ou quando a função renal está severamente afetada. As opções de tratamento incluem a terapia médica através do uso de medicamentos, a terapia cirúrgica para a retirada do tecido que está obstruindo o fluxo urinário, ou apenas o monitoramento dos sintomas pelo médico, sem optar por um tratamento imediato.

Na terapia médica, os medicamentos mais utilizados são os bloqueadores  $\alpha$ -adrenérgicos e os inibidores da 5 $\alpha$ -redutase, porém diversas classes de medicamentos além destas já foram utilizadas, e atualmente o uso da fitoterapia vem crescendo, principalmente nos países europeus. Desta forma, a terapia médica pode ser dividida em hormonal, não-hormonal e fitoterápica.



Quanto à terapia hormonal, existem os fármacos antiandrogênicos, os antiestrogênicos e os inibidores da  $5\alpha$ -redutase. Muitos destes diminuem a sintomatologia e o tamanho da próstata mas causam impotência ou perda da libido, limitando a sua aplicação. Atualmente, os inibidores da  $5\alpha$ -redutase são os mais utilizados, particularmente a finasterida. Entretanto, muitos outros fármacos já foram utilizados para o tratamento da HPB, e seus efeitos serão comentados sumariamente a seguir.

A ciproterona é uma progesterona sintética, e é reportada diminuindo as gonadotrofinas hipofisárias, e levando a uma diminuição da testosterona no soro, além de exercer uma ação inibitória na ligação da DHT aos receptores andrógenos (MARANDOLA *et al.*, 1997). O tamoxifeno é um fármaco antiestrogênico que inibe a ligação dos estrógenos aos seus receptores específicos e a síntese de proteínas no tecido prostático. Este efeito pode resultar na inibição do crescimento estromal provocado pelos estrógenos (MARANDOLA *et al.*, 1997). Os inibidores da aromatase impedem a conversão da testosterona em estradiol e da androstenediona em estrona, mas não apresentaram resultados satisfatórios (BACH, SCHMITT & EBELING, 1996/97). Os agonistas do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) diminuem os sintomas relacionados à HPB, porém são raramente utilizados por causarem disfunções eréteis e ginecomastia (BACH, SCHMITT & EBELING, 1996/97).

A finasterida é um composto sintético 4-azasteróide que pertence a uma nova classe de inibidores específicos da  $5\alpha$ -redutase (GORMLEY, 1995). Atua inibindo a atividade da enzima  $5\alpha$ -redutase, impedindo a conversão da testosterona em DHT. A concentração de DHT diminui e, como conseqüência, ocorre uma redução no tamanho da próstata, que conduz a um aumento gradativo do fluxo urinário e melhora dos sintomas. Diminui os níveis de DHT na próstata sem afetar os níveis plasmáticos de testosterona, porém reduz os níveis do

antígeno prostático específico (PSA) no plasma, podendo interferir no diagnóstico do câncer de próstata (ZIADA, ROSENBLUM & CRAWFORD, 1999).

Na terapia não-hormonal, os mais utilizados são os inibidores  $\alpha$ -adrenérgicos. Estes medicamentos atuam promovendo o relaxamento da musculatura lisa da próstata e do colo da bexiga e, desta forma, aumentam o fluxo urinário e diminuem os sintomas obstrutivos, sem reduzir o tamanho da próstata. Porém, apresentam muitos efeitos colaterais como disfunções da pressão sangüínea, bradicardia reflexa, astenia, congestão nasal e ejaculação retrógrada (STEERS & ZORN, 1995).

Na fitoterapia, diversos extratos de plantas vêm sendo utilizados na medicina tradicional para o tratamento das desordens urológicas relacionadas à HPB. Estes extratos contém diversos constituintes como triterpenos, fitoesteróis, álcoois, ácidos graxos livres ou esterificados, lecitinas e ligninas. Estes compostos estão envolvidos com a atividade antiestrogênica e antiandrogênica, inibição da síntese de prostaglandinas e efeitos antiinflamatórios e imunomoduladores. Causam também um decréscimo no nível de colesterol no sangue. Entretanto, os mecanismos pelos quais estas preparações de extratos de plantas exercem seus efeitos não estão bem esclarecidos (CRISTONI, DI PIERRO & BOMBARDELLI, 2000). Como exemplos de plantas utilizadas para a produção de produtos para o tratamento da HPB, podemos citar a *Pygeum africanum*, a *Echinacea purpurea*, a *Curcubita pepo*, a *Secale cereale*, a *Serenoa repens*, a *Hipoxis rooperi* e a *Urtica dioica* (DI SILVERIO *et al.*, 1993; LOWE & KU, 1996; LITWIN, 1999). Entre elas, a *Serenoa repens*, na forma de um extrato lipidoesterólico, parece ser a mais utilizada (LITWIN, 1999).

No Brasil, o extrato lipidoesterólico da *Serenoa repens* é comercializado como Permixon® e indicado para o tratamento dos sintomas urológicos associados com a hipertrofia prostática. Os mecanismos de ação desta planta, já demonstrados, incluem a

inibição da atividade da  $5\alpha$ -redutase, inibição dos receptores  $\alpha 1$ -adrenérgicos, antagonismo à DHT, o bloqueio das ciclooxigenases e lipooxigenases, inibição da prolactina e da proliferação celular induzida por fatores de crescimento (BOMBARDELLI & MORAZONI, 1997; LOWE & FAGELMAN, 1999; GOEPEL *et al.*, 1999).

Em alguns homens, os sintomas progridem a um grau de severidade em que a terapia conservadora não é suficiente e a terapia cirúrgica torna-se necessária. Na terapia cirúrgica há uma grande variedade de técnicas que podem ser empregadas, entre elas a ressecção transuretral da próstata (TURP), a incisão transuretral da próstata (TUIP) e a prostatectomia. Porém, estes procedimentos apresentam muitas desvantagens, pela alta incidência de efeitos colaterais, como por exemplo, a impotência (ZIADA, ROSENBLUM & CRAWFORD, 1999).

### **1.5- RELAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO COM A HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA**

Os dados encontrados na literatura sugerem uma relação entre o óxido nítrico e a hiperplasia prostática benigna.

TAKEDA *et al.* (1995), demonstraram, através de experimentos farmacológicos utilizando estimulação de campo elétrico, que um decréscimo na liberação de NO causa um aumento no tônus da musculatura lisa da próstata humana e canina.

Em 1997, BLOCH *et al.* evidenciaram, através de imunohistoquímica, uma diminuição na inervação nitrérgica na próstata humana hiperplásica quando comparada a uma próstata normal.

Foi demonstrado, em cultura de células prostáticas de homens com HPB, que o nitroprussiato de sódio, um doador de NO, apresenta um efeito antiproliferativo nas células musculares lisas da próstata humana. Foi sugerido que este efeito antiproliferativo ocorreu através da inibição da proteína quinase C (PKC) nas células musculares lisas prostáticas na fase G1 do ciclo celular (GUH *et al.*, 1998).

KLOTZ *et al.* (1999) em um estudo com homens que recebiam doadores de NO para o tratamento de distúrbios cardíacos, mostraram que esta molécula influencia os sintomas obstrutivos da HPB no homem. Este efeito pode ser explicado pela ação dos doadores de NO no relaxamento do músculo liso.

O trabalho de GRADINI *et al.* (1999) através de imunohistoquímica, demonstra que a iNOS não é detectada na próstata normal. Porém, está sempre expressada na próstata com HPB, mesmo na ausência de prostatite ou sinais sistêmicos de processo inflamatório, sugerindo que os hormônios sexuais poderiam estar envolvidos na indução da iNOS e constituir um mecanismo para o NO na patogênese da HPB. As NOS constitutivas (eNOS e nNOS) estão presentes tanto na próstata normal como na hiperplásica; entretanto, a eNOS está presente principalmente na camada basal de células, enquanto que a nNOS está expressa em grande quantidade nas células mais superficiais da próstata afetada que constitui a camada secretória (GRADINI *et al.*, 1999).

## **1.6- RELAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO COM A HPB E O CÂNCER PRÓSTATICO**

Os radicais livres estão implicados em muitas patologias humanas incluindo a carcinogênese. Estas ERO, particularmente o radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ), provocam, entre outros

danos, lesões no ácido desoxiribonucléico (DNA) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). As bases de DNA alteradas possuem propriedades pró-mutagênicas e são encontradas em grandes quantidades em tecidos cancerosos em comparação aos tecidos normais (OLINSKI *et al.*, 1992). Além disso, também já foi demonstrado que existe uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes em tecidos com câncer (JARUGA *et al.*, 1994).

Do ponto de vista clínico, a hiperplasia prostática benigna não é considerada uma condição pré-maligna (PAGANO, 1991), porém um estudo realizado com um grande número de pacientes portadores de câncer prostático mostrou que 56% destes apresentaram HPB (KASTENDIECK, 1980). Entretanto, somente esta observação não é suficiente para estabelecer uma relação causal entre HPB e câncer prostático.

PARTIN *et al.*, em 1993, mostraram a ocorrência de eventos fenotípicos semelhantes na progressão das células normais para estas patologias, sugerindo a HPB como uma condição pré-maligna que pode predispor para o câncer prostático. Além disso, OLINSKI *et al.* (1995), trabalhando com tecidos humanos com HPB, mostraram que existe uma diminuição nas atividades das enzimas antioxidantes e um nível aumentado de lesões do DNA nesta patologia, sugerindo que os pacientes com HPB podem ser predisponentes a desenvolver câncer prostático. Estas evidências indicam uma relação causal entre HPB e câncer prostático e deveriam ocorrer, provavelmente, alterações nas defesas antioxidantes do tecido prostático que levariam às lesões no DNA.

### 1.7- CALENDULA OFFICINALIS

A *Calendula officinalis* é uma planta anual nativa da região do Mediterrâneo, cultivada com propósitos ornamentais e medicinais na Europa e nas Américas (RAMOS *et al.*,

1998). No Brasil, a *Calendula officinalis* é também chamada de margarida dourada, malmequer e maravilhas (FRANCO, 1996).

Na medicina popular, as flores são utilizadas há muitos anos em diversas preparações, principalmente pomadas, para o tratamento de diversos distúrbios dermatológicos, como feridas, úlceras, eczemas, queimaduras, contusões, erupções, varizes e hemorróidas (ZITTERL-EGLESEER *et al.*, 1997).

Muitas propriedades foram atribuídas às preparações a partir das flores, como colerética, anti-inflamatória, analgésica, anti-tumoral, anti-úlceras, bactericida, diurética, estimulante, e cicatrizante para queimaduras e erupções cutâneas (DUKE, 1991). Seus efeitos anti-inflamatório e anti-bacteriano foram mostrados em muitos estudos experimentais e clínicos (DUMENIL *et al.*, 1980; SHIPOCHLIEV & DIMITROV, 1981).

Estudos fitofarmacológicos nos extratos das flores da *Calendula officinalis* mostraram a presença de metabólitos secundários bioativos tais como flavonóides e triterpenóides (DELLA LOGGIA *et al.*, 1994; PIETTA *et al.*, 1992 ; VIDAL-OLLIVER *et al.*, 1996).

Os flavonóides são compostos polifenólicos antioxidantes encontrados em plantas na forma de açúcares conjugados, e fazem parte do mais importante grupo de antioxidantes naturais (LEAN *et al.*, 1999). Tem sido demonstrado na literatura que estes compostos exercem uma variedade de efeitos, incluindo a ação como seqüestradores de ERO como o radical hidroxil (HAENEN, JANSEN & BAST, 1993; SANZ *et al.*, 1994) e ânion superóxido (ROBAK & GRYGLEWSKI, 1988). Inibem, também, a peroxidação lipídica provocada por diferentes sistemas oxidativos, tais como,  $Fe^{2+}$ /ascorbato,  $CCl_4$ /NADPH e  $Fe^{3+}$ -ADP/NADPH (HAENEN, JANSEN & BAST, 1993; SANZ *et al.*, 1994), além de atuarem como quelantes de íons como  $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  (ROBAK & GRYGLEWSKI, 1988), desta última forma atenuando a contribuição da reação de fenton na geração do radical hidroxil.

Em função da presença de flavonóides na composição química da *Calendula officinalis* e da ação antioxidante destes compostos, já comprovada na literatura, uma fração desta planta, rica em flavonóides, foi testada em um modelo experimental de hipertrofia prostática. O objetivo foi avaliar um eventual potencial terapêutico na HPB, uma vez que existem evidências de uma relação causal entre HPB, câncer prostático e estresse oxidativo, considerando que alterações nas defesas antioxidantes do tecido levam à lesões no DNA, características do câncer de uma forma geral (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

## 2- OBJETIVOS

### 2.1- OBJETIVO GERAL

Investigar o envolvimento do óxido nítrico e das espécies reativas de oxigênio na hiperplasia prostática benigna.

### 2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar um modelo para o estudo da hiperplasia prostática em ratos.
- Estudar o envolvimento do óxido nítrico na patogenia da HPB.
- Investigar o envolvimento da via do óxido nítrico nos tratamentos com a finasterida e com o extrato lipidoesterólico da *Serenoa repens*.
- Investigar o potencial terapêutico da fração butanólica da *Calendula officinalis* na HPB e o envolvimento do óxido do óxido nítrico nesta ação.
- Avaliar o estresse oxidativo no fígado de ratos com hiperplasia prostática.



### **3- MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1- ANIMAIS**

No modelo experimental foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), com 40 dias de idade e pesando de 160 a 200g. No dia da chegada ao biotério do laboratório, os animais foram alojados em caixas plásticas em grupos de 2 ou 3 e permaneceram por 3 dias para adaptação antes do início dos experimentos. Os animais receberam água e comida (ração comercial) *ad libitum*. A temperatura ambiente variou de 22 a 25°C, e foi utilizado um ciclo claro-escuro de 12 horas com as luzes ligadas às 7 horas e desligadas às 19 horas.

#### **3.2- MATERIAIS**

##### **3.2.1- Reagentes**

Todos os reagentes utilizados foram do mais alto grau de pureza disponível no mercado.

### 3.2.1.1- Reagentes da Sigma®

- 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB)
- Ácido 2-nitrobenzóico (DTNB)
- Ácido dietileno-triamino-pentacético (DPTA)
- Ácido tiobarbitúrico (TBA)
- Albumina sérica bovina (BSA)
- Aprotinina
- Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)
- Flavina mononucleotídeo (FMN)
- Glutationa oxidada (GSSG)
- Glutationa redutase (GR)
- Glutationa reduzida (GSH)
- Inibidor de tripsina
- L-arginina
- L-citrulina
- Leupeptina
- L-valina
- N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginina (L-NOARG)
- Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida (NADPH)
- Reagente de Folin
- Resina de troca iônica (AG 50W-X8)
- Ter-butilhidroperóxido (t-BuOOH)
- Tetrahidrobiopterina (TBH<sub>4</sub>)
- Triton X-100

**3.2.1.2- Reagentes da Merck®**

- 2 $\alpha$ -naftil-etilenodiamina
- Ácido clorídrico (HCl)
- Ácido etileno-dinitrilo-tetracético (EDTA)
- Ácido etilenoglicol-tetracético (EGTA)
- Ácido orto-fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)
- Cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>)
- Cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>)
- Cloreto de sódio (NaCl)
- Éter etílico
- Formato de amônia
- Fosfato dibásico de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)
- Fosfato monobásico de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- Fosfato monobásico de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- Hidróxido de sódio (NaOH)
- Nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>)
- Nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>)
- Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Sacarose
- Sulfanilamida
- Sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>)
- Sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>)
- Tartarato de sódio

### 3.2.1.3- Reagentes de outras marcas

- [<sup>3</sup>H]L-arginina – Amersham Life Sciences®
- Ácido tricloroacético (TCA) - Synth®
- Carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) - Ecibra®
- Ditioneitol (DTT) - Serva®
- Formol 37-40% - Miyaco®
- Tris - Riedel de Haën®

### 3.2.2- Medicamentos

Os medicamentos utilizados para os tratamentos correspondem aos mesmos que se encontram à disposição da população nas farmácias, os quais foram:

- Cipionato de testosterona (Deposteron®-Nova Química®)
- Dinitrato de isossorbida (Isordil®-Nova Química®)
- Extrato lipidoesterólico da *Serenoa repens* (Permixon®-Asta Médica®)
- Finasterida (Reduscar®-UCI Farma®)
- Furosemida (Lasix®-Hoeschst®)

### 3.2.3- Fração butanólica da *Calendula officinalis*

A fração butanólica da *Calendula officinalis* foi fornecida pelo grupo do Prof. Dr. Rozendo A. Yunes do Departamento de Química – CFM/UFSC.

As flores da *Calendula officinalis* foram secas e maceradas em etanol 50% por um período de 10 dias, sendo o solvente concentrado em um evaporador rotatório sob pressão reduzida para obtenção do extrato hidroalcoólico bruto. Este extrato foi deixado em repouso por algumas horas no refrigerador (5°C) ocorrendo a formação de um precipitado marron, que foi filtrado. O filtrado foi, então, particionado com butanol, para a obtenção da fração butanólica (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

### 3.2.4- Equipamentos

- Agitador magnético – Fisatom®
- Balança analítica - Sartorius®
- Banho Maria – Quimis®
- Botijão criogênico - Cryometal®
- Centrífuga - Fanem®
- Centrífuga refrigerada - Hitachi®
- Cintilador - Packard®
- Espectrofotômetro - Hitachi®
- Espectrofotômetro - Pharmacia®
- Freezer - Prosdócimo®
- Freezer -70°C - Harris®

- Homogeneizador – Glas-Col®
- Luminômetro – Bio Orbit®
- Microcentrífuga - Eppendorff®
- PH metro – Schott®
- Refrigerador - Clímax®
- Registrador – Kipp & Zonen®
- Vortex – Biomatic®

### **3.3- MODELO EXPERIMENTAL**

O modelo experimental utilizado neste trabalho está baseado em CURI-PEDROSA *et al.*(1999), partindo do princípio que este distúrbio ocorre em células epiteliais e estromais prostáticas, a partir do desequilíbrio que ocorre originalmente na concentração sanguínea de colesterol e com posterior repercussão nos níveis totais de testosterona, conduzindo a um conseqüente aumento na síntese de DHT. O tratamento utilizado neste trabalho resultou em uma modificação na próstata que foi caracterizada, histologicamente, como uma hipertrofia da glândula, como será mostrado posteriormente. Modelos semelhantes estão relatados na literatura. Entretanto, estes modelos apresentam muitas variações quanto aos fármacos utilizados para induzir o crescimento prostático (DHT, testosterona, estradiol, prolactina), doses utilizadas, vias de administração, tempo de tratamento, realização ou não da castração e linhagem dos animais utilizados (CONSTANTINOU, 1996; COPPENOLLE *et al.*, 2000). Assim, resolveu-se adaptar estes modelos para as condições e os animais disponíveis em nosso laboratório. Foram utilizados ratos Wistar machos púberes castrados e tratados

posteriormente durante 7 dias com 0,4mg/rato de cipionato de testosterona, por via intramuscular (IM), para o início do desenvolvimento da hipertrofia prostática (HP). Após este período, os animais continuaram a receber aplicações diárias de testosterona, sendo os tratamentos por via oral (VO) ou intraperitonal (IP), durante 15 ou 30 dias. Os volumes aplicados consistiram em 0,3ml IM, 0,5ml VO e 0,4ml IP. O veículo utilizado foi o óleo vegetal para as administrações IM e VO, e salina (NaCl 9g/L) para as IP. Ao mesmo tempo que foi realizado o modelo experimental de HP, um grupo de animais falso castrados foi tratado com veículo sob as mesmas condições dos animais com HP, para ser utilizado como controle de ratos normais.

Os tratamentos foram realizados com o extrato lipidoesterólico da *Serenoa repens* (Permixon®), a fração butanólica da *Calendula officinalis*, o inibidor da 5 $\alpha$ -redutase finasterida (Reduscar®), o inibidor da NOS N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginina (L-NOARG), e o doador de nitratos, dinitrato de isossorbida (Isordil®). As doses utilizadas estão relacionadas no quadro 03 e os grupos experimentais utilizados neste trabalho estão resumidos no quadro 04.

