

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-HIPERPLÁSICO PROSTÁTICO DE EXTRATO E
FRAÇÕES DE *Calendula officinalis* E ALGUNS FITOSTERÓIS EM RATOS**

Dissertação apresentada por **TATIANA SCHOENFELDER** para obtenção do Grau de
Mestre em Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa

**FLORIANÓPOLIS
2003**

***Este trabalho é dedicado a meus pais,
Erci e Teresita que desde o princípio de minha
vida me incentivaram, respeitando as minhas
escolhas de vida.***

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Rozangela pela orientação, preocupação, seriedade, competência no desenvolvimento deste trabalho. Pela preocupação com minha carreira profissional e apoio nos momentos difíceis.

À profa. Dra. Mirian de Barcellos Falkenberg e profa Dra. Tânia S. Frode pela seriedade com que coordenaram e coordenam o programa de pós-graduação.

Aos professores que me deram apoio no ingresso do meu mestrado: profa. Dra. Mirian de Barcellos Falkenberg, profa Luciana M. Kerber, profa. Dra. Fátima M. Barreto Silva.

Ao professor Rosendo A. Yunes, por suas considerações e sugestões dos compostos testados; bem como fornecimento dos extratos;

A profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira pelo fornecimento dos extratos;

Aos colegas de laboratório: Irma Jean, Reginaldo, Lorena, Ana Karina, Tatiani, Graziella, Rúbia, Gisele, Jussara pelo companheirismo e ajuda, e principalmente à Graciele, companheira de experimento durante toda a parte experimental.

A todos que trabalham no laboratório da professora Fátima Mena Barreto, e Tânia Pasa pelo apoio e uso dos equipamentos.

A profa. Cristina da fisiologia que nos ensinou a técnica cirúrgica de castração.

Ao prof. Dr. Danilo pelas suas correções e sugestões.

À Salete e a Márcia por sua dedicação com que desempenha suas funções.

Aos amigos Rosilene, Sirlei, Eliane, Mirian e Fernando, Cinira pelas palavras de amizade e companheirismo.

A toda a minha família pela torcida e encorajamento;

Aos meus pais, pela paciência, compreensão e muita força nos momentos difíceis;

Ao meu querido irmão pela sua paciência, apoio, companheirismo e “ajuda técnica” em todos os momentos.

Ao Cleber, meu amor, quem se dedicou a me dar momentos de muita alegria, felicidade, compreensão, carinho durante toda esta caminhada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	4
3 REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1 PRÓSTATA	5
3.2 HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA.....	7
3.3 ETIOLOGIA DA HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA.....	8
3.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NA HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA.....	10
3.5 5- α -REDUTASE	13
3.6 RECEPTORES ADRENÉRGICOS.....	14
3.7 TRATAMENTOS PARA HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA	15
3.7.1 Tratamento cirúrgico.....	15
3.7.2 Tratamento medicamentoso.....	16
3.7.2.1 Antagonistas dos receptores α -adrenérgicos	16
3.7.2.2 Supressores androgênicos	17
3.8 FITOTERAPIA NA HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA	21
3.8.1 <i>Serenoa repens</i>.....	22
3.8.2 <i>Pygeum africanum</i>.....	24
3.8.3 <i>Urtica dioica</i>	24
3.8.4 Fitosteróis	25
3.9 <i>CALENDULA OFFICINALIS</i>	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 REAGENTES	30
4.1.1 Extrato e frações purificadas da <i>C. officinalis</i>.....	30
4.1.2 Reagentes e solventes.....	32
4.2 ANIMAIS.....	32
4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	33

4.3.1 Modelo para indução da hiperplasia prostática <i>in vivo</i>	33
4.3.2 Método de castração	35
4.3.3 Preparação de homogenato de próstata e extração de andrógenos	36
4.4 AVALIAÇÕES PONDERAIS E BIOQUÍMICAS.....	37
4.4.1 Peso da próstata e vesícula.....	37
4.4.2 Dosagem de Colesterol Total	37
4.4.3 Dosagem da atividade da fosfatase ácida.....	38
4.4.4 Dosagem da concentração de DHT e Testosterona	38
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	39
5 RESULTADOS.....	40
5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERPLÁSICO PROSTÁTICO DA <i>C. OFFICINALIS</i>	40
5.1.1 Efeito anti-hiperplásico prostático de diferentes frações e extrato de <i>C. officinalis</i> 40	
5.1.1.1 Peso da próstata	40
5.1.1.2 Peso da vesícula seminal	41
5.1.1.3 Atividade da fosfatase ácida.....	42
5.1.1.4 Níveis séricos de colesterol total	44
5.1.1.5 Níveis de testosterona tecidual.....	44
5.1.1.6 Níveis de DHT tecidual	45
5.2 ESTUDO DOSE-DEPENDENTE COM A FRAÇÃO DICLOROMETÂNICA DE <i>C.OFFICINALIS</i>	47
5.2.1 Peso da próstata.....	47
5.2.2 Peso da vesícula seminal	48
5.2.3 Atividade da Fosfatase ácida	49
5.2.4 Níveis séricos de colesterol total	50
5.2.5 Níveis de testosterona tecidual	51
5.2.6 Níveis de DHT tecidual.....	52
5.3 EFEITO ANTI-HIPERPLÁSICO PROSTÁTICO DE FITOSTERÓIS.....	54
5.3.1 Peso da próstata.....	54
5.3.2 Peso da vesícula seminal	55
5.3.3 Atividade da fosfatase ácida	56
5.3.4 Níveis séricos de colesterol total	57
5.3.5 Níveis teciduais de testosterona.....	58
5.3.6 Níveis teciduais de DHT	59
6 DISCUSSÃO	61
7 PERSPECTIVAS.....	69
8 CONCLUSÕES	71
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
10 ANEXOS	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de localização da próstata no homem (UNIGES, 2002).....	5
Figura 2. Corte histológico do tecido prostático mostrando o tecido glândular e muscular(COTRAN, et al., 1996).....	6
Figura 3. Projeção transversal da próstata (TANAGHO, et al., 1994).....	6
Figura 4. Estrutura química da finasterida	20
Figura 5. Estrutura química dos principais fitosteróis encontrados em plantas.	26
Figura 6. Foto de <i>C. officinalis</i>	27
Figura 7- Método de castração; a: rato em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica; b: localização e incisão do testículo; c: corte do tecido que rodeia o testículo; d: retirada do testículo da bolsa escrotal; e: cordão espermático; f: cordão espermático pressionado por tesoura hemostática; g: sutura do tecido.....	36
Figura 8 Peso da próstata (mg/100g) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP), tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), extrato lipoesterólico de <i>S. repens</i> (SR, 12 mg/kg), fração supercrítica (SC, 12 mg/kg), fração diclorometânica (DC, 12 mg/kg) e extrato bruto hidroalcoólico (EB, 300 mg/kg) de <i>C. officinalis</i> . Todos os resultados foram expressos em termos de média ± EPM, n=6, sendo que (a), (a'), (a'') representam diferenças significativas em relação ao controle HP para p<0,05, p<0,01 e p<0,001 respectivamente.	41
Figura 9. Peso da vesícula seminal (mg/100g) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásico (HP), ratos tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), extrato lipoesterólico de <i>S. repens</i> (SR, 12 mg/kg), fração supercrítica (SC, 12 mg/kg), fração diclorometânica (DC, 12 mg/kg) e extrato bruto hidroalcoólico (EB, 300 mg/kg) de <i>C. officinalis</i> . Todos os resultados foram expressos em termos de média ± EPM, n=6, sendo que (a) representa diferença significativa em relação ao grupo controle HP.....	42
Figura 10. Atividade da fosfatase ácida (U/L) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP) tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), extrato lipoesterólico de <i>S. repens</i> (SR, 12 mg/kg), fração supercrítica (SC, 12 mg/kg), fração diclorometânica (DC, 12 mg/kg) e extrato bruto hidroalcoólico (EB, 300 mg/kg) de <i>C. officinalis</i> . Todos os resultados foram expressos em termos de média ± EPM, n=6, sendo que (a') e (a'') representam diferenças significativas em relação ao controle HP (p<0,01 e p<0,001, respectivamente) e (d'), (d'') expressam diferenças significativas em relação à finasterida (p<0,01 e p<0,001).....	43
Figura 11. Valores de colesterol total (mg/dL) de ratos dos rato normais (falso castrados) (NR), hiperplásico (HP), tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), extrato lipoesterólico de <i>S. repens</i> (SR, 12 mg/kg), fração supercrítica (SC, 12 mg/kg), fração diclorometânica (DC, 12 mg/kg) e extrato bruto hidroalcoólico (EB, 300 mg/kg) de <i>C. officinalis</i> . Todos os resultados foram expressos em termos de média ± EPM, n=6, sendo que (a) representa diferença significativa em relação ao grupo controle hiperplásico (p<0,05).	44
Figura 12. Níveis de testosterona tecidual (pg/100mg de tecido prostático)de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP) tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), extrato lipoesterólico de <i>S. repens</i> (SR, 12 mg/kg), fração	

supercrítica (SC, 12 mg/kg), fração diclorometânica (DC, 12 mg/kg) e extrato bruto hidroalcoólico (EB, 300 mg/kg) de <i>C. officinalis</i> . Todos os resultados foram expressos em termos de média ± EPM, n=6.	45
Figura 13. Níveis de DHT tecidual (ng/100mg de tecido prostático) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP) tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), extrato lipoesterólico de <i>S. repens</i> (SR, 12 mg/kg), fração supercrítica (SC, 12 mg/kg), fração diclorometânica (DC, 12 mg/kg) e extrato bruto hidroalcoólico (EB, 300 mg/kg) de <i>C. officinalis</i> . Todos os resultados foram expressos em termos de média ± EPM, n=6, sendo que (a'') representa diferença significativa em relação ao controle HP para p<0,001.	46
Figura 14. Peso da próstata (g/100g) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP) tratados durante 30 dias (V.O.) com extrato lipoesterólico de <i>S. repens</i> (SR, 12 mg/kg), fração diclorometânica de <i>C. officinalis</i> (1, 12, 80 mg/kg). Todos os resultados foram expressos em termos de média ± EPM, n=6, sendo que (a) e (a') representam diferenças significativas em relação ao controle hiperplásico (p<0,05 e p<0,01, respectivamente).	48
Figura 15. Peso da vesícula seminal (g/100g) de ratos normais (falso castrados) (NR) e hiperplásico (HP), ratos tratados durante 30 dias (V.O.) com extrato lipoesterólico de <i>S. repens</i> (SR, 12 mg/kg) e fração diclorometânica de <i>C. officinalis</i> (1, 10, 80 mg/kg). Todos os resultados foram expressos em termos de média ± EPM, n=6. (a) diferença significativa em relação ao grupo controle hiperplásico para p<0,05.	49
Figura 16. Atividade da fosfatase ácida (U/L) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP) tratados durante 30 dias (V.O.) com extrato lipoesterólico de <i>S. repens</i> (SP, 12 mg/kg), fração diclorometânica de <i>C. officinalis</i> (1, 12, 80 mg/kg). Todos os resultados foram expressos em termos de média ± EPM, n=6, sendo que (a), (a'), (a'') representam diferenças significativas em relação ao controle hiperplásico para p<0,05, 0,01 e 0,001, respectivamente.	50
Figura 17. Valores de colesterol total (mg/dL) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásico (HP), tratados durante 30 dias (V.O.) com extrato lipoesterólico de <i>S. repens</i> (SR, 12 mg/kg) e fração diclorometânica de <i>C. officinalis</i> (1, 12, 80 mg/kg). Resultados expressos em média ± EPM, n=6.	51
Figura 18. Níveis de testosterona tecidual (pg/100mg tecido prostático) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP) tratados durante 30 dias (V.O.) com extrato lipoesterólico de <i>S. repens</i> (SP, 12 mg/kg), fração diclorometânica de <i>C. officinalis</i> (1, 12, 80 mg/kg). Todos os resultados foram expressos em termos de média ± EPM, n=6, sendo que (a'') representa diferença significativa em relação ao controle hiperplásico (p<0,001), e (b'), (b'') representam diferenças significativas em relação ao controle normal (p<0,01 e 0,001), respectivamente, e (c'') representa diferença significativa em relação à <i>S. repens</i> (p<0,001).	52
Figura 19. Níveis de DHT tecidual (ng/100 mg tecido prostático) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP) tratados durante 30 dias (V.O.) com extrato lipoesterólico de <i>S. repens</i> (SP, 12 mg/kg), fração diclorometânica de <i>C. officinalis</i> (1, 12, 80 mg/kg). Todos os resultados foram expressos em termos de média ± EPM, n=6, sendo que (a), (a') representam diferenças significativas em relação ao controle hiperplásico (p<0,05 e 0,01 respectivamente), e (c) representa diferença significativa em relação à <i>S. repens</i> (p<0,05).	53
Figura 20. Peso da próstata (mg/100g) de ratos normais (falso castrados) (NR) e hiperplásicos (HP), tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), e diferentes fitosteróis (12 mg/kg): β-sitosterol (BS); estigmastadienona (EN); estigmasterol (EL); estigmastanol (ET). Todos os resultados são expressos em termos	