As doses utilizadas foram estabelecidas baseando-se na dose terapêutica para o homem, sendo esta multiplicada por um fator de correção para o metabolismo de rato que corresponde a 5.

#### **Quadro 03-Doses utilizadas nos tratamentos.**

<b>Medicamento</b>	<b>Dose</b>
Testosterona	0,4 mg/rato/dia
Permixon®	5 mg/rato/dia
Isordil®	1mg/rato/dia
Finasterida	0,1 mg/rato/dia
Fração Butanólica	5 mg/rato/dia
L-NOARG	3 mg/rato/dia

**Quadro 04-Grupos e protocolos experimentais.**

<b>GRUPO I</b>	
Avaliação do Modelo Experimental, Parâmetros de Micção, Estresse Oxidativo e Defesas Antioxidantes e Atividade NOS	
<u>Grupos Experimentais</u>	<u>Protocolo de Tratamento</u>
Normais	Falso castrados, óleo vegetal IM 3, 7, 15 ou 30 dias
Tratados com testosterona	Castrados, testosterona IM 3, 7, 15 ou 30 dias
<b>GRUPO II</b>	
Peso do Ratos, Peso da Próstata e Níveis de Óxido Nítrico	
<u>Grupos Experimentais</u>	<u>Protocolo de Tratamento</u>
Normais	Falso castrados – óleo vegetal IM 7 dias – óleo vegetal IM e VO 15 ou 30 dias
Hipertrofia Prostática	Castrados – testosterona IM 7 dias – testosterona IM e óleo vegetal VO 15 ou 30 dias
Permixon®	Castrados – testosterona IM 7 dias – testosterona IM e Permixon® VO 15 ou 30 dias
Finasterida	Castrados – testosterona IM 7 dias – testosterona IM e finasterida VO 15 ou 30 dias
Fração Butanólica	Castrados – testosterona IM 7 dias – testosterona IM e fração butanólica VO 30 dias
Inibidos	Castrados – testosterona IM 7 dias – testosterona IM, óleo vegetal VO e L-NOARG IP 30 dias
Inibidos + Fração Butanólica	Castrados – testosterona IM 7 dias – testosterona IM, fração butanólica VO e L-NOARG IP 30 dias
Inibidos + Permixon®	Castrados – testosterona IM 7 dias – testosterona IM, Permixon® VO e L-NOARG IP 30 dias
Isordil®	Castrados – testosterona IM 7 dias – testosterona IM, Isordil® VO 30 dias
Normais + Isordil®	Falso Castrados – óleo vegetal IM 7 dias – óleo vegetal IM, Isordil® VO 30 dias



### **3.4- AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MICÇÃO NO MODELO EXPERIMENTAL**

Os parâmetros de micção avaliados foram a frequência urinária, o volume de urina em 24 horas, e o volume de urina por micção. Para a avaliação do volume de urina em 24 horas, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas com água e comida *ad libitum* e toda a urina excretada neste período foi coletada. Para análise da frequência de micção, os animais receberam uma aplicação subcutânea de 3 ml de solução salina 0,9%, mais 10 mg/Kg de furosemida (CONSTANTINOU, 1996). Imediatamente após a aplicação, foram colocados em gaiolas metabólicas e observados durante duas horas. A medida do volume de urina por micção foi realizada nos animais submetidos a 30 dias de tratamento com testosterona, ao mesmo tempo em que foi avaliada a frequência urinária. O volume foi medido cada vez que o animal realizava uma micção.

### **3.5- COLETA DAS AMOSTRAS**

Para a coleta de sangue, os animais foram anestesiados com éter etílico, e realizada no canto medial do olho utilizando tubos capilares, para a determinação de microhematócrito (Perfecta®). O sangue foi coletado em tubos de vidro sem anti-coagulante para a obtenção do soro e mantido em temperatura ambiente para evitar a hemólise. Em seguida, foi realizada a retirada do fígado, próstata e cerebelo, mantidos constantemente em gelo.

### **3.6- PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS**

#### **3.6.1- Soro Sanguíneo**

O sangue foi centrifugado a 6000g por 10 minutos para obtenção do soro sanguíneo, e após congelado e conservado a -20 °C, e descongelado no dia da análise dos níveis de óxido nítrico.

#### **3.6.2- Fígado**

Os fígados foram lavados em uma solução de NaCl 9 g/L imediatamente após a sua retirada. Foram mantidos em gelo para avaliação do peso e preparação do homogenato e extrato ácido para dosagem dos antioxidantes.

##### **3.6.2.1- Homogenato**

Os homogenatos foram obtidos em tampão fosfato de sódio 20mM, pH 7.4 contendo 0,1% de Triton X-100 e 150mM de cloreto de sódio (1:20 p/v). A homogeneização foi mantida a 4°C, com cerca de 20 impactos em homogeneizador, seguidos de centrifugação a 10000g durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram mantidos a -20°C até a sua utilização para a dosagem da atividade da catalase, glutathiona redutase, glutathiona peroxidase e glutathiona S-transferase através de espectrofotometria. A avaliação do dano celular foi realizada em homogenato fresco, ou seja, logo após a sua preparação.

### 3.6.2.2- Extrato Ácido

Porções do fígado foram precipitadas com ácido tricloroacético 12% (1:20p/v) e homogeneizadas com cerca de 20 impactos em homogeneizador, seguidos de centrifugação a 10000g durante 10 minutos. Imediatamente após a centrifugação, a determinação espectrofotométrica dos tióis não-proteicos (glutathiona reduzida e glutathiona total) foi realizada nos sobrenadantes.

### 3.6.3- Próstata

Após a coleta, as próstatas foram lavadas em NaCl 0,9% e mantidas em gelo. Após a avaliação do peso, uma parte do material foi congelado e conservado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . O restante foi conservado em formol tamponado (100 ml de formol 37-40%, 900 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, 4g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 6,5g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). No dia da análise da atividade da NOS, as próstatas foram descongeladas e homogeneizadas em um triturador de tecidos a  $4^{\circ}\text{C}$  e submetidas ao ultrassom, na proporção de 1:2 (p/v), em um tampão a  $4^{\circ}\text{C}$  contendo 320mM de sacarose, 50mM de Tris-HCl, pH 7.0, 1mM de ácido etileno-dinitrilo-tetracético (EDTA), 1mM de Ditioneitol (DTT), 10 $\mu\text{g/ml}$  de Leupeptina, 10 $\mu\text{g/ml}$  de inibidor de tripsina e 2 $\mu\text{g/ml}$  de aprotinina. O homogenato foi, então, centrifugado a 10000g por 20 minutos, e o sobrenadante utilizado para a dosagem da atividade da NOS (KNOWELS *et al.*, 1990). A determinação da concentração de proteína foi realizada pelo método de LOWRY, conforme descrito posteriormente (LOWRY *et al.*, 1951). As próstatas conservadas em formol tamponado foram utilizadas para a avaliação histológica.

### 3.6.4- Cerebelo

Os cerebelos foram homogeneizados em um triturador de tecidos e submetidos ao ultrassom, na proporção de 1:5 (p/v), no mesmo tampão utilizado para a próstata. O homogenato foi centrifugado a 10000g por 20 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem da atividade da NO sintase (KNOWELS *et al.*, 1990). A determinação da concentração de proteína foi realizada pelo método de LOWRY que será descrito posteriormente (LOWRY *et al.*, 1951).

### 3.7- DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO

O soro sanguíneo foi desproteinizado pela adição de sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ) 10% (p/v), seguido de repouso por 10 minutos à 4°C, e NaOH 2,5N, seguido de repouso por 10 minutos à 4°C. As proporções utilizadas foram de 50µl de  $ZnSO_4$  e 10µl de NaOH 2,5N para 500µl de soro. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 10 minutos a 10000g à 4°C, sendo o sobrenadante utilizado para a dosagem de nitrito ( $NO_2^-$ ) pelo método de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Antes da dosagem, todo nitrato ( $NO_3^-$ ) foi convertido a nitrito ( $NO_2^-$ ) pela bactéria *Escherichia coli*, a qual foi incubada na presença de 50mM de tampão fosfato, pH 7.2 e 240mM de formato de amônia por 2 horas a 37°C. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 10000g por 10 minutos. Uma alíquota de cada amostra foi misturada a uma alíquota de igual volume do reagente de Griess (sulfanilamida 1% (p/v) em  $H_3PO_4$  5% (v/v) e 2α-naftil-etilenodiamina 0,1%). Após 10 minutos de incubação, as amostras foram analisadas espectrofotometricamente a 543 nm. Para

análise dos resultados duas curvas-padrões foram realizadas, uma de  $\text{NaNO}_2$  e uma de  $\text{NaNO}_3$  + *E. coli*.

### 3.8- DOSAGEM DA ATIVIDADE DA NO SINTASE

Neste método, a [ $^3\text{H}$ ]L-arginina é convertida em [ $^3\text{H}$ ]L-citrulina e NO em que se mede a formação de citrulina marcada a qual é proporcional à formação de NO. Os sobrenadantes das preparações descritas anteriormente foram incubados à temperatura ambiente em um meio contendo 50mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.2, 1,2mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,25mM de  $\text{CaCl}_2$ , 60mM de L-valina, 1,2mM de L-citrulina, 1mM de DTT, 4 $\mu\text{M}$  de FAD, 5 $\mu\text{M}$  de FMN, 10 $\mu\text{M}$  de  $\text{TBH}_4$ , 120 $\mu\text{M}$  de NADPH e 2 $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^3\text{H}$ ]L-arginina. A incubação foi realizada na ausência de ácido etilenoglicol-tetra-acético (EGTA) para medir a atividade total, e na presença de EGTA para a atividade independente de cálcio que corresponde a iNOS. A atividade da nNOS foi calculada pela diferença entre a atividade total e a independente de cálcio. Após uma hora de incubação, a reação foi paralisada com a adição de uma resina de troca iônica AG 50W-X8 (Sigma), 10g/100ml. A resina foi sedimentada através de centrifugação e alíquotas do sobrenadante foram analisadas por cintilação líquida (BREDT & SNYDER, 1990; WOLF & DATTO, 1992).

### **3.9- AVALIAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO TECIDUAL**

As substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram medidas no fígado de ratos após os tratamentos conforme o caso. O teste usado para avaliar o dano celular foi baseado no trabalho descrito por OHKAWA, OSHISHI & YAGI (1979) e BIRD & DRAPER (1984). Os homogenatos dos tecidos foram precipitados pela adição de ácido tricloroacético (TCA) 12% e agitados vigorosamente por 5 segundos (1 ml de TCA 12% para 100µl da amostra). Em seguida foram incubados por 60 minutos a 100°C na presença de 0,9ml de tampão Tris-HCl 60mM, pH 7.4 (0,1 mM DPTA) e 1ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,76 %. Após a incubação, o material foi resfriado durante 30 minutos a 5°C e posteriormente centrifugado por 5 minutos a 10000g. A leitura foi realizada em 535 nm e a absorbância expressa em  $\mu\text{mol.g}^{-1}$ . Cálculo:  $\text{TBARS } (\mu\text{mol.g}^{-1}) = (A_{535}/153) \times \text{fatores de diluição (homogenato} \times \text{tubo de ensaio)}$ . Os fatores de diluição utilizados foram 20x para o homogenato (0,1g de fígado em 1,9ml de tampão) e 30x para o tubo de ensaio (0,1ml do homogenato em 3ml de volume final).

### **3.10- ANÁLISE DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS**

#### **3.10.1- Atividade da Catalase**

Para análise da atividade da catalase foi utilizado o método descrito por AEBI (1984), que quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio em 240 nm durante 20 segundos pela enzima presente na amostra. No ensaio, foi utilizada uma solução de

peróxido de hidrogênio 10mM em tampão fosfato 50mM, pH 7.0, preparada e titulada no dia da análise, à qual era adicionado 20 µl da amostra e o valor da constante de velocidade da atividade da enzima (K) calculada nos 3 segundos iniciais. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas e os valores expressos em  $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ . Cálculo: CATALASE ( $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) = K x 1,5 x fatores de diluição (homogenato x cubeta), onde K é a constante de velocidade da atividade da enzima calculada no programa (GBCUV–Kinetics) em um computador acoplado ao espectrofotômetro. Os fatores de diluição utilizados foram: 20x para o homogenato (0,1 g de fígado em 1,9 ml de tampão) e 100x para a cubeta (20µl do homogenato em 2ml de volume final).

### 3.10.2- Atividade da Glutathiona Redutase (GR)

O método utilizado para análise da atividade da glutathiona redutase foi proposto por CARLBERG & MANNERVICK (1975). A amostra (50µl) foi adicionada a um meio de reação (950µl) contendo 25ml de tampão fosfato 0,1M, pH 7.0, 8,6mg de NADPH, 10ml de DPTA 5mM, pH 7.0, 30,6mg de glutathiona oxidada (GSSG) e 15ml de água destilada, e, durante 30 segundos em 340 nm, foi verificada a taxa de oxidação do NADPH, devido à redução da glutathiona oxidada (GSSG) pela glutathiona redutase presente na amostra. Os valores foram expressos em  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ . Cálculo: GR ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) = (K / 6,22) x fatores de diluição (homogenato x cubeta), onde 6,22 é o coeficiente de extinção molar correspondente ao NADPH, e K é a constante de velocidade da atividade da enzima calculada no programa (GBCUV–Kinetics) em um computador acoplado ao espectrofotômetro. Os fatores de diluição utilizados foram: 20x para o homogenato (0,1 g de fígado em 1,9 ml de tampão) e 20x para a cubeta (50µl do homogenato em 1ml de volume final).

### 3.10.3- Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

A enzima glutathione peroxidase catalisa a redução do peróxido de hidrogênio, bem como de outros hidroperóxidos, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como substrato para esta reação, produzindo glutathione oxidada (GSSG) (FLOHÉ & GUNZLER, 1984). Para este ensaio, foi utilizado 10µl da amostra e 10µl de ter-butilhidroperóxido (t-BuOOH) colocados em 1ml de meio de reação composto por 25ml de tampão fosfato 0,1M, pH 7.0, 8,6mg de NADPH, 10ml de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) 5mM, pH 7.0, 15ml de água destilada, 24mg de glutathione redutase (GR), e 5U de glutathione reduzida (GSH), colocada momentos antes do ensaio. Este ensaio é baseado na medida do decréscimo da absorvância promovido durante a redução da GSSG catalisada pela GR na presença de NADPH. A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção da GSSG a partir da GSH em presença de t-BuOOH, catalisada pela GPx. Os valores da atividade da GPx foram expressos em  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ . Cálculo:  $\text{GPx} (\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}) = ((K - K_1) / 6,22) \times$  fatores de diluição (homogenato x cubeta), onde K é a constante de velocidade da atividade da enzima calculada no programa (GBCUV-Kinetics) em um computador acoplado ao espectrofotômetro,  $K_1$  corresponde à absorvância do branco e 6,22 corresponde ao coeficiente de absorção do NADPH. Os fatores de diluição utilizados foram: 20x para o homogenato (0,1 g de fígado em 1,9 ml de tampão) e 102x para a cubeta (10µl do homogenato em 1020µl de volume final).



### **3.10.4- Atividade da Glutathione S-transferase (GST)**

As glutathione S-transferases são um grupo de enzimas que catalisam a formação de tioésteres, pela adição de GSH a um grande número de compostos que contém um carbono eletrofílico. A atividade da glutathione S-transferase foi medida espectrofotometricamente em 340 nm de acordo com KEEN, HABIG & JAKOBY (1976). O método consiste na adição de 10µl da amostra em um meio contendo 10µl de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB), 10µl de glutathione reduzida (GSH) 0,1M e 970µl de tampão fosfato 0,1M, pH 7.0 na cubeta da amostra, enquanto que na cubeta de referência os 10µl de amostra são substituídos por 10µl do tampão. As análises foram feitas em duplicatas e os valores da atividade da enzima foram expressos em  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ . Cálculo:  $\text{GST } (\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}) = (K / 9,6) \times \text{fatores de diluição (homogenato} \times \text{cubeta)}$  onde 9,6 corresponde ao coeficiente de extinção molar do CDNB e K é a constante de velocidade da atividade da enzima calculada no programa (GBCUV-Kinetics) em um computador acoplado ao espectrofotômetro. Os fatores de diluição utilizados foram: 20x para o homogenato (0,1 g de fígado em 1,9 ml de tampão) e 100x para a cubeta (10µl do homogenato em 1ml de volume final).

## **3.11- ANÁLISE DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO-ENZIMÁTICAS**

### **3.11.1- Glutathione Reduzida (GSH)**

A concentração de glutathione reduzida em precipitado ácido do fígado dos animais foi determinada pelo método de BEUTLER, DURON & KELLY (1963). A adição de 0,2ml de

ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) 2,5mM nas cubetas contendo 1,9ml de tampão fosfato 0,2M, pH 8.0 e 0,1ml do extrato ácido, permitia, após 3 minutos, a obtenção da formação máxima do ânion tiolato (TNB), de cor amarela, mensurável em 412 nm. As concentrações foram expressas em mM de glutathiona reduzida. Cálculo:  $GSH (mM) = (A_{412} / 14,1) \times \text{diluições}$  (extrato ácido x cubeta x DTNB), onde  $A_{412}$  corresponde à absorbância em 412 nm e 14,1 ao coeficiente de extinção molar do ânion tiolato (TNB). Os fatores de diluição utilizados foram: 20x para o homogenato (0,1 g de fígado em 1,9 ml de tampão), 20x para a cubeta (0,1ml do homogenato em 2ml de volume final) e 1,1x do DTNB (0,2ml do DTNB em 2,2ml de volume final).

### 3.12- DOSAGEM DE PROTEÍNA

A determinação da concentração de proteína foi realizada em triplicatas pelo método de LOWRY *et al.* (1951). As amostras foram diluídas 1:4 (v/v) e 5 $\mu$ l foram adicionados a 750 $\mu$ l de uma solução contendo 8 ml da solução alcalina ( $Na_2CO_3$  2% em NaOH 0,4%), 80 $\mu$ l de tartarato de sódio 2% e 80 $\mu$ l de sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ) 1% e 245  $\mu$ l de  $H_2O$ , totalizando um volume final de 1ml. Após um período de incubação de 10 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado 75 $\mu$ l do reagente de Folin diluído 1:2, e incubado por mais 30 minutos. A leitura foi realizada em 660 nm e as concentrações foram obtidas através de uma curva padrão utilizando albumina sérica bovina (BSA).

### **3.13- PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS PARA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA**

As próstatas coletadas durante os experimentos, fixadas e conservadas em solução de formol a 10% tamponado, foram encaminhadas ao Prof. Dr. Celso Pilati do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), para a realização do processamento técnico e interpretação das lesões. No Laboratório de Patologia Veterinária, o material foi incluído em parafina, o que proporciona firmeza e maciez suficientes para a realização de cortes finos o bastante (microtomia) para serem distendidos sobre uma lâmina de vidro. Para que o tecido possa ser incluído em parafina, deve ser previamente impregnado por esta substituindo a água tissular. Este processo de impregnação ou processamento pode ser realizado manualmente ou por um aparelho (processador automático de tecidos ou histotécnico). Através de vários banhos sucessivos de álcool, o tecido desidrata. A imiscibilidade entre o álcool e a parafina líquida (60°C) tornam necessários banhos de xilol, que substituem o álcool e a água nos tecidos. A seguir, são realizados banhos em parafina líquida para impregnar os tecidos. O material impregnado pela parafina é então incluído em blocos sólidos de parafina, utilizando-se pequenos moldes de alumínio em que o tecido permanece no fundo. Concluída a inclusão, os blocos obtidos foram mantidos numa placa de gelo para solidificar, aguardando a microtomia. Os cortes foram colocados boiando num banho-maria histológico a 60°C para esticar, sendo, então, coletados e aderidos a uma lâmina de vidro. As lâminas com os cortes parafinados foram colocadas na estufa à 60°C para aumentar a adesão do corte à lâmina e para eliminar a parafina. Após estes procedimentos, os cortes histológicos estavam prontos para a etapa da coloração. A coloração de rotina em histopatologia é a Hematoxilina-Eosina (H&E), que cora os núcleos em azul escuro e o citoplasma em rosa. A bateria de coloração foi constituída por vários recipientes

contendo as diversas substâncias necessárias às diferentes fases da coloração: água, hematoxilina, água, eosina, álcool, em diferentes concentrações, e xilol. Após a coloração as lâminas foram montadas e observadas no microscópio ótico para a elaboração do laudo histopatológico.