de média ± EPM, n=6, Sendo que (a), (a'), (a'') representam diferenças significativas em relação ao controle hiperplásico (p<0,05, 0,01 e 0,001. respectivamente).	55
Figura 21. Peso da vesícula seminal (mg/100g rato) de ratos normais (falso castrados) (NR) e hiperplásicos (HP) durante 30 dias (V.O.), tratados com finasterida (FN, 4 mg/kg), e diferentes fitosteróis (12 mg/kg): β-sitosterol (BS); estigmastadienona (EN); estigmasterol (EL); estigmastanol (ET). Todos os resultados são expressos em termos de média ± EPM, n=6, sendo que (a') representa diferença significativa em relação ao grupo controle hiperplásico (p<0,01).....	56
Figura 22. Atividade da fosfatase ácida (U/L) de ratos normais (falso castrados) (NR), ratos hiperplásicos (HP), tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), e diferentes fitosteróis (12 mg/kg): β-sitosterol (BS); estigmastadienona (EN); estigmasterol (EL); estigmastanol (ET). Todos os resultados expressos em termos de média ± EPM, n=6, sendo que (a'') representa diferença significativa em relação ao controle hiperplásico para p<0,001, e (b'), (b'') representam diferenças significativas em relação ao grupo controle normal para p<0,01 e 0,001, respectivamente.....	57
Figura 23. Níveis de colesterol (mg/dL) dos ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP), tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), e diferentes fitosteróis (12 mg/kg): β-sitosterol (BS); estigmastadienona (EN); estigmasterol (EL); estigmastanol (ET). Todos os resultados estão expressos em termos de média ± EPM, n=6.....	58
Figura 24. Níveis teciduais de testosterona (pg/100mg) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP), tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), e diferentes fitosteróis (12 mg/kg): β-sitosterol (BS); estigmastadienona (EN); estigmasterol (EL); estigmastanol (ET). Todos os resultados foram expressos termos de média ± EPM, n=6, sendo que (a), (a'') representam diferenças significativas em relação ao controle hiperplásico (p<0,05 e 0,001, respectivamente).	59
Figura 25. Níveis séricos de DHT (ng/100mg) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP), tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN,4 mg/kg), e diferente fitosteróis (12 mg/kg): β-sitosterol (BS); estigmastadienona (EN); estigmasterol (EL); estigmastanol (ET). Todos os resultados foram expressos em termos de média ± EPM, n=6, sendo que (a), (a') e (a'') representam diferenças significativas em relação ao controle hiperplásico (p<0,05 p<0,01 e 0,001, respectivamente), e (c), (c') representam diferenças significativas em relação à finasterida para p<0,05 e 0,01, respectivamente.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamento de ratos com diferentes frações e extrato de <i>C. officinalis</i> , e alguns fitosteróis	34
Tabela 2. Tratamento de ratos com diferentes concentrações da fração diclorometânica de <i>C. officinalis</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH: corticotrofina

AR: receptor androgênico

AUASI: American Urological Association Symptom Index

BS: β -sitosterol

CEUA: comitê de ética no uso de animais

CRISP: Central de Radioimunoensaio de São Paulo

DC: fração diclorometânica

DHT: diidrotestosterona

E: estradiol

EB: extrato bruto hidroalcoólico

EGF: fator de crescimento epidérmico

EL: estigmasterol

EN: estigmastadienona

EPM: erro padrão da média

ERK: extracellular signal-regulated kinase

ET: estigmastanol

FGF: fator de crescimento de fibroblasto

FN: finasterida

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofina

HBP: hiperplasia benigna de próstata

HIV: vírus da imunodeficiência humana

HP: hiperplásicos

IGF: fator de crescimento insulínico

IPSS: International Prostate Symptom Score

LH: hormônio luteinizante

MAPFs: proteínas kinases de ativação mitogênica

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NR: ratos normais

PSA: antígeno prostático específico

SAPK: stress-activated protein kinase

SC: fração supercrítica

SPI: Symptom Problem Index

SR: extrato lipoesterólico de *S. repens*

T: testosterona

TE: tempo estático

UEPG: Universidade Estadual de Ponta Grossa

VM: válvula micrométrica

V. O.: via oral

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito anti-hiperplásico prostático do extrato bruto hidroalcoólico, fração supercrítica e diclorometânica da *Calendula officinalis* e alguns fitosteróis. Foram utilizados: ratos machos de 40 dias (peso: 140 g, n= 6) foram castrados e submetidos a tratamento com testosterona (T 2,4 mg/kg rato) durante 7 dias para indução da hiperplasia prostática (HP). Posteriormente, foram submetidos a tratamento por 30 dias com fração supercrítica (SC12 mg/kg), fração diclorometânica (DCM 1,12 e 80 mg/kg) e extrato bruto hidroalcoólico (EB 300 mg/kg) de *C. officinalis* e alguns fitosteróis como β -sitosterol (BS), estigmastadienona (EN), estigmasterol (EL), estigmastanol (ET). Após tratamento, os ratos foram sacrificados, sendo o sangue coletado para análise de fosfatase ácida (FA) e colesterol. A próstata e a vesícula seminal foram retiradas e pesadas para comparação com o grupo controle e medidas das concentrações de T e dihidrotestosterona (DHT). O peso da próstata (PP) para extrato e frações apresentou redução estatisticamente significativa de 43% e 54% para DCM e SC respectivamente; FA apresentou redução de 37%, e 43% para SC e EB. A DHT apresentou uma redução de 59%, 43% e 39% para SC, DCM e EB respectivamente. Para o estudo dose/dependente com DCM o PP apresentou uma redução de 30% para 80 mg/kg; FA apresentou redução de 33% e 52% para 1 e 80 mg/kg. T apresentou um aumento de 89% e 164% para 1 e 80 mg/kg e DHT apresentou redução de 64%, 52% e 82% para 1, 12 e 80 mg/kg respectivamente. No tratamento com fitosteróis o PP apresentou redução de 49% para BS, 35% para EN, 26% e 25% para EL e ET. FA apresentou redução de 32%, 31% e 28% para BS, ET e EL respectivamente. DHT apresentou redução de 60% para BS, 43% e 40% para EL e ET e 33% para EN. A partir dos dados obtidos, conclui-se que as frações DCM e SC da *C. officinalis*, ambas ricas em esteróides, apresentaram um potencial anti-hiperplásico prostático no modelo testado, sendo este efeito é dose-dependente para DCM. Todos os fitosteróis testados apresentaram efeito significativo sobre a HP, sendo que o BS foi o mais efetivo. **Palavras chave:** Hiperplasia benigna de próstata; fitosteróis, *Calendula officinalis*, plantas medicinais.

ABSTRACT

The objective for this work was to evaluate the anti-hyperplastic effect of *Calendula officinalis* hydroalcoholic extract, supercritical and dichloromethane fractions and some phytosterols in rat prostate. We used : Male Wistar rats (40 days old, weight=140 g, n=6) were castrated and submitted to testosterone (T) treatment (600 µg/250 g weight) for 7 days to induce BPH. The animals were then treated for 30 days with the supercritical fraction (SC-12 mg/kg), dichloromethane fraction (DCM-1, 12, 80 mg/kg) and crude hydroalcoholic extract (EC-12 mg/kg) from *C. officinalis*, and also with some phytosterols as β-sitosterol (BS); stigmasterol (EN); stigmasterol (EL); stigmasterol (ET). After treatment blood samples were obtained for acid phosphatase (AP) and cholesterol analyses. Animals were then killed and the prostate and seminal vesicle were harvested and weighed and homogenates were prepared for T and dihydrotestosterone (DHT) analyses. The prostate weight (PW) for extract and fractions showed significant 43% and 54% reductions under DCM and SC treatment, respectively, AP showed a 37% and 43% reduction under SC and EC treatment, respectively. DHT levels showed reduction of 59%, 43% and 39%, for treatments of SC, DCM and EC, respectively. The dose-dependent fraction DCM showed a reduction of PW (30%) for 80 mg/kg treatment. AP showed a reduction of 33% and 52% for 1 and 80 mg/kg respectively. T showed an increase of 89% and 164% for 1 and 80 mg/kg, respectively and DHT showed reductions of 64%, 52% and 82% for 1, 12 and 80 mg/kg, respectively. The phytosterols treatment showed PW reduction of 49% for BS, 35% for EN and 26% and 25% for EL and ET, respectively. AP showed reduction of 32%, 31% and 28% for BS, ET and EL respectively. DHT showed a reduction of 60% for BS, 43% and 40% for EL and ET respectively, and 33% for EN. It is concluded that the DCM and SC fraction of *C. officinalis*, both rich in steroids, showed a potential anti-hyperplastic effect in rat prostate. Moreover the SC fraction showed a higher effect, and the DCM fraction showed a dose-dependent effect. All the phytosterols showed an anti-hyperplastic effect, and the BS has a higher response in this model. **Keywords:** Benign prostatic hyperplasia, phytosterols, *Calendula officinalis*, medicinal plant.

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade produtos naturais com propriedades terapêuticas são utilizadas para o tratamento de doenças, (CALIXTO, 2000; RATES, 2001). Apesar mesmo com o impacto da Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica cerca de 25% das drogas prescritas são plantas (RATES, 2001).