### **3.14- ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística dos resultados foi realizada através de análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Duncan, admitindo um nível de significância de  $p < 0,05$ .

#### **4- RESULTADOS**

A apresentação dos resultados está dividida em 4 partes:

- Análise do modelo experimental
- Peso do rato e da próstata e níveis de óxido nítrico
- Estresse oxidativo e defesas antioxidantes
- Atividade da NOS.

Os valores mostrados durante o texto estão sempre representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

Todas as abreviaturas utilizadas nos gráficos e a explicação resumida de cada tratamento estão relacionadas no quadro 05.

**Quadro 05-Abreviaturas utilizadas nos gráficos.**

<b>N</b>	– Normais: falso castrados e tratados com óleo vegetal
<b>HP</b>	– Hipertrofia prostática: castrados e tratados com testosterona
<b>P</b>	– Permixon®: castrados e tratados com testosterona e Permixon®
<b>F</b>	– Finasterida: castrados e tratados com testosterona e finasterida
<b>F.B.</b>	– Fração butanólica: castrados e tratados com testosterona e fração butanólica da <i>Calendula officinalis</i>
<b>I</b>	– Inibidos: castrados e tratados com testosterona e L-NOARG
<b>I+F.B.</b>	– Inibidos + Fração Butabólica: castrados e tratados com testosterona, fração butanólica da <i>Calendula officinalis</i> e L-NOARG
<b>I+P</b>	– Inibidos + Permixon®: castrados e tratados com testosterona, Permixon® e L-NOARG
<b>Iso</b>	– Isordil®: castrados e tratados por 30 dias com testosterona e Isordil®
<b>N+Iso</b>	– Normais + Isordil®: falso castrados e tratados por 30 dias com óleo vegetal e Isordil®
<b>N15</b>	– Normais 15 dias: falso castrados e tratados por 15 dias com óleo vegetal
<b>N30</b>	– Normais 30 dias: falso castrados e tratados por 30 dias com óleo vegetal
<b>T15</b>	– Testosterona 15 dias: castrados e tratados por 15 dias com testosterona
<b>T30</b>	– Testosterona 30 dias: castrados e tratados por 30 dias com testosterona

**4.1- ANÁLISE DO MODELO EXPERIMENTAL**

Na análise do modelo experimental foram avaliados o peso, tamanho e aspectos histológicos da próstata, além dos parâmetros de micção.

**4.1.1- Aspecto Macroscópico da Próstata**

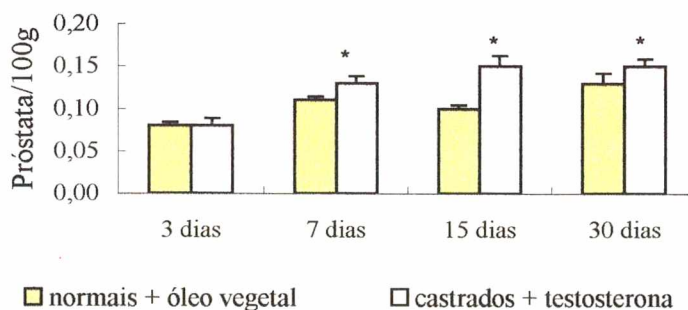
Os pesos das próstatas dos animais estão representados no quadro 06. Foi observado um aumento do peso da próstata com 7, 15 e 30 dias de administração de 0,4 mg/rato de

testosterona. Este aumento correspondeu a 18%, 50% e 15% nos tempos 7, 15 e 30 dias, respectivamente (figura 01) em relação aos ratos normais. A diferença macroscópica do tamanho da próstata entre os animais normais e os tratados com testosterona já pôde ser evidenciada durante a retirada do órgão (figura 02).

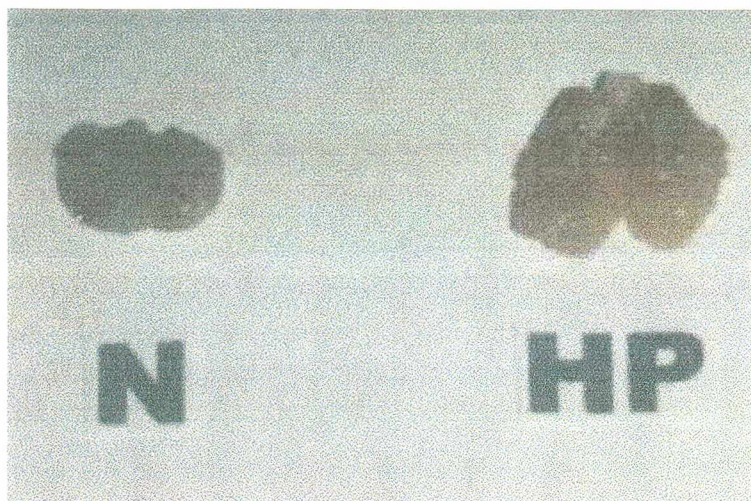
**Quadro 06-Peso da próstata (g) por 100g de peso em ratos normais e em rato castrados e tratados com testosterona por 3, 7, 15 e 30 dias.**

Tempo	Tratamento	
	Normais + Óleo vegetal	Castrados + Testosterona
<b>3 dias</b>	0,08 ± 0,004 g	0,08 ± 0,008 g
<b>7 dias</b>	0,11 ± 0,004 g	0,13 ± 0,008 g
<b>15 dias</b>	0,10 ± 0,004 g	0,15 ± 0,012 g
<b>30 dias</b>	0,13 ± 0,012 g	0,15 ± 0,008 g

Os valores representam média ± erro padrão da média.



**Figura 01-Peso da próstata de ratos normais, falso castrados e tratados com óleo vegetal, e de ratos castrados e tratados com 0,4 mg/rato de testosterona por 3, 7, 15 e 30 dias (n=6).** Os resultados representam a média ± erro padrão. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  no teste de Duncan após ANOVA. \* diferença em relação aos ratos normais

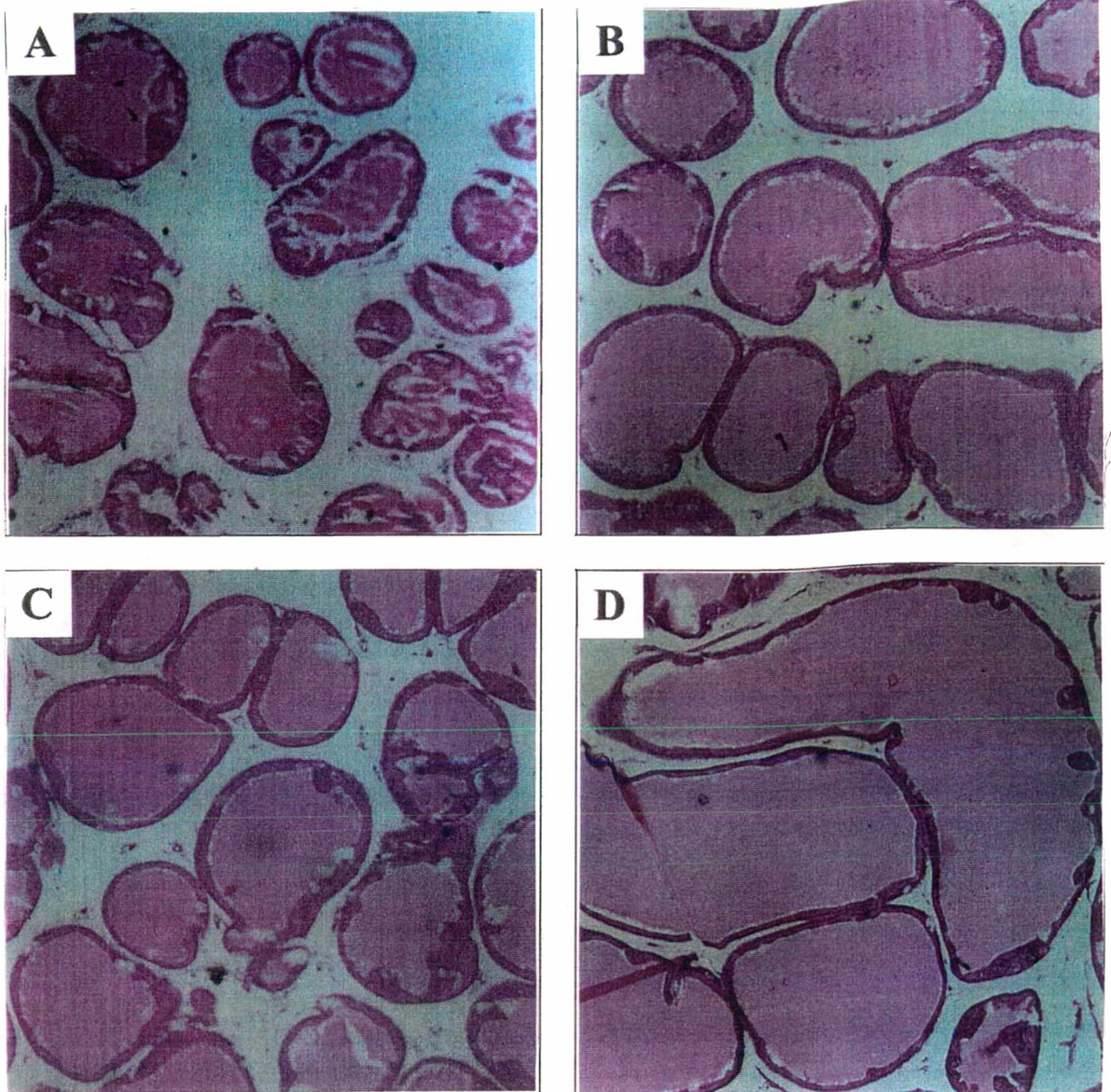


**Figura 02-Aspecto macroscópico da próstata de um rato normal (N) e de um rato considerado com hipertrofia prostática (HP) neste modelo. O rato normal foi falso castrado e tratado com óleo vegetal e o com hipertrofia prostática foi castrado e tratado com 0,4 mg/rato de testosterona por 30 dias.**

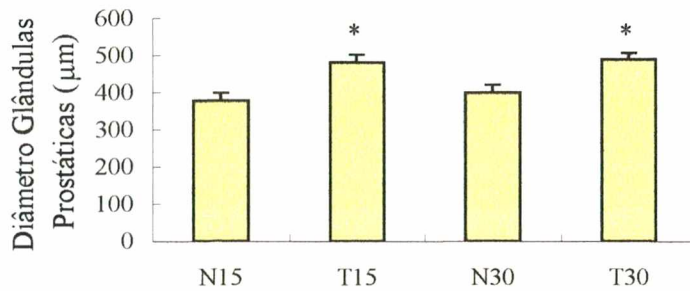
#### **4.1.2- Histologia**

Quanto ao aspecto histológico, foi observado um aumento no volume das glândulas prostáticas dependente do tempo de administração da testosterona (figura 03). Este aumento foi comprovado pela medida dos diâmetros das glândulas prostáticas (figura 04) que mostrou um aumento de 27% após 15 dias, e 22% após 30 dias de tratamento com testosterona (15 dias: normais =  $377,7 \pm 20,3\mu\text{m}$  e tratados =  $480,8 \pm 20,9\mu\text{m}$ ; 30 dias: normais =  $399,4 \pm 47,3\mu\text{m}$  e tratados =  $488,8 \pm 40,2\mu\text{m}$ ). Além disso, o percentual ocupado pelas glândulas prostáticas nos cortes histológicos (figura 05) em relação aos demais componentes da próstata, estava aumentado aproximadamente 20% após os tratamentos por 15 e 30 dias com testosterona (15 dias: normais =  $48,1 \pm 2,2\%$  e tratados =  $57,1 \pm 1,3\%$ ; 30 dias: normais =  $60,5 \pm 4,6\%$  e tratados =  $72,9 \pm 8,5\%$ ).

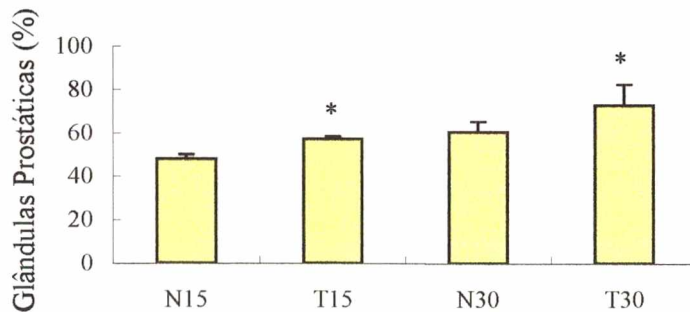




**Figura 03-Aspecto microscópico da próstata dos ratos normais e com hipertrofia prostática utilizados neste modelo. A) Próstata de um rato normal falso-castrado e tratado durante 15 dias com óleo vegetal por via intramuscular. B) Próstata de um rato castrado e tratado durante 15 dias com 0,4 mg/rato de testosterona por via intramuscular. C) Próstata de um rato normal falso-castrado e tratado durante 30 dias com óleo vegetal por via intramuscular. D) Próstata de um rato castrado e tratado durante 30 dias com 0,4 mg/rato de testosterona por via intramuscular.**



**Figura 04-Diâmetro das glândulas prostáticas de um rato normal e um rato considerado com hipertrofia prostática neste modelo.** A medida foi realizada em 5 glândulas e o resultado corresponde à média destas medidas. As glândulas avaliadas foram escolhidas aleatoriamente entre as de aspecto circular uniforme e os valores numéricos da escala foram multiplicados pelo fator de conversão para diâmetro em  $\mu\text{m}$ . O fator de conversão utilizado foi 0,837 (ocular e objetiva 10x). Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão. Para análise estatística foi utilizado o teste de Duncan após ANOVA e as diferenças consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \* diferença em relação aos ratos normais do tempo correspondente.



**Figura 05-Percentual ocupado pelas glândulas prostáticas em cortes histológicos da próstata de um rato normal e um rato considerado com hipertrofia prostática neste modelo.** A contagem foi realizada em 5 campos escolhidos aleatoriamente. A lente da ocular utilizada era composta por 7 linhas de 3 barras totalizando 21 barras e cada barra com 2 pontos totalizando 42 pontos. O percentual foi calculado a partir da soma dos pontos em cada campo sobre o total de pontos (42) e o resultado corresponde à média destas medidas nos 5 campos. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão. Para análise estatística foi utilizado o teste de Duncan após ANOVA e as diferenças consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \* diferença em relação aos ratos normais do tempo correspondente.

#### 4.1.3- Avaliação dos Parâmetros de Micção

Como parâmetros de micção, foram avaliados o volume de urina excretado em 24 horas, a frequência de micção e o volume de urina por micção. As avaliações foram realizadas em ratos normais e em ratos tratados com testosterona por 3, 7, 15 e 30 dias, com o objetivo de investigar se o modelo experimental utilizado era capaz de produzir algum efeito que pudesse ser utilizado para avaliação sintomática da HPB.

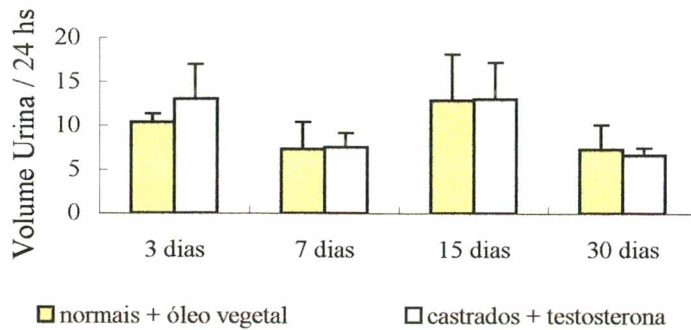
Não foram observadas diferenças significativas nos aspectos analisados (figuras 06 a 08). Entretanto, percebe-se uma tendência de diminuição do volume de urina eliminado por micção nos animais tratados com testosterona em relação aos animais normais.

Os resultados obtidos nestes experimentos estão resumidos no quadro 07.

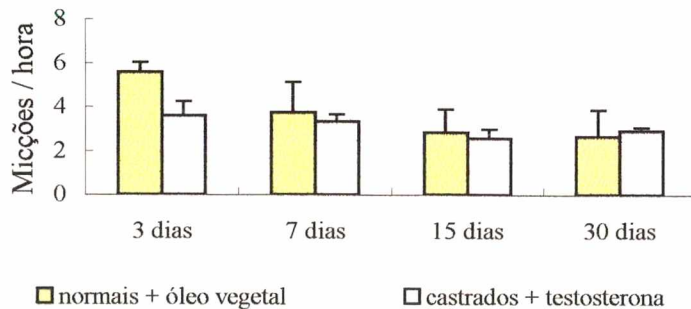
**Quadro 07-Resumo dos dados obtidos nos experimentos para avaliação dos parâmetros de micção no modelo experimental.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Tempo tratamento (dias)</b>	<b>Normais + Óleo Vegetal</b>	<b>Castrados + Testosterona</b>
<b>Volume de urina em 24hs (ml)</b>	3	10,33 ± 0,99	13,00 ± 3,94
	7	7,33 ± 3,06	7,50 ± 1,61
	15	12,83 ± 5,31	13,00 ± 4,16
	30	7,33 ± 2,72	6,67 ± 0,80
<b>Frequência micções por hora</b>	3	5,58 ± 0,44	3,58 ± 0,65
	7	3,75 ± 1,36	3,33 ± 0,31
	15	2,83 ± 1,05	2,58 ± 0,40
	30	2,67 ± 1,19	2,92 ± 0,16
<b>Volume de urina por micção (ml)</b>	30	1,31 ± 0,53	1,05 ± 0,43

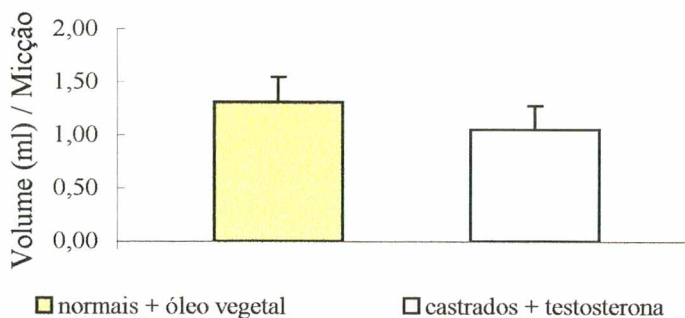
Resultados representam média ± erro padrão da média.



**Figura 06-Volume de urina eliminada em 24 horas por ratos normais, falso castrados e tratados com óleo vegetal, e por ratos castrados e tratados com 0,4 mg/rato de testosterona por 3, 7, 15 e 30 dias (n=6).** Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) entre os tratamentos dentro de um mesmo tempo, e a diferença considerada significativa quando  $p < 0,05$ .



**Figura 07-Número de micções por hora realizadas por ratos normais, falso castrados e tratados com óleo vegetal, e por ratos castrados e tratados com 0,4 mg/rato de testosterona por 3, 7, 15 e 30 dias (n=6).** Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA,) entre os tratamentos dentro de um mesmo tempo, e a diferença considerada significativa quando  $p < 0,05$ .