Apesar de várias substâncias naturais com importância terapêutica terem sido isoladas de plantas da flora brasileira, as investigações científicas relacionadas aos estudos químicos, bioquímicos e farmacológicos de substâncias provenientes de plantas medicinais estão aquém do potencial de nossa flora. É importante ressaltar que no Brasil, dos quase 6 mil produtos farmacêuticos disponíveis entre fármacos e fitofármacos, poucos foram desenvolvidos por indústrias nacionais. No entanto, investe-se bilhões de dólares na importação da matéria-prima utilizada na produção de fármacos (BLOCK, et al., 1998).

Em todo o mundo o interesse na fitoterapia vem crescendo. Em países da Europa, fitoterápicos são utilizados como primeira linha de tratamento em diversas patologias, entre elas para o tratamento da hiperplasia benigna de próstata (BUCK, 1996). Esta patologia tem uma alta incidência na população masculina podendo chegar a aproximadamente 50% dos homens a partir dos 50 anos e em 90% depois dos 80 (MARANDOLA, 1997).

A hiperplasia benigna de próstata é considerada uma neoplasia benigna que se caracteriza por um alargamento progressivo das estruturas fibromuscular e epitelial dentro da glândula prostática. Em geral é aceito que existem dois componentes que contribuem com a sintomatologia da patologia: um componente estático, relacionado ao tamanho da massa de tecido prostático (hiperplasia) e um componente dinâmico relacionado com o tônus da musculatura lisa prostática (sintomas urológicos). Esta patologia ocorre em aproximadamente 50% dos homens a partir de 50 anos e em 90% depois dos 80. Segundo alguns pesquisadores, diferentes fatores poderiam concorrer

para sua instalação, dentre os quais podemos citar: alteração no metabolismo de hormônios sexuais com o avanço da idade, interação entre estroma e células epiteliais, mediadores de processos inflamatórios, fatores de crescimento tecidual, desvios metabólicos na síntese de colesterol, regulação do tônus muscular, e a geração de espécies ativas de oxigênio e de nitrogênio. Neste conjunto de fatores, aparentemente o metabolismo de hormônios androgênicos tem papel primordial (GOEPEL , et al., 1999).

A abordagem clássica para o tratamento do componente estático da HBP está associada à hipótese de que o desenvolvimento desta hiperplasia envolve a testosterona, o principal hormônio androgênio circulante, que é metabolizado a diidrotestosterona (DHT) na glândula prostática pela 5- α -redutase. A DHT pode ligar-se aos receptores androgênicos das células ao nível da estrutura epitelial e estroma, promovendo a síntese de RNA mensageiro, e, conseqüentemente, a síntese protéica e a proliferação celular. Com base neste conhecimento, foi sintetizado um inibidor específico da 5- α -redutase, a finasterida, recentemente comercializado com o nome de Proscar®, que possui efeito benéfico sobre a proliferação celular e sintomatologia urológica da HBP, mas apresenta efeitos adversos principalmente sobre a função sexual. Já a abordagem terapêutica do componente dinâmico da HBP, consiste na utilização de antagonistas dos α -adrenoreceptores, que se localizam no estroma prostático, os quais são estimulados pelo sistema nervoso simpático, causando contração muscular e obstrução prostática. Os α -bloqueadores, como Prazosina e Terazosina, são fármacos que reduzem o tônus da musculatura lisa, aumentando o fluxo urinário. Entretanto, como os receptores α -adrenérgicos não tem distribuição exclusiva na próstata, seus antagonistas podem causar efeitos adversos devido à ampla distribuição vascular destes receptores (TAMMELA , 1997).

Uma estratégia alternativa para o tratamento da HBP adotada por vários países europeus inclui a fitoterapia, conduta terapêutica que tem sido eleita por mais de 45% dos casos leves a moderados da doença. Esta escolha deve-se à considerável eficiência dos fitofármacos, principalmente no que se refere à melhoria da sintomatologia urológica e prostática associada à baixa incidência de efeitos

indesejáveis. Dentre os extratos de plantas comumente utilizados, podemos citar os da, *Hypoxis rooperi*, *Urtica dioica*, *Curcubita pepoe*, *Pygeum africanum*, *Serenoa repens* (BACH, et al., 1996). Esta última é a planta mais utilizada no tratamento da HBP, tendo sido recentemente comercializada no Brasil com o nome de Permixon®. Os extratos destas plantas contêm princípios ativos como fitoesteróis (particularmente β -sitosterol), triterpenos, álcoois graxos de cadeia longa, ácidos graxos livres e esterificados, flavonóides, carotenóides, lectinas e ligninas (BOMBARDELLI, et al., 1997). Vários trabalhos têm demonstrado que estes compostos tem atividade antiandrogênica e antiestrogênica, atividade inibitória na síntese de prostaglandinas e leucotrienos (ciclooxigenase e lipoxigenase), modificação na síntese de fatores de crescimento (particularmente EGF), inibição das atividades das enzimas 5- α -redutase, citocromo P450 aromatase, Na⁺/K⁺ ATPase, além de redutores de colesterol (PAUBERT-BRAQUET, et al., 1996).