**Figura 08-Volume de urina por micção em ratos normais, falso castrados e tratados com óleo vegetal, e em ratos castrados e tratados com testosterona por 30 dias (6 animais por grupo).** Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) considerando a diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

#### 4.2- PESO DO RATO E DA PRÓSTATA E NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO NO SORO

Como já foi explicado em Materiais e Métodos, os animais utilizados no modelo experimental foram castrados e tratados por 7 dias com 0,4 mg/rato de testosterona para o início da hipertrofia prostática. Após este período, os animais continuaram a receber a aplicação diária de testosterona e passaram a receber diferentes tratamentos por 15 ou 30 dias.

No final de cada tratamento foi realizada a avaliação do peso corporal, a coleta de sangue e a retirada dos órgãos. O peso da próstata foi avaliado imediatamente após a sua retirada sendo a dosagem do óxido nítrico no soro realizada posteriormente.

Para uma melhor visualização, estes resultados foram divididos em 2 grupos: tratamento de 15 dias e tratamento de 30 dias.

#### 4.2.1- Tratamento de 15 dias

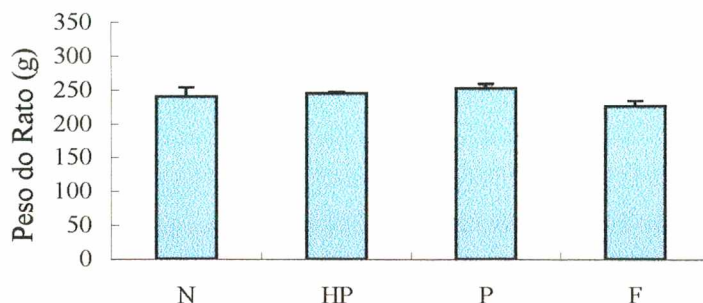
Os resultados obtidos após 15 dias de tratamento estão resumidos no quadro 08.

**Quadro 08-Resumo dos dados obtidos após 15 dias de tratamento referentes ao peso corporal, peso da próstata e níveis de óxido nítrico no soro.**

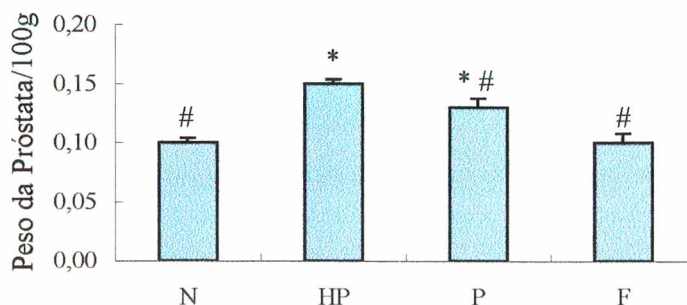
Tratamento	Parâmetro		
	Peso corporal (g)	Peso da Próstata/100g	Óxido Nítrico ( $\mu\text{M}$ )
<b>Normais</b>	240,43 $\pm$ 12,6	0,10 $\pm$ 0,004	56,04 $\pm$ 5,62
<b>Hipertrofia Prostática</b>	244,71 $\pm$ 2,33	0,15 $\pm$ 0,004	58,37 $\pm$ 6,83
<b>Permixon®</b>	252,29 $\pm$ 6,76	0,13 $\pm$ 0,008	59,50 $\pm$ 5,73
<b>Finasterida</b>	225,86 $\pm$ 7,32	0,10 $\pm$ 0,008	57,91 $\pm$ 6,44

Resultados representam média  $\pm$  erro padrão da média. Visualizar diferenças significativas nas figuras 09 a 11.

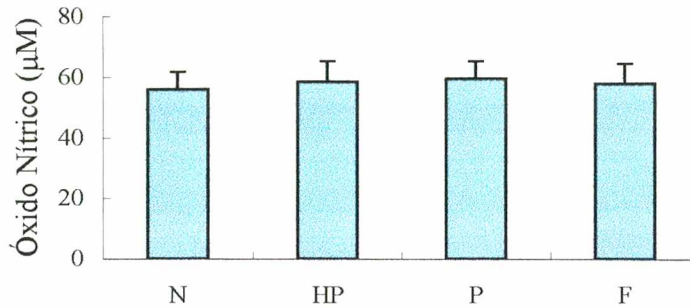
Após 15 dias de tratamento, não foram observadas diferenças significativas no peso corporal dos animais e nos níveis de óxido nítrico no soro (figura 09 e 11). Entretanto, a finasterida e o Permixon® impediram o aumento do peso da próstata, provocado pela testosterona, em 33% e 13%, respectivamente, em relação aos animais com hipertrofia prostática (figura 10).



**Figura 09-Peso dos ratos normais (N) e com hipertrofia prostática submetidos a 15 dias de tratamento com óleo vegetal (HP), Permixon® (P) e finasterida (F).** Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão (n=7). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) e as diferenças consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .



**Figura 10-Peso da próstata (g) por 100 g de peso do animal em ratos normais (N) e com hipertrofia prostática submetidos a 15 dias de tratamento com óleo vegetal (HP), Permixon® (P) e finasterida (F).** Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão (n=7). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  no teste de Duncan após ANOVA. \* diferença em relação aos ratos normais (N). # diferença em relação aos ratos com hipertrofia prostática (HP).



**Figura 11-Níveis de óxido nítrico no soro de ratos normais (N) e com hipertrofia prostática submetidos a 15 dias de tratamento com óleo vegetal (HP), Permixon® (P) e finasterida (F).** Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão (n=7). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) e as diferenças consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

#### 4.2.2- Tratamento de 30 dias

Não ocorreu alteração no peso corporal dos animais durante o período de tratamento de 30 dias, exceto nos animais tratados com L-NOArg que apresentaram uma perda de 16% do peso corporal em relação aos ratos normais (figura 12).

Quanto ao peso da próstata, com 30 dias de tratamento somente a finasterida foi capaz de impedir o aumento da próstata provocado pela testosterona (figura 13).

Na dosagem de óxido nítrico no soro dos animais, foi observada uma redução nos animais com hipertrofia prostática. Os extratos de plantas utilizados neste trabalho, extrato lipidoesterólico da *Serenoa repens* (Permixon®) e fração butanólica da *Calendula officinalis*, aumentaram a concentração de óxido nítrico no soro dos animais para níveis próximos ou superiores aos dos animais normais, e este efeito foi abolido pela administração concomitante de um inibidor da NOS (L-NOARG). Nos animais normais e com hipertrofia prostática tratados com o doador de nitratos, Isordil®, foi observada uma elevação na concentração de



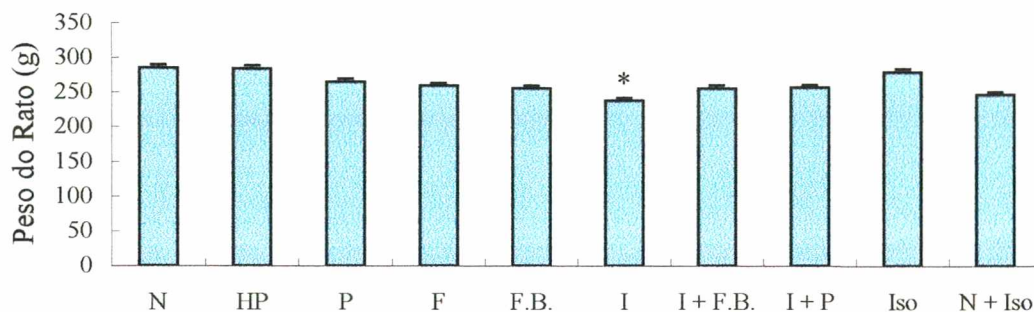
óxido nítrico muito acima dos valores encontrados nos animais normais não tratados. A finasterida não provocou alteração nos níveis de óxido nítrico, permanecendo semelhantes aos dos ratos com hipertrofia prostática tratados com óleo vegetal (figura 14).

Os dados obtidos após 30 dias de tratamento estão resumidos no quadro 09.

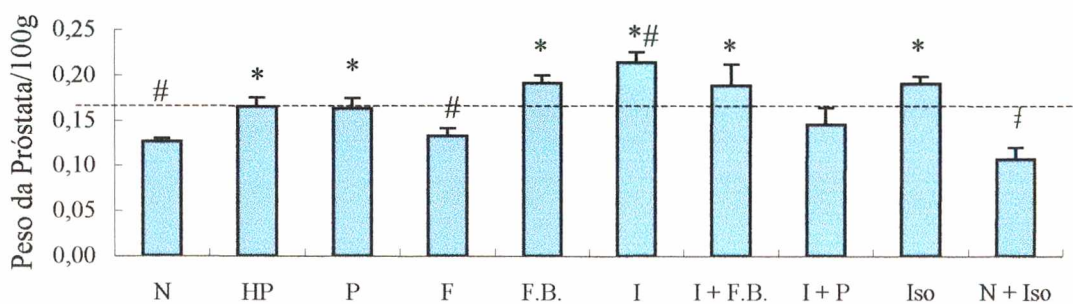
**Quadro 09-Resumo dos dados obtidos após 30 dias de tratamento referentes ao peso corporal, peso da próstata e níveis de óxido nítrico no soro.**

Tratamento	Parâmetro		
	Peso corporal (g)	Peso da Próstata/100g	Óxido Nítrico ( $\mu\text{M}$ )
<b>Normais</b>	285,43 $\pm$ 13,5	0,13 $\pm$ 0,004	57,31 $\pm$ 2,24
<b>Hipertrofia Prostática</b>	284,71 $\pm$ 6,33	0,17 $\pm$ 0,010	37,22 $\pm$ 1,79
<b>Permixon®</b>	265,43 $\pm$ 9,12	0,16 $\pm$ 0,011	59,54 $\pm$ 1,97
<b>Finasterida</b>	259,29 $\pm$ 6,49	0,13 $\pm$ 0,008	41,21 $\pm$ 1,92
<b>Fração Butanólica</b>	255,71 $\pm$ 8,22	0,19 $\pm$ 0,009	79,91 $\pm$ 4,31
<b>Inibidos</b>	238,00 $\pm$ 9,10	0,21 $\pm$ 0,011	35,91 $\pm$ 3,56
<b>Inibidos + F. Butanólica</b>	256,00 $\pm$ 4,93	0,19 $\pm$ 0,023	30,16 $\pm$ 13,4
<b>Inibidos + Permixon ®</b>	257,50 $\pm$ 2,50	0,15 $\pm$ 0,018	30,93 $\pm$ 5,20
<b>Isossorbida</b>	280,20 $\pm$ 9,15	0,19 $\pm$ 0,017	155,32 $\pm$ 5,42
<b>Normais + Isossorbida</b>	247,40 $\pm$ 10,06	0,11 $\pm$ 0,028	123,79 $\pm$ 5,72

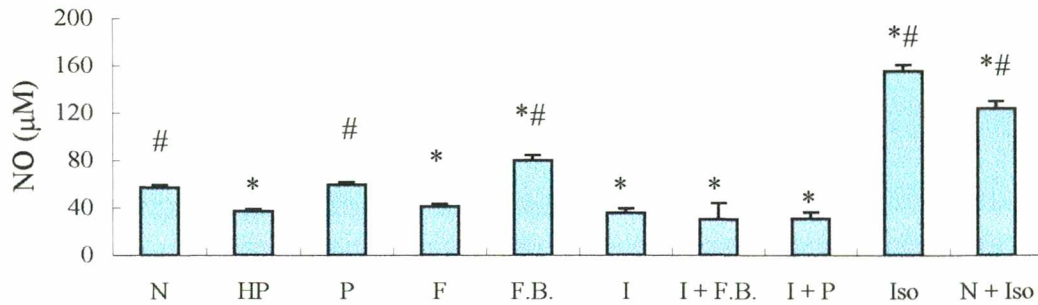
Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média. Visualizar diferenças significativas nas figuras 12 a 14 adiante.



**Figura 12-**Peso dos ratos normais tratados com óleo vegetal (N) ou Isordil® (N+Iso) e com hipertrofia prostática submetidos a 30 dias de tratamento com óleo vegetal (HP), Permixon® (P), finasterida (F), fração butanólica da *Calendula officinalis* (F.B.), L-NOARG (I), associação do L-NOARG com a fração butanólica (I+F.B.) ou com o Permixon® (I+P), e com o Isordil® (Iso). Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão (n=7). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  no teste de Duncan após ANOVA. \* diferença em relação aos ratos normais (N).



**Figura 13-**Peso da próstata calculado por 100 g de peso do animal em ratos normais tratados com óleo vegetal (N) ou Isordil® (N+Iso) e com hipertrofia prostática submetidos a 30 dias de tratamento com óleo vegetal (HP), Permixon® (P), finasterida (F), fração butanólica da *Calendula officinalis* (F.B.), L-NOARG (I), associação do L-NOARG com a fração butanólica (I+F.B.) ou com o Permixon® (I+P), e com o Isordil® (Iso). A linha tracejada representa a média do grupo com hipertrofia prostática tratado com óleo vegetal (HP). Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão (n=7). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  no teste de Duncan após ANOVA. \*diferença em relação aos ratos normais (N). # diferença em relação aos ratos com hipertrofia prostática (HP).



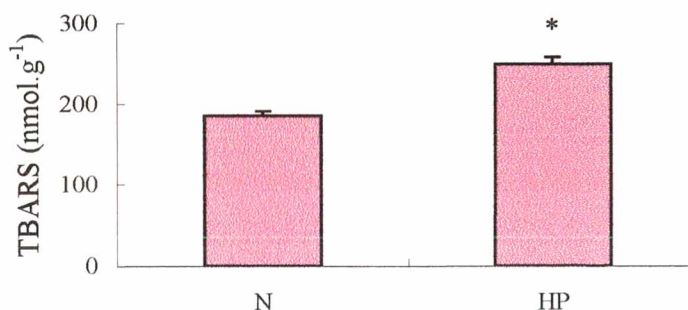
**Figura 14-Níveis de óxido nítrico no soro de ratos normais tratados com óleo vegetal (N) ou Isordil® (N+Iso) e com hipertrofia prostática submetidos a 30 dias de tratamento com óleo vegetal (HP), Permixon® (P), finasterida (F), fração butanólica da *Calendula officinalis* (F.B.), L-NOARG (I), associação do L-NOARG com a fração butanólica (I+F.B.) ou com o Permixon® (I+P), e com o Isordil® (Iso). Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão (n=7). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  no teste de Duncan após ANOVA. \* diferença em relação aos ratos normais (N). # diferença em relação aos ratos com hipertrofia prostática (HP).**

#### 4.3- ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES NO FÍGADO

O estresse oxidativo e as defesas antioxidantes foram avaliados no fígado de animais normais e de animais com hipertrofia prostática causada por 30 dias de tratamento com 0,4 mg/rato de testosterona. Os parâmetros avaliados foram a peroxidação lipídica, a concentração de glutathiona reduzida e a atividade das enzimas catalase, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase e glutathiona S-transferase.

### 4.3.1- Peroxidação Lipídica

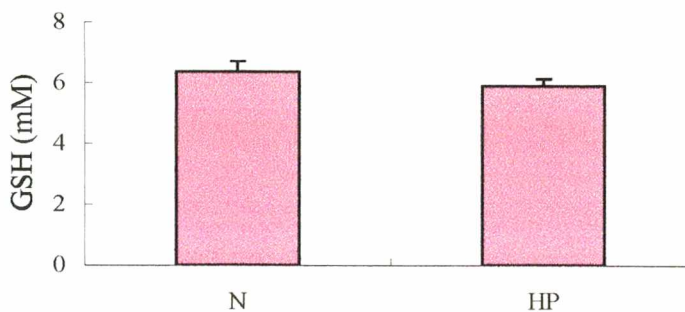
Ocorreu um aumento de 34% na peroxidação lipídica nos ratos com hiperplasia prostática, como pode ser observado na figura 15 (normais =  $185,64 \pm 5,7$ nmol/g; hipertrofia prostática =  $249,7 \pm 8,09$  nmol/g).



**Figura 15-Análise comparativa do dano celular no fígado de ratos normais (N) e ratos com hipertrofia prostática (HP).** Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão (n=7). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan e as diferenças consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \* diferença em relação aos ratos normais (N).

### 4.3.2- Defesa Antioxidante Não-Enzimática

Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas, foi determinada apenas a concentração de glutathiona reduzida, não sendo observada alteração significativa nos ratos com hipertrofia prostática em relação aos normais (figura 16). As concentrações encontradas foram  $6,35 \pm 0,34$ mM nos ratos normais e  $5,89 \pm 0,24$ mM nos ratos com hipertrofia prostática, sugerindo apenas um maior consumo de GSH no grupo com hipertrofia prostática (HP).



**Figura 16-Concentração de GSH em extrato ácido de fígado de ratos normais (N) e ratos com hipertrofia prostática (HP).** Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão (n=7). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA), e as diferenças consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

#### 4.3.3- Defesas Antioxidantes Enzimáticas

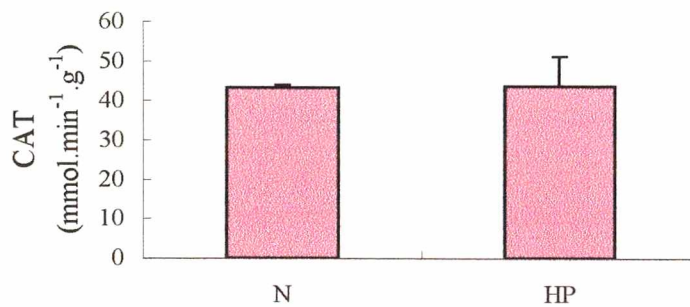
As atividades das enzimas catalase, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase e glutathiona S-transferase foram determinadas no fígado dos animais normais e dos animais com hipertrofia prostática após 30 dias de tratamento com testosterona. Os resultados obtidos estão resumidos no quadro 10.

**Quadro 10-Resumo dos dados obtidos na determinação da atividade das enzimas catalase, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase e glutathiona S-transferase em ratos normais e em ratos com hipertrofia prostática.**

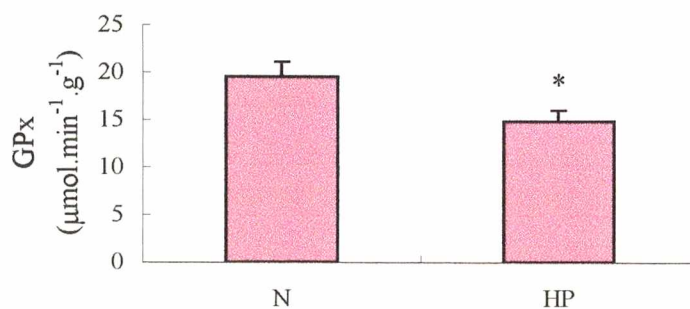
Enzima	Normais	Hipertrofia Prostática
Catalase ( $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	$43,27 \pm 0,69$	$43,61 \pm 7,42$
Glutathiona Peroxidase ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	$19,56 \pm 1,51$	$14,89 \pm 1,15$
Glutathiona Redutase ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	$0,61 \pm 0,15$	$0,14 \pm 0,02$
Glutathiona S-transferase ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	$28,18 \pm 1,52$	$13,77 \pm 2,84$

Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média. Visualizar diferenças significativas nas figuras 17 a 20 adiante.

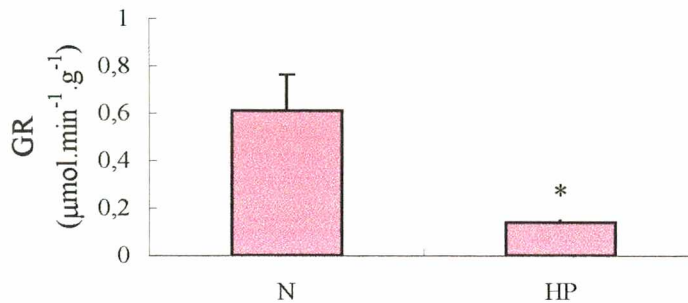
A atividade da catalase não sofreu alterações nos animais com hipertrofia prostática. Entretanto, ocorreram diminuições significativas nas atividades da glutathiona peroxidase, glutathiona redutase e glutathiona S-transferase nos animais com hipertrofia prostática (figuras 17 a 20).



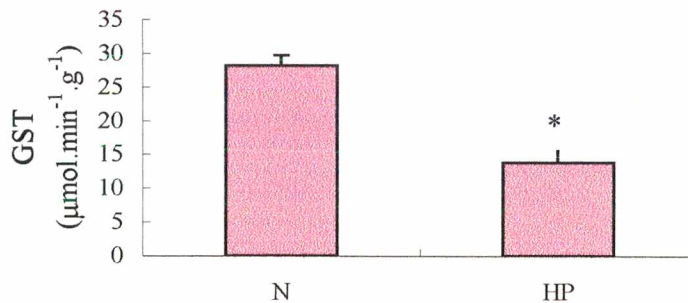
**Figura 17-Atividade da Catalase em homogenatos de fígado de ratos normais (N) e ratos com hipertrofia prostática (HP).** Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão (n=7). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA), e as diferenças consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .



**Figura 18-Atividade da Glutathiona Peroxidase em homogenatos de fígado de ratos normais (N) e ratos com hipertrofia prostática (HP).** Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão (n=7). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan, e as diferenças consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \*diferença em relação aos ratos normais (N).



**Figura 19-Atividade da Glutathione Redutase em homogenatos de fígado de ratos normais (N) e ratos com hipertrofia prostática (HP).** Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão (n=7). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan, e as diferenças consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \*diferença em relação aos ratos normais (N).

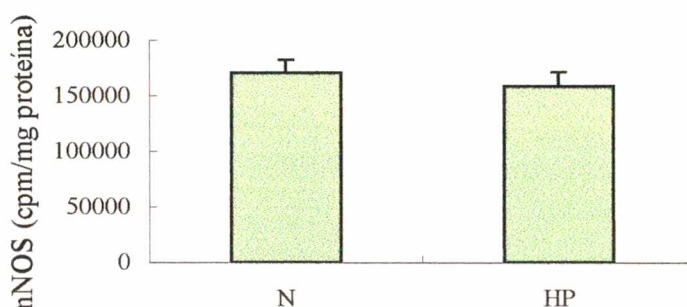


**Figura 20-Atividade da Glutathione S-transferase em homogenatos de fígado de ratos normais (N) e ratos com hipertrofia prostática (HP).** Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão (n=7). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan, e as diferenças consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \*diferença em relação aos ratos normais (N).

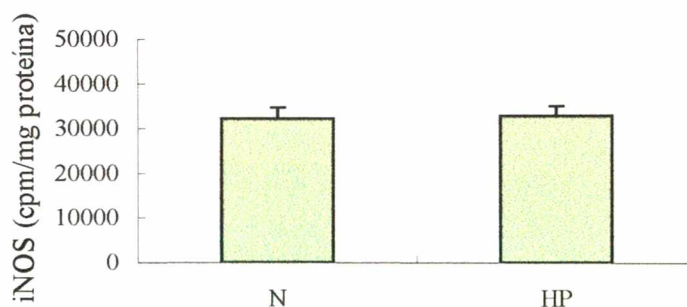
#### 4.4- ATIVIDADE DA NOS NO CEREBELO

Neste trabalho não foi possível detectar a atividade da NOS na próstata e, por isso, esta dosagem foi realizada no cerebelo de ratos normais e de ratos com hipertrofia prostática, produzida por 30 dias de tratamento com testosterona, como medida de controle. Porém, não

foram encontradas diferenças significativas neste parâmetro (figuras 21 e 22). Os valores obtidos em cpm/mg de proteína para a nNOS foram  $170810 \pm 11368$  para ratos normais e  $158747 \pm 12490$  para ratos com hipertrofia prostática. Em relação à iNOS, os valores encontrados foram  $32127 \pm 2557$  para ratos normais e  $32922 \pm 2191$  para ratos com hipertrofia prostática.



**Figura 21-Atividade da nNOS em homogenatos de cerebelo de ratos normais (N) e ratos com hipertrofia prostática (HP).** A atividade da nNOS foi calculada pela diferença entre a atividade total e a independente de cálcio. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão (n=3). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA), e as diferenças consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .



**Figura 22-Atividade da iNOS em homogenatos de cerebelo de ratos normais (N) e ratos com hipertrofia prostática (HP).** Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão (n=3). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA), e as diferenças consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .



## DISCUSSÃO

A diferença macroscópica do tamanho da próstata, observada durante a retirada do órgão, e o aumento do peso da próstata nos animais tratados com testosterona está de acordo com os dados da literatura, que mostram que os hormônios androgênicos estimulam o crescimento prostático (EHRlichman, ISAACS & COFFEY, 1981; CONSTANTINOU, 1996; HAYEK *et al.*, 1999; COPPENOLLE *et al.*, 2000; CHOO, BELLAMY & CONSTANTINOU, 2000).

O aumento de volume das glândulas prostáticas observado nos cortes histológicos, provavelmente ocorreu por um aumento na secreção do líquido prostático, pois histologicamente não foi observada hiperplasia da glândula, ou seja, aumento no número de células. Este aumento na secreção do líquido prostático ocorreu por estímulo da testosterona que estava sendo administrada aos animais. Estas observações caracterizam nosso modelo como hipertrofia prostática.

Na avaliação dos parâmetros de micção não foram observadas diferenças significativas nos aspectos analisados, embora percebeu-se uma tendência de diminuição do volume de urina eliminado por micção nos animais com hipertrofia prostática. Porém, isto não significa que o modelo utilizado não tenha produzido os sintomas de aumento da frequência de micção e diminuição do volume de urina eliminado por micção. O problema poderia estar em uma

falta de sensibilidade nos testes utilizados para as avaliações dos parâmetros miccionais, já que CONSTANTINO (1996) avaliou a influência do tratamento hormonal sobre o crescimento prostático e as características miccionais em ratos, onde observou um aumento no tamanho da próstata e na frequência de micção nos animais tratados com DHT e DHT + estrógenos, em relação aos animais normais.

A finasterida e o Permixon® impediram o aumento da próstata provocado pela testosterona após 15 dias de tratamento. Entretanto, com 30 dias de tratamento, somente a finasterida manteve este efeito. Este resultado está de acordo com os dados da literatura, pois CARRARO *et al.* (1996) realizaram um estudo comparando a eficácia do Permixon® com a da finasterida em homens com HPB moderada, e observaram que ambos melhoraram a qualidade de vida dos pacientes, aumentaram a taxa de fluxo urinário e diminuíram os sintomas prostáticos. Entretanto, a finasterida diminuiu o volume da próstata e os níveis de PSA no soro sanguíneo, enquanto que o Permixon® melhorou os sintomas com pouco efeito no volume da próstata e nenhum efeito nos níveis de PSA. A partir destes dados, foi concluído pelos autores que os dois tratamentos aliviaram os sintomas da HPB na maioria dos pacientes, porém o Permixon® apresentou pequeno efeito nos parâmetros chamados de andrógeno-dependentes, sendo sugerido que outros caminhos poderiam estar envolvidos na sintomatologia da HPB.

Na dosagem de óxido nítrico no soro dos animais não foram observadas diferenças significativas nos tratamentos por 15 dias. No entanto, após 30 dias de tratamento, ocorreu uma redução significativa nos níveis de NO no soro dos animais com hipertrofia prostática. Este resultado também está de acordo com os dados da literatura, pois BLOCH *et al.* (1997) demonstraram, através de imunohistoquímica, que há uma diminuição na inervação nitrérgica na próstata humana hiperplásica quando comparada a uma próstata normal.

Os extratos de plantas utilizados neste trabalho, extrato lipidoesterólico da *Serenoa repens* (Permixon®) e fração butanólica da *Calendula officinalis*, aumentaram a concentração de óxido nítrico no soro dos animais para níveis próximos ou superiores aos dos animais normais, e este efeito foi abolido pela administração concomitante de um inibidor da NOS (L-NOARG). O tratamento com um doador de nitrato (Isordil®) aumentou a concentração de NO no soro dos animais com hipertrofia prostática e normais para níveis muito acima da concentração encontrada na ausência deste tratamento; no entanto não alterou o parâmetro mecânico da HP, caracterizado pelo tamanho e peso da próstata. Como ainda não temos um método adequado para avaliar o componente dinâmico da HP através dos parâmetros miccionais, a análise dos doadores de NO neste sentido ficou remetida para estudos futuros. A finasterida não provocou alteração nos níveis de óxido nítrico, permanecendo semelhantes aos dos ratos com hipertrofia prostática tratados com óleo vegetal (controle). O efeito do extrato lipidoesterólico da *Serenoa repens*, aumentando os níveis de NO, poderia explicar a sua ação, já conhecida, na melhora dos sintomas clínicos sem afetar os parâmetros andrógeno-dependentes.

O decréscimo na liberação de NO causa um aumento no tônus da musculatura lisa como foi demonstrado por TAKEDA *et al.* (1995) em próstatas humanas e caninas. Desta forma, a diminuição nos níveis de NO na próstata com HPB pode influenciar os sintomas obstrutivos da HPB no homem, que geralmente ocorrem devido à estimulação  $\alpha$ -adrenérgica. Assim, um medicamento que aumente a liberação do NO no tecido pode exercer um papel antagonista nesta estimulação  $\alpha$ -adrenérgica, através de um relaxamento não-colinérgico não-adrenérgico mediado pelo NO. Esse mecanismo foi sugerido por KLOTZ *et al.* (1999), que realizaram um estudo em 32 homens (17 com sintomas urológicos) que estavam recebendo medicação com doador de nitratos (dinitrato de isossorbida) para distúrbio cardiovascular.

Naquele estudo, diversos parâmetros urinários foram avaliados antes do início do tratamento com o doador de nitratos, 2 semanas após o início da medicação, e também após 3 meses. Os parâmetros avaliados foram o fluxo urinário, a urina residual, o escore internacional de sintomas prostáticos, os níveis de PSA e o volume prostático. Este grupo observou nos pacientes sintomáticos que receberam a medicação com doador de nitratos um aumento no fluxo urinário e uma diminuição na urina residual, sem alterar o tamanho da próstata e os níveis de PSA. Assim, foi concluído que os nitratos influenciam os parâmetros de micção em homens com HPB, e este efeito poderia ser explicado pela ação dos doadores de NO no relaxamento do músculo liso.

A análise das defesas antioxidantes foi realizada apenas no fígado dos animais. Esta dosagem deveria ter sido realizada em paralelo com a dosagem no tecido prostático no sentido de verificar o efeito *in situ*. Entretanto, o volume de amostra (7 animais) não foi suficiente para realizar esta medida na próstata uma vez que estas também seriam utilizadas para a dosagem da NOS e para a análise histológica. O fígado foi, então, escolhido para esta análise por ser um órgão importante no processo de detoxicação do organismo, com uma alta concentração de enzimas antioxidantes. Neste sentido, foi observado um aumento na peroxidação lipídica no fígado dos ratos com hipertrofia prostática. Isto provavelmente ocorreu devido a uma toxicidade induzida pelos elevados níveis de andrógenos que poderiam determinar um aumento do metabolismo tecidual, e conseqüentemente aumentando a geração de ERO. Já os níveis hepáticos de glutathione reduzida e a atividade da catalase não sofreram alterações nos animais com hipertrofia prostática. Entretanto, ocorreu uma diminuição nas atividades da glutathione redutase, glutathione peroxidase e glutathione S-transferase nos animais com hipertrofia prostática, o que poderia, juntamente com os aumentos dos níveis de TBARS já mencionados, caracterizar uma condição de estresse oxidativo no grupo com hipertrofia

prostática. Os dados na literatura em relação a estes parâmetros são ainda controversos. WINTER & LIEHR (1996) observaram que não havia diferença nas atividades da catalase e da glutathione peroxidase no fígado e na próstata entre animais normais e animais tratados durante 60 dias com DHT. OLINSKI *et al.* (1995) mostraram uma diminuição na atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase em tecido prostático humano com HPB, além de um aumento nos níveis de lesões de DNA. Estes resultados, de inibições enzimáticas associadas a aumento de dano ao material genético, vem ao encontro dos obtidos no presente estudo, em que as inibições constatadas nas atividades de três enzimas (GR, GPx e GST) estão associadas com aumento do dano celular (níveis de TBARS), apesar de que não foi verificada nenhuma alteração na atividade da catalase. Por outro lado, JUNG *et al.* (1997), trabalhando com cultura de células, não observaram diferenças entre as atividades das enzimas antioxidantes catalase, glutathione redutase, glutathione peroxidase e glutathione S-transferase nos tecidos prostáticos benigno ou maligno.

No presente trabalho não foi possível detectar a atividade da NOS na próstata. Provavelmente, para detectar a atividade da enzima na próstata seria necessário a retirada da arginina endógena por métodos cromatográficos. Assim, esta dosagem foi realizada no cerebelo para posteriores comparações, uma vez que na literatura estes paralelos são realizados (CHAMNESS *et al.*, 1995). Porém, não foi encontrada nenhuma diferença significativa, como seria esperado na próstata, já que BLOCH *et al.* (1997) demonstraram, por imunohistoquímica, que ocorre uma redução na inervação nitrérgica da próstata humana com hiperplasia benigna quando comparada a uma próstata normal. Este resultado poderia ser explicado pelo trabalho de MAGEE *et al.* (1996) que, através da técnica de PCR, clonou uma nova NOS neuronal no pênis e trato urinário inferior. Estes autores sugeriram que as diferenças existentes nas ações do NO no sistema nervoso central e periférico, talvez

puddesem ser explicadas pela existência desta nova isoforma da nNOS. Um outro fator que suporta esta hipótese é o fato de que, em um experimento utilizando camundongos que tiveram o gene para nNOS cerebelar deletado por recombinação homóloga, algumas funções atribuídas ao NO como neurotransmissor, incluindo a ereção do pênis, permaneceram inalteradas (HUANG *et al.*, 1993). Além disso, existem evidências de que a atividade da NOS sofre influência dos andrógenos. CHAMNESS *et al.* (1995) demonstraram que a castração modifica de maneira significativa a atividade desta enzima na próstata do rato, porém estas alterações foram prevenidas pela reposição de andrógenos. Naquele trabalho os animais foram castrados e tratados com doses elevadas de testosterona, onde foi demonstrado que a castração induz uma vasoconstrição aguda dos vasos sangüíneos na próstata do rato, e esta vasoconstrição está associada a uma redução da atividade da NOS prostática, além de uma redução nos níveis prostáticos de GMP cíclico (HAYEK *et al.*, 1999).

## CONCLUSÕES

O modelo de hipertrofia prostática utilizado neste trabalho permite investigações sobre os parâmetros ditos andrógeno-dependentes.

A diminuição nos níveis de NO na próstata com HPB, conforme foi demonstrado, pode influenciar os sintomas obstrutivos desta patologia no homem. Estes sintomas, segundo dados da literatura, geralmente ocorrem devido à estimulação  $\alpha$ -adrenérgica. Assim, uma diminuição no relaxamento não-colinérgico não-adrenérgico mediado pelo NO na musculatura lisa prostática, pode resultar em uma exacerbação dos efeitos  $\alpha$ -adrenérgicos sobre a contração desta musculatura, com conseqüente aparecimento dos sintomas obstrutivos dinâmicos.

O efeito do extrato lipidoesterólico da *Serenoa repens*, comercializado no Brasil como Permixon®, aumentando os níveis de NO, pode representar um dos mecanismos de ação deste medicamento, o que ainda não foi demonstrado na literatura, proporcionando a melhora, já constatada, dos sintomas clínicos associados ao componente dinâmico da hiperplasia prostática benigna.

Neste mesmo sentido, o efeito da fração butanólica da *Calendula officinalis* em aumentar os níveis de NO, poderia indicá-la como um possível medicamento a ser utilizado no tratamento dos sintomas desta patologia. Esta fração, rica em flavonóides, também

apresentou propriedades antioxidantes *in vitro*, conforme trabalho em anexo<sup>1</sup>. A ação antioxidante dos flavonóides já foi amplamente comprovada na literatura. Assim, a fração butanólica da *Calendula officinalis*, devido à sua ação antioxidante, poderá atuar igualmente na atenuação do processo de estresse oxidativo da HPB. Esta ação é muito importante, uma vez que existem evidências de uma relação causal entre HPB e câncer prostático através de alterações nas defesas antioxidantes do tecido, levando às lesões no DNA. Neste particular, no presente trabalho, ficou constatada uma condição de estresse oxidativo, caracterizada por aumentos dos níveis de TBARS e inibição de três enzimas antioxidantes (GR, GPx e GST).

As plantas medicinais são bastante utilizadas na Europa, porém nas Américas o uso não é muito difundido. A falta de mecanismos de ação bem definidos na literatura para estas preparações de plantas, talvez constitua a maior limitação para a utilização. Entretanto, como já foi observado em diversos trabalhos, a eficiência destas preparações em atenuar os sintomas urológicos associados ao componente dinâmico da HPB pode residir justamente na ação sobre vários alvos moleculares. Ao contrário dos inibidores enzimáticos como a finasterida, que atuam através de um único alvo molecular. Além disso, os fitoterápicos são economicamente mais vantajosos.

---

<sup>1</sup>Versão preliminar do artigo a ser publicado (ver Anexos)



## PERSPECTIVAS

As perguntas que surgiram durante o desenvolvimento deste trabalho e que não puderam ser respondidas após a sua conclusão, seja por falta de tempo ou de financiamento, são apresentadas como perspectivas futuras:

- Dosagem dos níveis de GMPc na próstata.
- Imunodeteção das isoformas da NOS no tecido prostático.
- Efeito dos doadores de NO nos parâmetros de micção.
- Aspectos relacionados à estimulação  $\alpha$ -adrenérgica.
- Níveis mais específicos de estresse oxidativo avaliados diretamente na próstata.
- Avaliação histológica dos diferentes tratamentos realizados neste trabalho.
- Aumento do tempo de tratamento ou da dose de testosterona para avaliar se é possível a produção de uma hiperplasia (aumento no número de células) ou até mesmo de um processo maligno (câncer).
- Implementação do modelo em culturas de células.
- Avaliação da possível participação da  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase e da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPases na patogenia e no tratamento da HPB.
- Avaliação mais aprofundada da toxicidade da *Calendula officinalis*.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ADDICKS, K.; BLOCH, W.; FEELISCH, M. Nitric oxide modulates sympathetic neurotransmission at the prejunctional level. **Microscopy Research and Technique**. v.29, n.2, p.161-8, 1994.
- ADDICKS, K.; KLOTZ, T.; LOCK, C.; SCHMIDT, U.; BLOCH, W. Localization of nitric oxide synthase in the human prostate gland: histochemical and immunohistochemical study using light and electronmicroscopical techniques. In: MONCADA, S.; STAMLER, J.; GROSS, S.; HIGGS, E.A. (Eds.). **Biology of Nitric Oxide**. London: Portland Press, 1996. p.242
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**. v.105, p.121-6, 1984.
- AOKI, E.; TAKEUCHI, I.K.; SHOJI, R. Nitric oxide: an attractive signaling molecule. **Acta Histochemica and Cytochemica**. v.28, n.2, p.97-106, 1995.
- BACH, D.; SCHMITT, M.; EBELING, L. Phytopharmaceutical and synthetic agents in the treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH). **Phytomedicine**. v.3, n.4, p.309-13, 1996/97.
- BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. v.61, p.882-90, 1963.
- BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods in Enzymology**. v.105, p.295-305, 1984.
- BLOCH, W.; KLOTZ, T.; LOCH, C.; SCHMIDT, G.; ENGELMANN, U.; ADDICKS, K. Distribution of nitric oxide synthase implies a regulation of circulation, smooth muscle tone, and secretory function in the human prostate by nitric oxide. **The Prostate**. v.33, p.1-8, 1997.
- BLOODSWORTH, A.; O'DONNELL, V.B.; FREEMAN, B.A. Nitric oxide regulation of free radical-and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**. v.20, p.1707-15, 2000.