Apesar da larga incidência da HBP, sua etiologia não está totalmente esclarecida e as formas de tratamento existentes não são satisfatórias. Portanto, nos parece oportuno avaliar o potencial de plantas de uso popular no Brasil para o tratamento de distúrbios urológicos com vistas a um possível efeito anti-hiperplásico prostático. Dentro deste contexto o presente trabalho tem como meta avaliar o efeito de extrato bruto e frações da *Calendula officinalis* e alguns fitosteróis sobre a hiperplasia prostática induzida em ratos.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral da presente dissertação é avaliar o efeito anti-hiperplásico prostático de extratos e frações purificadas da *Calendula officinalis* e fitosteróis em modelos experimentais *in vivo*. Para tal, os objetivos específicos são:

- Avaliar o efeito anti-hiperplásico prostático de diferentes extratos e frações da *C. officinalis*, através da avaliação do peso da próstata, vesícula seminal e níveis de colesterol sérico, testosterona e DHT tecidual, além da atividade da fosfatase ácida, em ratos machos castrados e tratados com testosterona para indução da HBP.
- Avaliar o efeito dose-dependente da fração diclorometânica da *C. officinalis* em diferentes concentrações, através da avaliação do peso da próstata, vesícula seminal e níveis de colesterol, testosterona e DHT tecidual, além da atividade da fosfatase ácida, em ratos machos castrados e tratados com testosterona para indução da HBP.
- Determinar o efeito de fitosteróis, através da avaliação do peso da próstata, vesícula seminal e níveis de colesterol, testosterona e DHT tecidual, além da atividade da fosfatase ácida, em ratos machos castrados e tratados com testosterona para indução da HBP.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PRÓSTATA

A próstata é um órgão que pesa cerca de 20 g no homem adulto, possuindo uma constituição fibromuscular (30 a 50%) e glandular (50 a 70%), sendo localizada logo abaixo da bexiga e atravessada pela uretra (Figura 1) (TANAGHO, et al., 1994; COTRAN, et al., 1996).

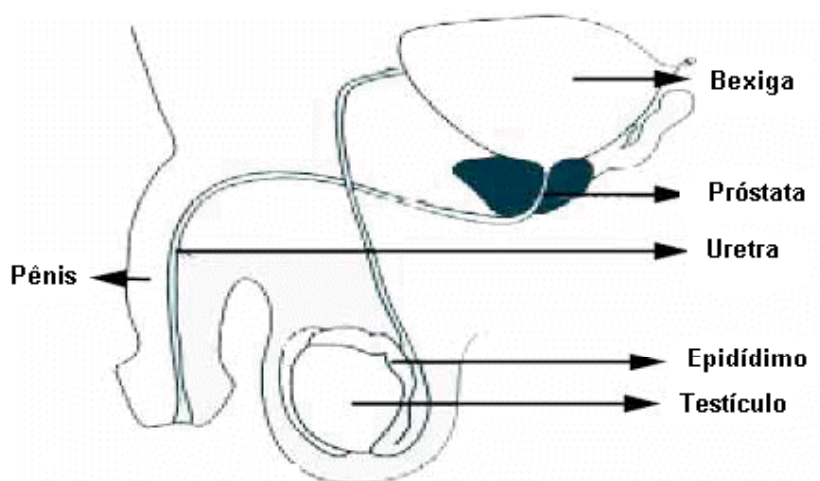


Figura 1. Esquema de localização da próstata no homem (UNIGES, 2002)

A próstata mede entre 3 e 4 cm de largura, tem 4 a 6 cm de comprimento e 2 a 3 cm de espessura, consistindo de uma delgada cápsula fibrosa, sob a qual estão dispostas fibras do músculo liso com orientação circular e tecido colágeno que circunda a uretra. Abaixo dessa camada está o estroma prostático, que é composto de tecido

conjuntivo elástico e fibras musculares lisas no qual estão mergulhadas as glândulas epiteliais (Figura 2) (TANAGHO, et al., 1994).

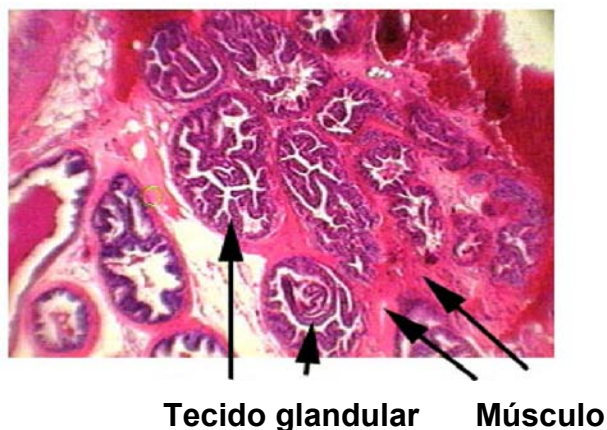


Figura 2. Corte histológico do tecido prostático mostrando o tecido glandular e muscular(COTRAN, et al., 1996)

A próstata tem como função produzir um líquido leitoso que se acrescenta ao volume do sêmen, ajudando na manutenção do pH entre 6,0 e 6,5, favorecendo deste modo a motilidade e a fertilidade dos espermatozóides (GUYTON, et al., 1997).

De acordo com a anatomia e histologia da próstata, ela pode ser dividida em regiões. A região glandular é composta de uma grande zona periférica e uma pequena zona central, constituindo juntas cerca de 95% da glândula. Os outros 5% são formados pela zona de transição, que está localizada ao redor da uretra e compostos pelas glândulas periuretrais e músculo liso (Figura 2) (TANAGHO, et al., 1994).