- BÖHME, G.A., BOM, C.; LEMAIRE, M.; REIBAUD, M.; PIOT, O.; STUTSMANN, J.M.; DOBLE, A.; BLANCHARD, J.C. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v.90, p.9191-4, 1993.
- BÖHME, G.A., BOM, C.; STUTSMANN, J.M.; DOBLE, A.; BLANCHARD, J.C. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. **European Journal of Pharmacology**. v.199, p.379-81, 1991.
- BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. *Serenoa repens* (Bartram) J.K. Small. **Fitoterapia**. v.68, n.2, p.99-113, 1997.
- BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCH, L.B.; MASSARO, D.J. **Oxygen, Gene Expression and Cellular Function**. New York: Marcel Decker, Inc., 1997. p.1-25
- BREDT, D.S.; HWANG, P.M.; SNYDER, S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**. v.347, p.768-70, 1990.
- BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v.87, p.682-5, 1990.
- BURNETT, A.L.; LOWENSTEIN, C.J.; BREDT, D.S.; CHANG, T.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiological mediator of penile erection. **Science**. v.257, p.401-3, 1992.
- BURNETT, A.L.; MAGUIRE, M.P.; CHAMNESS, S.L.; RICKER, D.D.; TAKEDA, M.; LEPOR, H.; CHANG, T.S.K. Characterization and localization of nitric oxide synthase in the human prostate. **Urology**. v.59, n.3, p.435-9, 1995.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **Journal of Biological Chemistry**. v.250, n.14, p.5475-5480, 1975.
- CARRARO, J.C.; RAYNAUD, J.P.; KOCH, G.; CHISHOLM, G.D.; DI SILVERIO, F.; TEILLAC, P.; DA SILVA, F.C.; CAUQUIL, J.; CHOPIN, D.K.; HAMDY, F.C.; HANUS, M.; HAURI, D.; KALINTERIS, A.; MARENCAK, J.; PERIER, A.; PERRIN, P. Comparison of phytotherapy (Permixon) with finasteride in the treatment of benign prostate hyperplasia: a randomized international study of 1098 patients. **The Prostate**. v.29, n.4, p.231-40, 1996.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**. v.21, n.1, p.99-104, 1998.
- CHAMNESS, S.L.; RICKER, D.D.; CRONE, J.K.; DEMBECK, C.L.; MAGUIRE, M.P.; BURNETT, A.L.; CHANG, T.S.K. The effect of androgen on nitric oxide synthase in the male reproductive tract of the rat. **Fertility and Sterility**. v.63, n.5, p.1101-7, 1995.

- CHOO, M.; BELLAMY, F.; CONSTANTINOU, C. E. Functional evaluation of tadenan on micturition and experimental prostate growth induced with exogenous dihydrotestosterone. **Urology**. v.55, n.2, p.292-8, 2000.
- CLARKE, M.J.; GAUL, J.B. Chemistry relevant to the biological effects of nitric oxide and metallonitrosyls. **Structure and Bonding**. v.81, p.147-81, 1993.
- CONSTANTINOU, C. E. Influence of hormone treatment on prostate growth and micturition characteristics of the rat. **The Prostate**. v.29, p.30-5, 1996.
- COPPENOLLE, F. V.; BOURHIS, X. L.; CARPENTIER, G. D.; COUSSE, H.; RAYNAUD, J.; DUPOUY, J.; PREVARSKAYA, N. Pharmacological effects of the lipidosterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon®) on rat prostate hyperplasia induced by hyperprolactinemia: comparison with finasteride. **The Prostate**. v.43, p.49-58, 2000.
- CRISTONI, A.; DI PIERRO, F.; BOMBARDELLI, E. Botanical derivatives for the prostate. **Fitoterapia**. v.71, p.S21-S28, 2000.
- CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. In: HARMAN, D.; HOLLIDAY, R.; MEYDANI, M. **Towards Prolongation of the Healthy Life Span: Practical Approaches to Intervention**. New York: New York Academy of Sciences, 1998. p.435-43
- CULOTTA, E.; KOSHLAND JR., D.E. NO news is good news. **Science**. v.258, p.1862-5, 1992.
- CURI-PEDROSA, R.; LOCATELLI, C.; ZANCANARO, V.; GEREMIAS, R.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BARRETO, F.R.M.; WILHELM FILHO, D.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. A new model to study the *in vivo* effect of drugs in prostatic hyperplasia of rats. In: Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, n.XXVIII, 1999, Caxambu/MG. **SBBq: Programa e Resumos da XXVIII Reunião Anual/1999**. São Paulo: Tec Art Editora, 1999.
- DAVIES, K.J.A. **Oxidative Damage & Repair: Chemical, Biological and Medical Aspects**. Oxford: Pergamon, 1991.
- DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A. SOSA, S.; BECKER, H.; SAAR, S.T.; ISAAC, O. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. **Planta Medica**. v.60, p.516-520, 1994.
- DI IULIO, J.L.; LI C.G.; RAND, M.J. Determination of nitric oxide synthase activity in rat, pig and rabbit prostate glands. **European Journal of Pharmacology**. v.337, p.245-9, 1997.
- DI SILVERIO, F.; FLAMMIA, G.P.; CAPONERA, M.; MAURO, M.; BUSCARINI, M.; TAVANI, M.; D'ERAMO, G. Plants extracts in BPH. **Minerva Urologica e Nefrologica**. v.45, p.143-9, 1993.
- DUKE, J.A. **Handbook of Medicinal Herbs**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.87-88.

- DUMENIL, G.; CHEMLI, R.; BALANSARD, C.; GUIRAUD, H.; LALLEMAND, M. Evaluation of antibacterial properties of marigold flowers (*Calendula officinalis* L.) and mother homeopathic tinctures of *C. officinalis* and *C. arvensis* L. **Annales Pharmaceutiques Françaises**. v.38, n.6, p.493-99, 1980.
- EHRlichMAN, R.J.; ISAACS, J.T.; COFFEY, D.S. Differences in the effects of estradiol on dihydrotestosterone induced prostatic growth of the castrate dog and rat. **Investigative Urology**. v.18, n.6, p.466-70, 1981.
- ETTINGER, S.J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Manole, 1992. p.1941
- FELDMAN, P.L.; GRIFFITH, O.W.; STUEHR, D.J. The Surprising Life of Nitric Oxide. **Chemical and Engineering News**. v.71(51), p.26-38, 1993.
- FLOHÉ, L. & GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**. v.105. p.114-121, 1984.
- FRAGA, C.G.; MARTINO, V.S.; FERRARO, G.E.; COUSSIO, J.D.; BOVERIS, A. Flavonoids as antioxidants evaluated by *in vitro* and *in situ* liver chemiluminescence. **Biochemical Pharmacology**. v.36, n.5, p.717-20, 1987.
- FRANCO, L.L. **As sensacionais 50 plantas medicinais campeãs de poder curativo**. Curitiba: Editora Santa Mônica, 1996. p.86-8
- FURCHGOTT, R.F.; CHERRY, P.D.; ZAWADZKI, J.V.; JOTHIANANDAN, D. Endothelial cells as mediators of vasodilatation of arteries. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v.6, n.2, p.336-43, 1984.
- GARTHWAITE, J.; CHARLES, S.L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests a role as intracellular messenger in the brain. **Nature**. v.336, p.185-8, 1988.
- GILBERT, D.L. (ed.) **Oxygen and Living Processes: An Inter-Disciplinary Approach**. New York: Springer, 1981.
- GOEPEL, M.; HECKER, U.; FREGE, S.; RÜBBEN, H.; MICHEL, M.C. Saw palmetto extracts potently and noncompetitively inhibit human  $\alpha_1$ -adrenoreceptors *in vitro*. **The Prostate**. v.38, p.208-15, 1999.
- GORMLEY, G.J. Finasteride: a clinical review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v.49, p.319-24, 1995.
- GRADINI, R.; REALACCI, M.; GINEPRI, A.; NASO, G.; SANTANGELO, C.; CELA, O.; SALE, P.; BERARDI, A.; PETRANGELI, E.; GALLUCCI, M.; DI SILVERIO, F.; RUSSO, A. Nitric oxide synthases in normal and benign hyperplastic human prostate: immunohistochemistry and molecular biology. **Journal of Pathology**. v.189, p.224-9, 1999.

- GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMANN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**. v.4490, p.56-8, 1981.
- GREEN, L.C.; WAGNER, D.A. GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**. v.126, n.1, p.131-8, 1982.
- GUH, J.; HWANG, T.; KO, F.; CHUEH, S.; LAI, M.; TENG, C. Antiproliferative effect in human prostatic smooth muscle cells by nitric oxide donor. **Molecular Pharmacology**. v.53, p.467-74, 1998.
- HAENEN, G.R.M.M.; JANSEN, F.P.; BAST, A. The antioxidant properties of five O-( $\beta$ -hydroxyethyl)-rutosides of the flavonoid mixture venoruton. **Phlebology**. v.1, p.10-7, 1993.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 3 ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- HAYASHI, N.; SUGIMURA, Y.; KAWAMURA, J.; DONJACOUR, A.A.; CUNHA G.R. Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. **Biology of Reproduction**. v.45, p.308-21, 1991.
- HAYEK, O.R.; SHABSIGH, A.; KAPLAN, S.A.; KISS, A.J.; CHEN, M.; BURCHARDT, T.; BURCHARDT, M.; OLSSON, C.A.; BUTTYAN, R. Castration induces acute vasoconstriction of blood vessels in the rat prostate concomitant with a reduction of prostatic nitric oxide synthase activity. **The Journal of Urology**. v.162, n.4, p.1527-31, 1999.
- HEDLUND, P.; LARSSON, B.; ALM, P.; ANDERSSON, K.E. Nitric oxide synthase-containing nerves and ganglia in the dog prostate: a comparison with others transmitters. **Histochemical Journal**. v.28, p.635-42, 1996.
- HIBBS, J.B.; TAINOR, R.R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role of L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**. v.235, p.473-6, 1987.
- HOPE, B.T.; MICHAEL, G.J.; KNIGGE, K.M.; VINCENT, S.R. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v.88, n.7, p.2811-14, 1991.
- HUANG, P.L.; DAWSON, T.M.; BREDT, D.S.; SNYDER, S.H.; FISHMAN, M.C. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. **Cell**. v.75, n.7, p.1273-86, 1993.
- IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHRURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v.84, n.24, p.9265-9, 1987.
- ISAACS, J.T.; COFFEY, D.S. Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. **Prostate**. v.2, p.33, 1989.

- JARUGA, P.; ZASTAWNY, T.H.; SKOKOWSKI, J.; DAZDAROGLU, M. OLINSKI, R. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. **FEBS Letters**. v.341, n.1, p.59-64, 1994.
- JEN, P.Y.P.; DIXON, J.S.; GEARHART, J.P.; GOSLING, J.A. Nitric oxide synthase and tyrosine hydroxylase are colocalized in nerves supplying the postnatal human male genitourinary organs. **The Journal of Urology**. v.155, p.1117-1121, 1996.
- JOSEPHY, P.D. **Molecular Toxicology**. Oxford: Oxford University Press, 1997.
- JUNG, K.; SEIDEL, B.; RUDOLPH, B.; LEIN, M.; CRONAUER, M.V.; HENKE, W.; HAMPEL, G.; SCHNORR, D.; LOENING, S.A. Antioxidant enzymes in malignant prostate cells lines and in primary cultured prostatic cells. **Free Radical Biology & Medicine**. v.23, n.1, p.127-33, 1997.
- KASTENDIECK, H. Correlations between atypical primary hyperplasia and carcinoma of the prostate. A histological study of 180 total prostatectomies. **Pathology Research and Practice**. v.169, n.3-4, p.366-87, 1980.
- KEEN, J. B.; HABIG, W. H. & JAKOBY, W. B. Mechanism for several actives from glutathione S-transferase. **Journal of Biological Chemistry**. v.251. p.6183-6188, 1976.
- KERVIN, J.F.; HELLER, M. The arginine-nitric oxide pathway: a target for new drugs. **Medicinal Research Reviews**. v.14, n.1, p.23-74, 1994.
- KISS, J.P. Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. **Brain Research Bulletin**. v.52, n.6, p.459-66, 2000.
- KLOTZ, T., MATHERS, M.J., BLOCH, W., NAYAL, W., ENGELMANN, U. Nitric oxide based influence of nitrates on micturition in patients with benign prostatic hiperplasia. **International Urology and Nephrology**. v.31, n.3, p.335-41, 1999.
- KNOWLES, R.G.; MERRETT, M.;SALTER, M.; MONCADA, S. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. **The Biochemical Journal**. v.270, p.833-6, 1990.
- KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **The Biochemical Journal**. v.298, p.249-58, 1994.
- KRUKOFF, T.L. Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. **Brain Research Reviews**. v.30, p.52-65, 1999.
- LEAN, M.E.J.; NOROOZI, M.; KELLY, I.; BURNS, J. TALWAR, D.; SATTAR, N.; CROZIER, A. Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. **Diabetes**. v.48, p.176-81, 1999.
- LITWIN, M. S. Urology. **JAMA**. v.281, n.6, p.495-6, 1999.
- LOWE, F.; FAGELMAN, E. Phytotherapy in the treatment of benign prostatic hyperplasia: an update. **Urology**. v.53, p.671-678, 1999.

- LOWE, F.C.; KU, J.C. Phytotherapy in treatment of benign prostatic hyperplasia: a critical review. **Clinical Review**. v.48, n.1, p.12-20, 1996.
- LOWE, P.N.; SMITH, D.; STAMMERS, D.K.; RIVEROS-MORENO, V.; MONCADA, S.; CHARLES, I; BOYHAN, A. Identification of the domains of neuronal nitric oxide synthase by limited proteolysis. **The Biochemical Journal**. v.314, p.55-62, 1996.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. v.193, p.265-75, 1951.
- MAGGE, T.; FUENTES, A.M.; GARBAN, H.; RAJAVASHISTH, T.; MARQUEZ, D.; RODRIGEZ, J.A.; RAJFER, J.; GONZALEZ-CADAVID, N.F. Cloning of a novel neuronal nitric oxide synthase expressed in penis and lower urinary tract. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.226, p.145-51, 1996.
- MARANDOLA, P.; JALLOUS, H.; BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. Main phytoderivatives in the management of benign prostatic hyperplasia. **Fitoterapia**. v.68, n.3, p.195-204, 1997.
- MARLETTA, M.A.; YOON, P.S.; IYENGAR, R.; LEAF, C.D.; WISHNOK, J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**. v.27, n.24, p.8706-11, 1988
- MAYER, B.; ANDREW, P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. v.358, p.127-33, 1998.
- MEIKLE, A.W. **Endocrinology**. 3 ed. DE GROOT, L.J. (ed.) London: W.B. Saunders Company, 1995. p.2459-73
- MIERSCH, W.D.E. Benigne Prostatahyperplasie. **Deutsche Apotheker Zeitung**. v.133, p.2653, 1993.
- MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R. XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. **Pharmacological Reviews**. v.49, n.2, p.137-42, 1997.
- MURAD, F. The role of nitric oxide in modulating guanylyl cyclase. **Neurotransmissions**. v.10, n.2, p.1-4, 1994.
- OHKAWA, H.; OSHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**. v. 95, n.2, p.351-8; 1979.
- OLINSKI, R.; ZASTAWNY, T.H.; FOKSINSKI, M.; BARECKI, A.; DIZDAROGLU, M. DNA base modifications and antioxidant enzyme activities in human benign prostatic hyperplasia. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 18, n.4, p.807-13, 1995.
- OLINSKI, R.; ZASTAWNY, T.H.; BUDZBON, J.; SKOKOWSKI, J.; ZEGARSKI, W.; DIZDAROGLU, M. DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues. **FEBS Letters**. v.309, n.2, p.193-8, 1992.



- PAGANO, F. Is benign prostatic hyperplasia a premalignant condition. **Prospectives**. v.1, p.1-6, 1991.
- PARTIN, A.W.; GETZENBERG, R.H.; CARMICHAEL, M.J.; VINDIVICH, D.; YOO, J.; EPSTEIN, J.I.; COFFEY, D.S. Nuclear matrix protein patterns in human benign hyperplasia and prostate cancer. **Cancer Research**. v.53, n.4, p.744-6, 1993.
- PIETTA, P.; BRUNO, A.; MAURI, P.; RAVA, A. Separation of flavonol-2-o-glycosides from *Calendula officinalis* and *Sambucus nigra* by high-performance liquid and micellar electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatography**. v.593, n.1-2, p.165-70, 1992.
- QUEIROZ, S.L.; BATISTA, A.A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Química Nova**. v.22, n.4, p.?, 1999.
- RAMOS, A.; EDREIRA, A.; VIZOSO, A.; BETANCOURT, J.; LÓPEZ, M.; DÉCALO, M. Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v.61, p.49-55, 1998.
- RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M. **Farmacologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p.409-410
- ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **Biochemical Pharmacology**. v.5, p.837-841, 1988.
- SANZ, M.J.; FERRANDIZ, M.L.; CEJUDO, M.; TERCENIO, M.C.; GIL, B.; BUSTOS, G.; UBEDA, A.; GUNASEGARAN, R.; ALCARAZ, M.J. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. **Xenobiotica**. v.24, v.7, p.589-99, 1994.
- SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress and defense mechanisms in plants: introduction. **Free Radical Biology and Medicine**. v.23, n.3, p.471-2, 1997.
- SHIPOCHLIEV, T.; DIMITROV, A. Study of the anti-inflammatory effect of a group of plants extracts. **Veterinary Sciences**. v.18, p.87-93, 1981.
- STEERS, W.D.; ZORN, B. Benign Prostatic Hyperplasia. **Disease-a-Month**. v.41, n.7, p.442-5, 1995.
- STEINER, M. S.; COUCH, R. C.; RAGHOW, S.; STAUFFER, D. The chimpanzee as a model of human benign prostatic hyperplasia. **The Journal of Urology**. v.162, p.1454-61, 1999.
- STUEHR, D.J.; MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v.82, n.22, p.7738-42, 1985.
- SUNDBERG, D.K. Chemical messenger systems. In: **Neuroscience in Medicine**. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1995. p.403-26.

- TAKEDA, M.; TANG, R.; SHAPIRO, E.; BURNETT, A.L.; LEPOR, H. Effects of nitric oxide on human and canine prostates. **Urology**. v.45, n. 3, p.440-6, 1995.
- VIDAL-OLLIVER, E.; ELIAS, R.; FAURE, F.; BABADJAMIAN, A.; CRESPI, F.; BALANSARD, G.; BOUDON, G. Flavonol glycosides from *Calendula officinalis* flowers. **Planta Medica**. v.55, p.73, 1996.
- WILT, T. J.; ISHANI, A.; STARK, G.; MACDONALD, R.; LAU, J.; MULROW, C. Saw palmetto extracts for treatment of benign prostatic hyperplasia: a systematic review. **JAMA**. v.280, p.1604-9, 1998.
- WINTER, M.L.; LIEHR, J.G. Possible mechanism of induction of benign prostatic hyperplasia by estradiol and dihydrotestosterone in dogs. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.136, p.211-9, 1996.
- WOLFF, D.J.; DATTO, G.A. Identification and characterization of a calmodulin-dependent nitric oxide synthase from GH<sub>3</sub> pituitary cells. **The Biochemical Journal**. v.285, p. 201-6, 1992.
- WRIGHT, A.S.; DOUGLAS, R.C.; THOMAS, L.N.; LAZIER C.B.; RITTMASER, R.S. Androgen-induced regrowth in the castrated rat ventral prostate: role of 5 $\alpha$ -reductase. **Endocrinology**. v.140, n.10, p.4509-15, 1999.
- ZIADA, A.; ROSENBLUM, M.; CRAWFORD, E.D. Benign prostatic hyperplasia: an overview. **Urology**. v.53, p.1-6, 1999.
- ZITTERL-EGLSEER, K.; SOSA, S.; JURENITSCH, J.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A.; BERTOLDI, M.; FRANZ, C. Anti-oedematous activities of the main triterpene diol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). **Journal of Ethnopharmacology**. v.57, p.139-44, 1997.