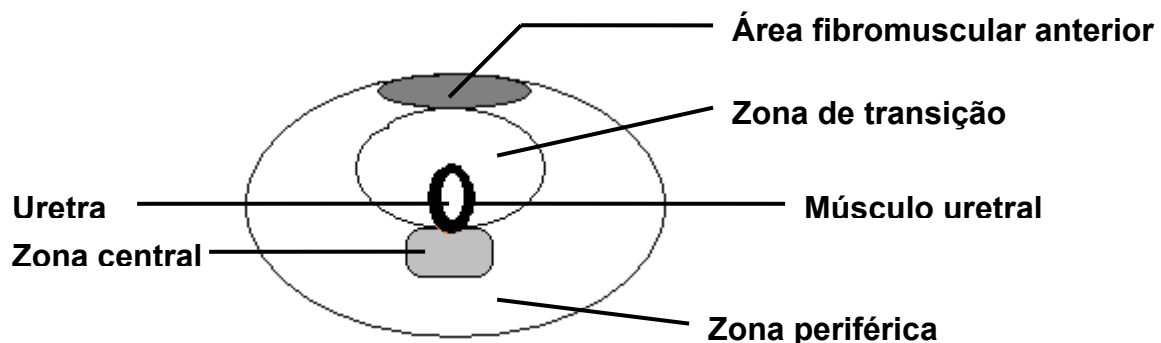


Figura 3. Projeção transversal da próstata (TANAGHO, et al., 1994)

A próstata é um órgão que depende da produção de andrógenos para o seu crescimento. Depende principalmente de DHT, que é sintetizada a partir da testosterona por redução pela 5- α -redutase (STEERS, et al., 1995).

O aumento de peso e crescimento normal da próstata ocorre com o avanço da idade e pode ser dividido em fase rápida e lenta. A fase rápida ocorre dos 10 aos 21-30 a uma taxa de crescimento de 1,6 mg por ano; já na fase lenta a tendência é diminuir para 0,4 mg por ano, ocorrendo dos 21-30 até os 90 anos (BERRY, 1984).

Os processos patológicos que, com freqüência afetam a próstata, são a inflamação, os tumores e o aumento benigno, sendo este último o mais comum e mais freqüente com o avanço da idade (COTRAN, et al., 1996).

3.2 HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA

A hiperplasia benigna de próstata (HBP) é um aumento não maligno do tecido prostático, caracterizado pela presença de elementos estromais (músculo liso e tecido conectivo) e epitelial (glândula) (STEERS, et al., 1995; ZIADA, et al., 1999; BARTSH, et al., 2000). Vários estudos demonstram que existe um aumento do número de células, o que caracteriza, desta forma, um processo hiperplásico (BARTSH, et al., 2000).

Um fator importante para o desenvolvimento da hiperplasia consiste nas mudanças das regiões citadas anteriormente devido ao avanço da idade, sendo que o local onde primeiro se desenvolve a HBP é a região periuretral dentro da zona de transição (STEERS, ET AL., 1995; BARTSH, et al., 2000).

Admite-se que o aparecimento da HBP é um processo multifatorial, acontecendo em três estágios. O primeiro e o segundo estágio ocorrem em homens com menos de 70 anos e é caracterizado pelo crescimento difuso da zona transitória; já

o terceiro estágio ocorre em homens com mais de 70 anos e é caracterizado por uma proliferação glandular, juntamente com um alargamento da massa tecidual (BERRY, 1984).

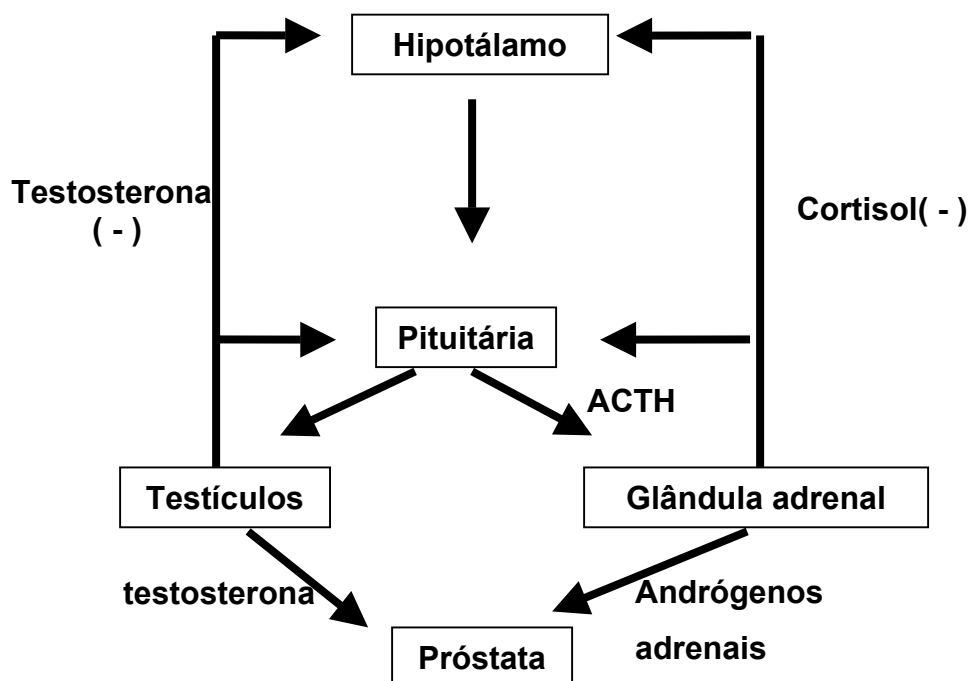
Estudos demonstram que esta patologia ocorre em aproximadamente 50% dos homens a partir de 50 anos e em 90% depois dos 80 (MARANDOLA, et al., 1997), sendo que evidências anatômicas e microscópicas de HBP estão presentes em 20%, 40%, 55%, 80% e 90% de homens com idade de 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90 anos, respectivamente. Entretanto, somente 25-50% daqueles que possuem evidências microscópicas apresentam manifestações clínicas (ZIADA, et al., 1999).

3.3 ETIOLOGIA DA HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA

A próstata depende de níveis adequados de DHT para o seu crescimento (STEERS, et al., 1995; LEVINE, et al., 1997; BARTSH, et al., 2000). A partir da testosterona produzida pelo testículo, somente 2% é transformada em DHT, sendo que os 98% restantes se ligam a proteínas específicas ficando, desta forma, inativas (STEERS, et al., 1995).