**ANEXOS**

**ANTIOXIDANT PROPERTIES OF *CALENDULA OFFICINALIS*.**

<sup>1</sup>Cordova, C.A.S., <sup>2</sup>Siqueira I.; <sup>2</sup>Netto C.A.; <sup>3</sup>Yunes, R.A.; <sup>3</sup>Volpato, A.M.;

<sup>4</sup>Cechinel Filho, V.; <sup>5</sup>Curi-Pedrosa, R. and <sup>1</sup>Creczynski-Pasa, T.B.

Departamentos de <sup>1</sup>Ciências Fisiológicas–Biofísica, <sup>3</sup>Química, <sup>5</sup>Bioquímica - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>4</sup>NIQFAR - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, Santa Catarina, Brazil.

Departamento de <sup>2</sup>Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil,

Author for correspondence: Tânia Beatriz Creczynski Pasa, Departamento de Ciências Fisiológicas, CCB - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade CP. 476, CEP 88040 –900 Florianópolis, SC – Brazil

E-mail: [taniac@mbox1.ufsc.br](mailto:taniac@mbox1.ufsc.br)

## Abstract

*Calendula officinalis* has many pharmacological properties and has been used for the treatment of skin disorders, pain and also as a bactericide, antiseptic and anti-inflammatory. These properties led us to study the antioxidant properties of this plant, particularly of its butanolic fraction (B.F.), since it is known that oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) reactive species participate in the pathogenesis of various human diseases. The  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  and  $\text{HO}^\bullet$  levels in the reaction medium were diminished with the increase of butanolic fraction amount with an  $\text{IC}_{50}$  of  $5.0 \pm 0.5$  mg/mL,  $1.0 \pm 0.09$  mg/mL,  $0.5 \pm 0.02$  mg/mL, respectively. The lipid peroxidation in liver microsomes, induced by Fe/ascorbate was 100% inhibited by 0.5 mg/ml of B.F. ( $\text{IC}_{50} = 0.15$  mg/ml). Its reactive antioxidant index (TRAP) (in  $\mu\text{M}$  Trolox equivalents) was  $368.14 \pm 23.03$  and total antioxidant reactivity (TAR) was calculated to be  $249.19 \pm 14.5$   $\mu\text{M}$ . The results obtained suggest that the butanolic fraction of *C. officinalis* extract possesses a significant free radical scavenging and antioxidant activity and that the supposed therapeutic efficacy of this plant could be due, in part, to these properties.

## Introduction

ROS and RNS have been viewed with great interest because of their involvement in many diseases. They have been implicated in over 100 disorders, ranging from those that affect the CNS to ischemia-reperfusion injury, inflammation, circulatory and others disorders of the cardiovascular systems effects on the gastrointestinal and immune systems and aging, (reviewed in Halliwell & Gutteridge, 1989 and references therein). Molecules with antioxidant properties in biological media could be useful in the treatment of human diseases.

*Calendula officinalis* is a native annual plant of the Mediterranean region cultivated with ornamental and medicinal interests in Europe and the Americas (Ramos *et al.*, 1998). In Brazil, the *Calendula officinalis* is called “margarida dourada” (golden daisy), “malmequer” and “maravilhas” (Franco *et al.*, 1996).

In popular medicine the flowers are used in diverse preparations, mainly ointments for the treatment of diverse dermatological conditions such as wounds, ulcers, eczema, burns, bruises, eruptions, varicose and haemorrhoids (Zitterl-Eglseer *et al.*, 1997). Many others properties have been attributed to the flowers preparations such as choleric, anti-inflammatory, analgesic, anti-cancer, bactericidal, diuretic and tonic (Duke, 1991). Its anti-inflammatory and anti-bacterial effects have been shown in many experimental and clinical studies (Dumenil *et al.*, 1980; Shipochliev, 1981).

Pharmacological studies on extracts of *Calendula officinalis* flowers have shown the presence of secondary bioactive metabolites such as flavonoids and triterpenoids (Della Loggia *et al.*, 1994; Pietta *et al.*, 1992; Vidal-Olliver *et al.*, 1996). Phytosterols, long chain fatty alcohols, free or esterified fatty acids, lectins e lignans have also been demonstrated (Akihisa *et al.*, 1996).

The flavonoids are the most important group amongst the natural antioxidants. They are polyphenolic compounds found in plants as sugar conjugates (Lean *et al.*, 1999). The natural flavonoids have been demonstrated in the literature as exerting a variety of effects both *in vitro* and *in vivo*. These biological effects are attributed principally to their action as scavengers of free radicals such as hydroxyl and superoxide anion, producing phenoxyl radicals with low reactivity, and to their capacity as chelators of ions such as  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  (Robak & Gryglewski, 1988; Haenen, Jansen & Bast, 1993; Sanz *et al.*, 1994). It has been also observed that flavonoids are able to inhibit the lipid peroxidation induced by different oxidative systems, such as,  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato,  $\text{CCl}_4$ /NADPH and  $\text{Fe}^{3+}$ -ADP/NADPH (Haenen & Bast, 1993; Sanz *et al.*, 1994). They also have bactericide, antiviral, anti-inflammatory, antiallergenic, anti-lipoperoxidant and vasodilator properties (Alcaraz *et al.*, 1985; Duarte *et al.*, 1993; Fuhrman *et al.*, 1995; Gryglewski *et al.*, 1987; Middleton *et al.*, 1992).

The free radical scavenger action is particularly important, especially in the case of superoxide anion, since it prevents or attenuates the formation of peroxynitrite and hydroxyl radical. Peroxynitrite is generated by the reaction of superoxide anion radical and nitrogen monoxide. The overproduction of peroxynitrite and hydroxyl radical constitutes a very important feature of tissue damage mechanisms during pathological processes. Since these are highly reactive molecules, they react with cellular components such as membrane lipids and proteins, thereby disturbing their function and, consequently, cellular homeostasis (for review see Wink & Mitchell, 1998 and Kehrer, 1993).

The aim of the present study was to investigate the antioxidant properties of *Calendula officinalis*, particularly the butanolic fraction (B.F.), since this fraction is enriched in polar substances such as flavonoids.

## **Material and Methods**

### ***Drugs***

The majority of the substances used in this study were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA), except the salts, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and solvents which were purchased from Merck, AG, (Darmstadt. Germany).

### ***Plant Extract***

Butanolic fraction of *Calendula officinalis* was provided by the group of Prof. Dr. Rozendo A. Yunes of the Chemistry Department – CFM/UFSC.

The *Calendula officinalis* flowers were dried and macerated in 50% ethanol for a period of 10 days, during which the solvent was concentrated in a rotatory evaporator under reduced pressure to obtain the hidroalcoholic extract. This extract was left to rest for several hours at 5°C and then filtered to remove the brown precipitate that had formed. The filtered extract was separated with butanol to obtain the butanolic fraction (Cechinel Filho & Yunes, 1998).

### ***Release and detection of nitrogen monoxide (NO<sup>•</sup>)***

Nitrogen monoxide was released by the incubation of 40mM sodium nitroprusside in a medium containing 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, at pH 7.2 and room temperature, in the presence or absence of the plant fraction. NO<sup>•</sup> was measured indirectly through nitrite formation. Nitrite was monitored spectrophotometrically at 540 nm by the Griess reagent ( $\alpha$ -naphthylethylenediamine 0.1% w/v and sulphanilamide 1% w/v in H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5% v/v ) (Green *et al.*, 1982).



### ***Production and detection of superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ )***

The superoxide anion radical was generated by the reaction catalysed by the xanthine/xanthine oxidase system, and the  $O_2^{\bullet-}$  formed was monitored spectrophotometrically at 560 nm by the reduction of nitrobluetetrazolium (NBT). The reactions were carried out in a medium containing 100  $\mu$ M xanthine, 0.1 M phosphate buffer, at pH 7.8, 600  $\mu$ M NBT and 0.04 U/ml xanthine oxidase incubated at 25°C for 10 min (Robak & Gryglewski, 1988). A control was obtained by adding 100 U/ml of superoxide dismutase (SOD), to verify the production of  $O_2^{\bullet-}$ . Xanthine oxidase activity was evaluated by spectrophotometric measurement (295nm) through the formation of uric acid derived from xanthine.

### ***Production and detection of hydroxyl radical ( $HO^{\bullet}$ )***

This method was based on the oxidation of deoxyribose by  $HO^{\bullet}$  and was adapted from Gutteridge & Halliwell (1988). Hydroxyl radical in this experiment was produced from different variations of the Fenton reaction that produce hydroxyl radical from the mixture of hydrogen peroxide and Fe(III)-EDTA-Ascorbate, Fe(III)-NTA, Fe(II) or Fe(II)-Ascorbate. The formation of  $HO^{\bullet}$  radicals was quantified using deoxyribose oxidative degradation. The principle of the assay is the quantification of the deoxyribose degradation product, malonaldehyde, by its condensation with thiobarbituric acid (TBA). The assays were carried out as follows: 0.1 mM EDTA acid, 0.1 mM ascorbate, 20  $\mu$ M  $FeCl_3$ , 10 mM  $KH_2PO_4$  at pH 7.4, 2.8 mM deoxyribose, 2.8 mM  $H_2O_2$  in the presence or in the absence of plant fraction (60 min at 37°C), except for Fe(II) for which the incubation parameters were 30 min at 25°C. The Fe(III)-NTA reaction was as follows: 25  $\mu$ M  $FeCl_3$ , 100  $\mu$ M NTA and 1,4 mM  $H_2O_2$  (20 min at 25°C). After the incubation period, 1% thiobarbituric acid (0.5 ml) and 2.8% trichloroacetic acid (0.5 ml) were added to 0.5 ml of the reaction medium and heated to 100°C for 15 min

followed by immersion in ice bath. Products of deoxyribose oxidation were determined spectrophotometrically at 532 nm.

### ***Liver Microsomal Preparations***

Microsomes were obtained by differential centrifugation with calcium aggregation. The liver were mixed to a concentration of 16.7% with 10 mM Tris-saccharose pH 7.4 and centrifuged at 600 g for 5 minutes at 0°C. The mitochondrial fraction was obtained from the supernatant, spun down at 12000 g for 10 minutes. The microsomal fraction resulted from the precipitation of the supernatant of the mitochondrial fraction obtained with 8 mM CaCl<sub>2</sub>. The precipitate was washed with 15 mM KCl / 10 mM Tris pH 7.4 and centrifuged at 25000 g for 15 minutes. After washing, microsomes were resuspended with 20 % glycerol in 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Schenkman & Cinti, 1978). The fraction was immediately placed in liquid nitrogen at -170 °C for the later determination of antioxidant activity.

### ***Lipid Peroxidation Induced by Fe<sup>2+</sup>/Ascorbate***

Lipid peroxidation was induced by the addition of 25 µM FeSO<sub>4</sub> and 500 µM ascorbate in a reaction medium containing 2 mg microsomal protein/ml and 0.1 M Tris-HCl pH 7.4. The samples were incubated for 20 minutes at 37°C and the extent of lipid peroxidation was determined by the thiobarbituric acid method (Ohkawa, 1979; Bird & Draper, 1984).

### ***Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP) Assay***

The TRAP assay is based on the inhibition of luminol-enhanced chemiluminescence produced by radicals derived from thermolysis of ABAP (2,2'-azo-bis(2-amidinopropane)

(Lissi et al., 1992; Desmarchelier et al., 1997). The reaction medium contained 0.1 M Glycine, pH 8.6, 10mM ABAP and 4mM luminol. Incubation of this mixture at 20° C generates an almost constant light intensity that was measured in a scintillation counter (Beckman) operating in the “out of coincidence” mode. ABAP is the source of peroxy radicals that react with luminol yielding chemiluminescence. The  $\alpha$ -tocopherol synthetic analogue, Trolox (200 nM), was used as the antioxidant standard. For determination of free radical scavenging potential, increasing volumes (5.0 to 10.0  $\mu$ l) of plant fraction (1 mg/ml) were added to the system. The addition of Trolox or antioxidant plant fraction's decreases chemiluminescence to basal levels, for a period (induction time) proportional to the plant fraction charge (concentration) of antioxidants (TRAP) until luminol radicals are regenerated, when the antioxidants are totally consumed. A comparison of the induction time after addition of known concentrations of Trolox and plant fraction allows the expression of TRAP values as equivalents of Trolox concentration. TRAP value was calculated according to the following equation:  $TRAP = (t_i \text{ sample} / t_i \text{ Trolox}) \times ([\text{trolox}] / \text{sample volume } (\mu\text{L})) \times \text{dilution factor}$

#### ***Total Antioxidant Reactivity (TAR) Assay***

The method was based on Lissi et al. (1992) and Desmarchelier et al. (1997). The reaction medium contained 0.1 M Glycine, pH 8.6, 2 mM ABAP and 6 mM luminol. Incubation of this mixture at 20°C generates an almost constant light intensity that was measured in a scintillation counter (Beckman) operating in the “out of coincidence” mode. The TAR values were determined by measuring the initial decrease of luminol luminescence calculated as the ratio  $I_0/I$ , where  $I_0$  is the luminescence intensity in the absence of additives and  $I$  is the luminescence intensity after addition of a small aliquot of the sample. A comparison of the ratio  $I_0/I$  of Trolox (20 nM) and plant fraction makes its possible to obtain

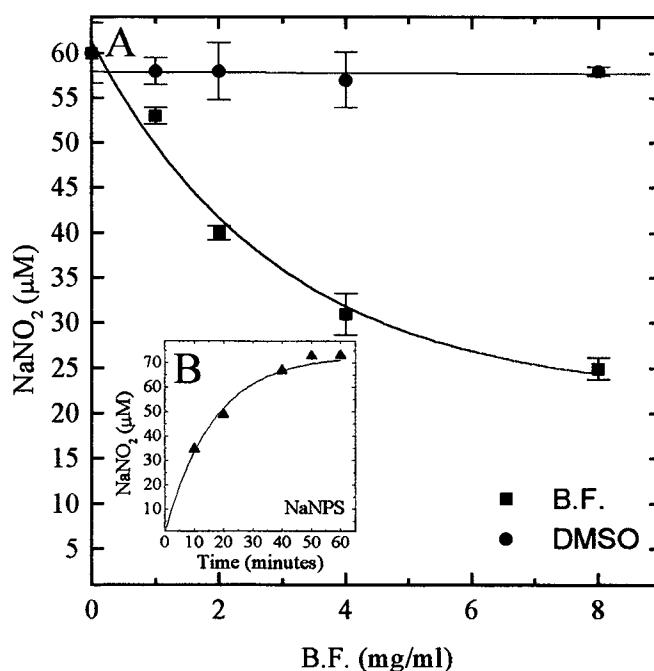
TAR values as equivalents of Trolox concentration. TAR value was calculated according to the following equation:  $TAR = (I_0/I) \times ([Trolox]/\text{sample volume } (\mu\text{l})) \times \text{dilution factor}$ .

### **Statistical Analysis**

Data were analysed by ANOVA and Duncan's Test. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

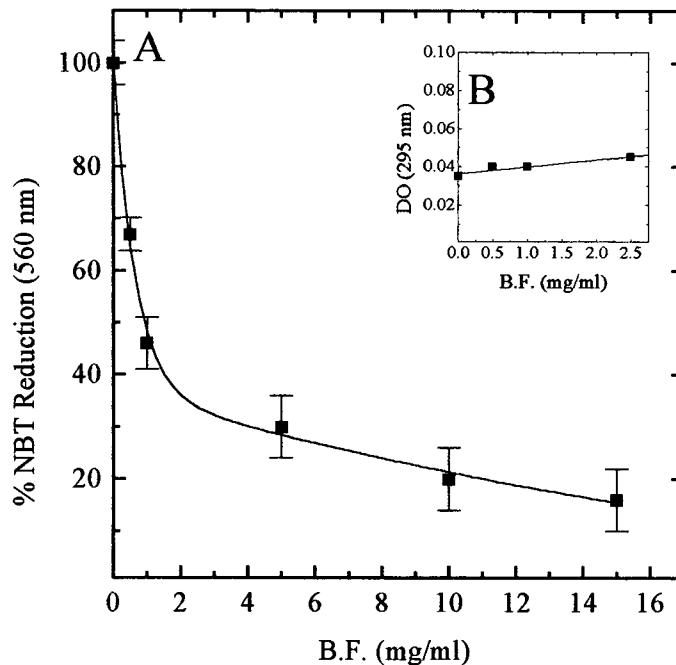
## Results

The addition of the butanolic fraction (B.F.) to the reaction medium, in which sodium nitroprusside releases  $\text{NO}^{\bullet}$ , decreased the nitrite concentration in a dose dependent manner, as shown in Fig. 1. Dimethyl sulfoxide, used to dissolve the plant fraction, did not interfere in the experiment. A control was obtained by adding B.F. in a standard curve of nitrite to verify a possible interference of the plant fraction with the Griess reagent, used to detect  $\text{NO}_2^-$  and, indirectly, the  $\text{NO}^{\bullet}$  concentration. No effect was observed in this experiment since the angular coefficients were the same for both curves with  $\text{NO}_2^-$  and with  $\text{NO}_2^- + \text{B.F.}$  (results not shown).



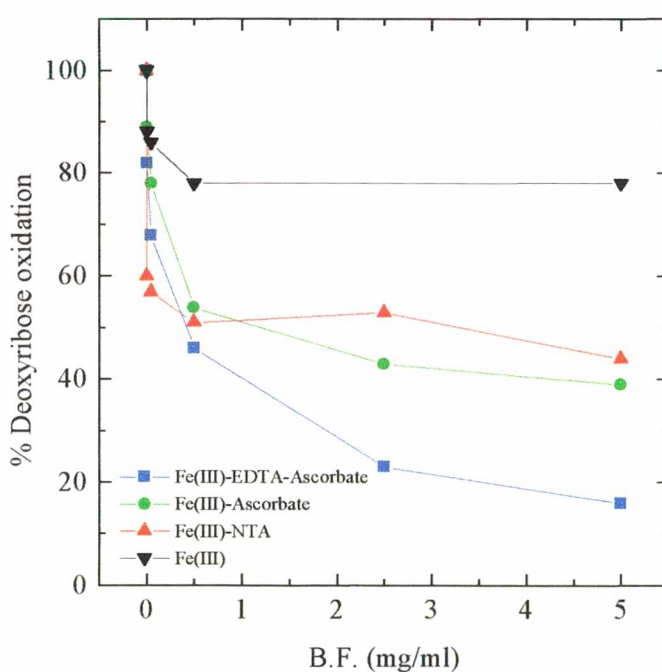
**Figure 1 – (A) Effect of the butanolic fraction (B.F.) on the release of  $\text{NO}^{\bullet}$  by sodium nitroprusside.** The presence of  $\text{NO}_2^-$  ( $\text{NO}^{\bullet}$ ) in the reaction medium was measured spectrophotometrically at 543 nm by the Griess reagent ( $n=3$ )  $\text{IC}_{50} = 5.0 \pm 0.5$  mg/ml. **(B) Release of  $\text{NO}^{\bullet}$  by NaNPS.**

The ability of the plant fraction to act as a superoxide anion scavenger was also evaluated. Fig. 2 A shows that the plant fraction was able to block NBT reduction ( $IC_{50} = 1.0 \pm 0.09 \text{ mg/mL}$ ). The plant fraction did not interfere with the xanthine/xanthine oxidase system (Fig. 2 B, inset), indicating that the decrease in superoxide anion did not result from system inhibition. To verify the production of  $O_2^{\bullet-}$ , a control was obtained by adding 100 U/ml of SOD. At this concentration, SOD inhibited the reduction of NBT by 80%. The potential production of  $H_2O_2$  by the xanthine/xanthine oxidase system would not interfere with the detection superoxide anion, since up to a concentration of 40% it does not reduce NBT (results not shown).

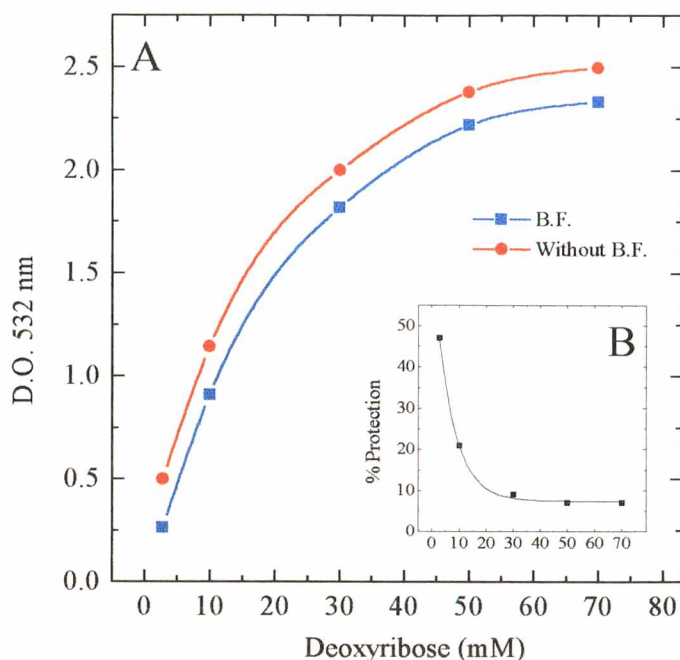


**Figure 2 – (A) Effect of the butanolic fraction (B.F.) as a superoxide anion radical ( $O_2^{\bullet-}$ ) scavenger.** The formation and detection reactions for  $O_2^{\bullet-}$  were recorded through the xanthine/xanthine oxidase system and to reduction of NBT. Results are reported as percentage of the maximal formation of  $O_2^{\bullet-}$  (100% of NBT reduced): in absorbency 100% is  $1.29 \pm 0.06$  ( $n=6$ ),  $IC_{50} = 1.0 \pm 0.10 \text{ mg/ml}$ . **(B) Effect of butanolic fraction (B.F.) on xanthine oxidase activity.** This effect was monitored spectrophotometrically at 295nm according to the formation of uric acid by xanthine oxidase.

The hydroxyl radical is one of the most aggressive oxidants known and is capable of attacking any biological molecule (Gutteridge, 1994). In this regard, the plant fraction was effective in avoiding the oxidation of deoxyribose ( $IC_{50} = 0.50 \pm 0.02$  mg/ml) (Fig. 3). However, this effect was more clearly demonstrated when the reaction took place in the presence of Fe(III) (Fe-EDTA-ascorbate and Fe-NTA) which makes the reaction slower (Fig. 3). The concentration dependence of deoxyribose on its oxidative degradation by Fenton reagents in the absence or presence of 0.5 mg/ml B.F. was also investigated (Fig. 4). To verify this effect, the concentration of deoxyribose in the reaction medium was gradually increased (Fig. 4) and the effect of the B.F. in preventing the deoxyribose oxidation by  $HO^\bullet$  decreased in a dose dependent way (Fig. 4, inset). This results indicates that the B.F. and deoxyribose are competing by  $HO^\bullet$  trapping.



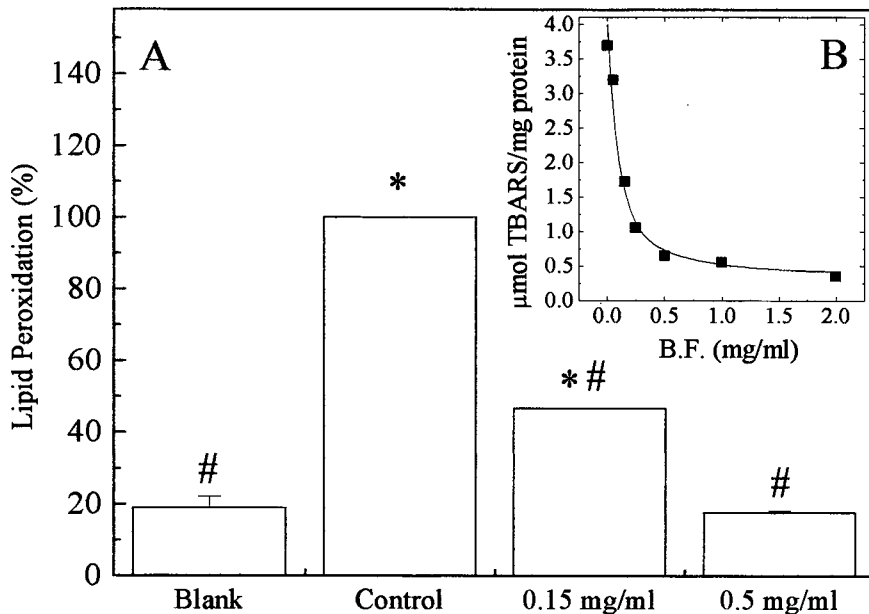
**Figure 3 - Effect of the butanolic fraction (B. F.) as a hydroxyl radical ( $HO^\bullet$ ) scavenger.** The hydroxyl radical was generated by the Fenton reaction and monitored by the deoxyribose method. Results are reported as the percentage of the maximal formation of  $HO^\bullet$  (100% of deoxyribose oxidized): in absorbency, 100% is equivalent to  $1.04 \pm 0.04$  ( $n=3$ )  $IC_{50}$   $0.5 \pm 0.02$  mg/ml.



**Figure 4 – (A) Effect of deoxyribose concentration on the oxidative degradation of deoxyribose by hydroxyl radical in the absence or presence of 0.5 mg/ml B.F.** The hydroxyl radical was generated by Fe(III)-NTA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and monitored by the deoxyribose method. **(B) Decrease of protection in deoxyribose degradation by the increase of deoxyribose concentration.**

The antioxidant effect of the butanolic fraction of *Calendula officinalis* was also evaluated in an *in vitro* model using biological material. Lipid peroxidation was induced by Fe/ascorbate in liver microsomas and the ability of the butanolic fraction of *Calendula officinalis* to block it was investigated. The results showed that 0.5 mg/ml of this plant fraction completely prevented the lipid peroxidation induced by Fe/ascorbate (Fig.5).





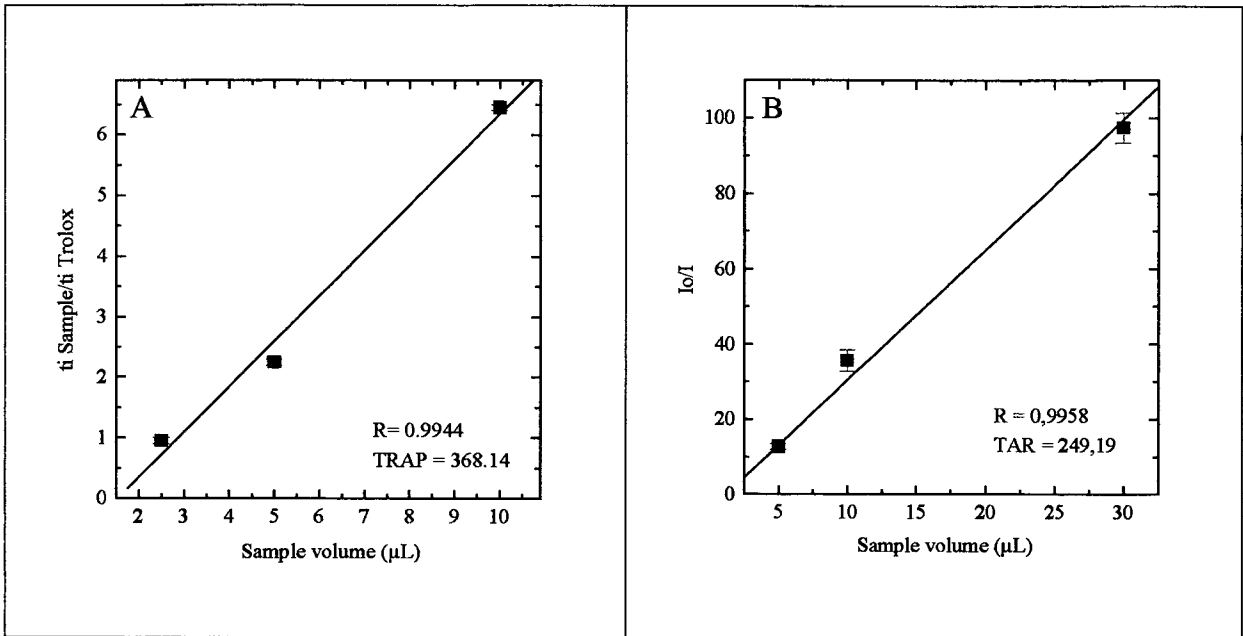
**Figure 5 – A) Effect of the butanolic fraction (B.F.) on liver microsome peroxidation induced by Fe/ascorbate.** Blank = group without addition of Fe/ascorbate to the reaction medium; Control = group with lipid peroxidation induced by Fe/ascorbate; F.B. 0.15 and F.B. 0.5 = groups with lipid peroxidation induced by Fe/ascorbate plus 0.15 or 0.5 mg/ml butanolic fraction of *Calendula officinalis*. Results are reported in  $\mu\text{molTBARS/mg}$  microsomal protein. Differences were significant when  $P < 0.05$  in Duncan's test after ANOVA.

\* difference in relation to reaction medium without Fe/Ascorbate (SP).

#difference in relation to reaction medium with Fe/Ascorbate (P)

A measure of the total reactive antioxidant potential (TRAP) and of the total antioxidant reactivity (TAR) of a substance indicates its antioxidant content and potency, respectively. Fig. 6 shows the relationship ( $R=0.9944$ ) between induction time of the sample and induction time of the Trolox (ti S/ti T) and the relationship ( $R=0.9958$ ) between Io/I and the volume of the plant fraction. TRAP and TAR values in Trolox equivalents were calculated as described previously and were  $368.14 \pm 23.03$  and  $249.19 \pm 14.45 \mu\text{M}$  respectively. The results indicate that the butanolic fraction of *Calendula officinalis* possesses several

compounds with antioxidant properties (TRAP) and that some of these can present high antioxidant reactivity (TAR).



**Figure 6 – (A) Relationship between induction time of the sample, induction time of the Trolox (ti Sample/ti Trolox ) and the volume of plant fraction. (B) Relationship between Io/I and the volume of the plant fraction.**

## Discussion

In this study, we showed that the butanolic fraction of *Calendula officinalis* presents a significant antioxidant effect *in vitro*, since B.F. was found to be a potent scavenger of nitrogen monoxide and significantly decreased, in a dose-dependent way, the concentration of nitrite after spontaneous decomposition of sodium nitroprusside; the latter result indicates that B.F. may contain compounds able to scavenge nitric oxide. However, the specificity of this assay has been questioned since nitrite is one of the final products of the reaction between nitrogen monoxide and oxygen through intermediates such as  $\text{NO}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$  and  $\text{N}_2\text{O}_3$ , so the decrease in nitrite production could be also due to an interaction of the plant fraction with other nitrogen oxides (Maccocci et al., 1994). Even though, these chemical species are not wished as biomolecules and if the B.F. interact with them, could be also a benefit of property.

The superoxide anion radical has been implicated in several pathophysiological processes, including ischemia-induced tissue damage, in which this radical is transformed to more reactive species such as the hydroxyl radical and peroxynitrite when it reacts with  $\text{NO}^\bullet$ . Superoxide is constantly generated by the electron-transport chain of mitochondria, where four electrons are transferred to molecular oxygen, reducing  $\text{O}_2$  to water: furthermore, superoxide anion occasionally leaks from these organelles. Several enzymes, such as NADPH oxidase in phagocytes and xanthine oxidase, produce this radical as a reaction product, which could contribute to tissue injury (Halliwell & Gutteridge, 1989). In this study the B.F. showed itself to be a potent superoxide scavenger.

The values of TRAP measurements indicate the quantity of antioxidants present in the plant fraction, whilst those of TAR determine its potency (Lissi et al., 1995; Desmarchelier et al., 1997). The results presented here indicate that B.F. contains several compounds with

antioxidant action (TRAP) and some molecules probably present high antioxidant reactivity (TAR).

The antioxidant effect was confirmed by an experiment with liver microsomes, in which the plant fraction inhibited the lipid peroxidation induced by Fe/Ascorbate (Sanz et al. 1994; Haenen, Jansen & Bast, 1993). The literature shows that some flavonoids are scavengers of superoxide anions (Robak & Gryglewski, 1988) while others can efficiently quench reactive nitrogen species (van Acker et al. 1995). The effect of flavonoids against membrane lipoperoxidative damage has been reported and appears to depend on their structure and ability to penetrate the lipid bilayers, on their ability to donate hydrogen atoms and scavenge the free radicals generated during lipid peroxidation, and also on their ability to act as chelators of ions such as  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  (Haenen, Jansen & Bast, 1993; Sanz *et al.*, 1994; Arora et al., 1998; Cao et al., 1997; Santos et al., 1998; Robak & Gryglewski, 1988).

The B.F. also was found to be a potent scavenger of hydroxyl radical, one of the most aggressive oxidants known and a major product arising from the high-energy ionisation of water, mainly through the Haber-Weiss and Fenton reactions, involving superoxide anion, hydrogen peroxide and transition metals. Although we did not address the site-specificity of B.F., that is whether B.F. only scavenges  $\text{HO}^\bullet$  or if it also acts as an  $\text{Fe}^{2+}$  chelator (Gutteridge & Halliwell, 1988; Halliwell, Gutteridge & Aruoma, 1987), we showed a competition between the B.F. and deoxyribose indicating a action as scavenger of  $\text{HO}^\bullet$ . Taken together, these results enable us to suggest that many of the therapeutic properties of this plant might be related to its antioxidant potential.

## References

1. Akihisa, T.; Yasukawa, K.; Oinima, H.; Kasahara, Y., Yamanouchi, S.; Takido, M.; Kumaki, K. and Tamura, T. (1996). Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry* **43**: 1255-1260.
2. Alcaraz, M.J. & Hoult, R.S. (1985). Actions of flavonoids and the novel anti-inflammatory flavone, hypolaetin-8-glucoside, on prostaglandin biosynthesis and inactivation. *Biochemical Pharmacology*. **34**: 2477-2482.
3. Arora A., Nair M., Strasburg G.M. (1988). Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radicals Biology and Medicine*. **24** (9): 1355-1363.
4. Bird, R.P.; Draper, A.H. (1984). Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. *Methods in Enzymology*. **105**: 295-305.
5. Cao G., Sofic E., Prior R. (1997). Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure- Activity Relationships. *Free Radicals Biology and Medicine*. **22** (5): 749-760.
6. Cechinel Filho, V.; Yunes, R.A. (1998). Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*. **21**(1): 99-104.
7. Della Loggia, R.; Tubaro, A. Sosa, S.; Becker, H.; Saar, S.T.; Isaac, O. (1994). The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Medica*. **60**: 516-520.
8. Demarchelier C, Repetto M, Coussio J, Llesuy S, Ciccía G (1997): Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP) and Total Antioxidant Reactivity (TAR) of Medicinal Plants used in Southwest Amazonia (Bolivia and Peru). *International Journal of Pharmacognosy*. **35**(4): 288-296.
9. Duarte, J.; Vizcaino, F.P.; Utrila, P.; Jimenez, J. (1993). Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle, structure-activity relationships. *General Pharmacology*. **24**:857-862.
10. Duke, J.A. (1991). *Handbook of Medicinal Herbs*. Boca Raton: CRC Press. p.87-88.
11. Dumenil, G.; Chemli, R.; Balansard, C.; Guiraud, H.; Lallemand, M. (1980). Evaluation of antibacterial properties of marigold flowers (*Calendula officinalis* L.) and mother homeopathic tinctures of *C. officinalis* and *C. arvensis* L. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. **38**(6): 493-499.
12. Franco, L.L. (1996). As sensacionais 50 plantas medicinais campeãs de poder curativo. Curitiba: Editora Santa Mônica. p.86-88
13. Fuhman, B; Lavy, A. & Aviram, M. (1995). Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *American Journal of Clinical Nutrition*. **61**:5549-5554.

14. Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry.*, **126**:131-138.
15. Gryglewski, R.J.; Korbut, R.; Robak, J. Swies, J. (1987). On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochemical Pharmacology.* **36**:317-322.
16. Gutteridge, J.M.C. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions.* **91**:133-140.
17. Gutteridge, J.M.C.; Halliwell, B. (1988) The deoxyribose assay: an assay for "free" hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production. *Biochemical Journal.* **253**:931-933.
18. Haenen, G.R.M.M.; Jansen, F.P.; Bast, A. (1993). The antioxidant properties of five O-( $\beta$ -hydroxyethyl)-rutosides of the flavonoid mixture venoruton. *Phlebology.* **1**: 10-7.
19. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1989). *Free Radical in Biology and Medicine.* 3ed. Oxford: Oxford University Press.
20. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.; Aruoma, O.I. (1987). The deoxyribose method: simple "test tube" assay for determination of rate constant for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry.* **165**: 165-215.
21. Kehrer, J. P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology.* **23**:21-48.
22. Lean, M.E.J.; Noroozi, M.; Kelly, I.; Burns, J. Talwar, D.; Sattar, N.; Crozier, A. (1999). Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes.* **48**: 176-181.
23. Lissi E, Pascual C, Del Castillo M. (1992). Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radical Biology and Medicine.* **18**: 153-158.
24. Marcocci L, Packer L, Droy-Lefaix M, Sakaki A, Guardes-Albert M. (1994). Antioxidant action of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Methods in Enzymology.* **234**: 462-475.
25. Middleton JR, E.; Kandaswami, C. (1992). Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemical Pharmacology.* **43**: 1167-1179.
26. Ohkawa, H.; Oshishi, N.; Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry.* **95**(2): 351-358.
27. Pietta, P.; Bruno, A.; Mauri, P.; Rava, A. (1992). Separation of flavonol-2-o-glycosides from *Calendula officinalis* and *Sambucus nigra* by high-performance liquid and micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography.* **593**: 165-170.
28. Ramos, A.; Edreira, A.; Vizoso, A.; Betancourt, J.; López, M.; Décalo, M. (1998). Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L. *Journal of Ethnopharmacology.* **61**: 49-55.
29. Robak, J.; Gryglewski, R. J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology.* **5**:837-841.
30. Santos A.C., Uyemura A.S., Lopes J.L.C., Bazon JN. (1998). *Free Radical Biology and Medicine.* **24** (9): 1455-1461.

31. Sanz, M.J.; Ferrandiz, M.L.; Cejudo, M.; Terencio, M.C.; Gil, B.; Bustos, G.; Ubeda, A.; Gunasegaran, R.; Alcaraz, M.J. (1994). Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. *Xenobiotica*. **24**(7): 589-99.
32. Schenkman, J.B.; Cinti, D.L. (1978). *Methods in Enzymology*. **52**:83.
33. Shipochliev, T.; Dimitrov, A. (1981). Study of the anti-inflammatory effect of a group of plants extracts. *Veterinary Sciences*. **18**: 87-93.
34. van Acker, S.; Tromp, M.N.L.; Haenen, G.R.M.; van der Vijgh, W.J.F.; Bastr, A. (1995) Flavonoids as scavenger of nitric oxide radical. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **214**: 755-759.
35. Vidal-Olliver, E.; Elias, R.; Faure, F.; Babadjamian, A.; Crespin, F.; Balansard, G.; Boudon, G. (1996). Flavonol glycosides from *Calendula officinalis* flowers. *Planta Medica*. **55**: 73.
36. Wink, D. A.; Mitchell, J. B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*. **25**:434-456.
37. Zitterl-Eglseer, K.; Sosa, S.; Jurenitsch, J.; Schubert-Zsilavecz, M.; Della Loggia, R.; Tubaro, A.; Bertoldi, M.; Franz, C. (1997). Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *Journal of Ethnopharmacology*. **57**: 139-44.