O estímulo para a produção de testosterona começa no hipotálamo, onde este libera GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina), estimulando a glândula pituitária que libera LH (hormônio luteinizante) (STEERS, et al., 1995; BARTSH, et al., 2000). O LH atua então sobre as células do testículo (células de Leydig) produzindo, assim 95% dos andrógenos circulantes. Os outros 5% restantes são produzidos pela glândula adrenal. O esquema 1 mostra como ocorre este processo (STEERS, et al., 1995). Tanto GnRH como LH são controlados por um mecanismo de “feedback negativo”, onde a testosterona atua diretamente sobre o hipotálamo e a glândula pituitária, suprimindo a

secreção de GnRH e LH, e, indiretamente, a conversão de estradiol (BARTSH, et al., 2000).



Esquema 1. Formação de testosterona a partir do estímulo do hipotálamo, conforme modelo proposto por STEERS (1995)

A testosterona, após entrada na célula estromal prostática é convertida em DHT. Esta estimula a síntese protéica após ligação aos receptores androgênicos nas células epiteliais, que, então, transmitem um sinal intracelular que envolve uma cascata de ativação e a interação de outros componentes, resultando, desta forma, em replicação celular. Os receptores androgênicos pertencem à família dos receptores esteróides, que compreende os receptores da tireóide, do ácido retinóico e da vitamina D (STEERS, et al., 1995; ZIADA, et al., 1999; BARTSH, et al., 2000)

Segundo alguns autores, o desequilíbrio entre os níveis de andrógenos e estrógenos contribui para a etiologia da HBP, muito mais que seus valores absolutos. Diversos estudos têm demonstrado altos níveis de estrógenos no estroma da HBP,

sendo que dois mecanismos podem ajudar na sua acumulação: estrógenos obtidos da circulação periférica e estrógenos produzidos localmente pela atividade de enzimas aromatases e sulfatases (LEVINE, et al., 1997).

Entre as teorias que tentam explicar o aparecimento da HBP, é de consenso geral que o processo de envelhecimento poderia permitir o acúmulo da massa prostática, resultando em uma contínua interação entre a parte estromal e glandular da próstata. Este processo poderia ser potenciado pela presença de fatores de crescimento vindos pela circulação ou produzidos localmente pela uretra. Outra hipótese propõe que fatores hormonais, fatores de crescimento e oncogenes poderiam causar um desequilíbrio entre a morte e replicação das células prostáticas (ZIADA, et al., 1999).

No processo de envelhecimento ocorrem alterações no meio hormonal que estão relacionadas com a diminuição do nível sérico de testosterona e o aumento de estrogênio associado. Conseqüentemente, ocorre uma redução absoluta na produção de testosterona e um aumento da conversão da testosterona sérica em estrogênio nos tecidos adiposos periféricos. Entretanto, ainda não se sabe o papel definitivo dos andrógenos e dos estrógenos na indução da HBP (TANAGHO, et al., 1994).

3.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NA HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA

O fato da próstata envolver o canal da uretra faz com que esta tenha um importante papel na patofisiologia da HBP (ZIADA, et al., 1999). Esta localização leva à ocorrência de sintomas relacionados com o trato urinário baixo que podem ser divididos em dois componentes principais: estático e dinâmico. O componente estático está relacionado com o aumento do tecido e volume prostático, levando conseqüentemente,

a sintomas irritativos e obstrutivos. Os sintomas obstrutivos estão relacionados à redução da força e do calibre do jato urinário causada pela compressão da uretra, hesitação, intermitência, gotejamento terminal e esvaziamento incompleto (TANAGHO, et al., 1994).

Já os sintomas irritativos estão associados à noctúria, freqüência e urgência em urinar (TANAGHO, et al., 1994; STEERS, et al., 1995; TAMMELA, 1997; ZIADA, et al., 1999). Estes sintomas ocorrem devido a alguns fatores como o esvaziamento incompleto durante cada micção, o que resulta em menores intervalos entre as micções, e o aumento da próstata que faz com que a bexiga deflagre uma resposta de micção com maior freqüência. Os sintomas de freqüência são mais acentuados à noite, porque as inibições corticais normais são reduzidas e também por que o tônus uretral e esfintérico normal são reduzidos durante o sono (TANAGHO, et al., 1994). Estes sintomas, quando não bem tratados, podem redundar em complicações no trato urinário superior (ZIADA, et al., 1999).

O músculo liso prostático, que é responsável por cerca de 39% do volume celular e cerca de 51% de todo o volume estromal na HBP, é também o responsável pelo componente dinâmico da HBP (ZIADA, et al., 1999). O componente dinâmico é regulado por atividade simpática, mediada por receptores α -adrenérgicos localizados no tecido muscular (STEERS, et al., 1995; TAMMELA, 1997).

Além destes dois componentes (dinâmico e estático), existe um terceiro que também poderia ser aceito: o componente detrusor. O responsável por este componente é a musculatura da bexiga, que, apesar de causar sintomas obstrutivos, não pode ser relacionado como causa de obstrução da uretra. Este componente é responsável por uma contração involuntária da bexiga, o qual resulta em urgência e um esforço em esvaziá-la (ZIADA, et al., 1999).

Existem diversas escalas que tentam classificar os sintomas da HBP, a mais importante delas é a AUASI (American Urological Association Symptom Index), que consiste em um questionário com 7 perguntas relacionadas com os sintomas mais freqüentes com a HBP, onde o paciente responde com uma escala de 0 a 5, indicando

a severidade dos sintomas (JACOBSEN, et al., 2001). Além desta escala, existem outras também importantes como a SPI (Symptom Problem Index) e BHP Impact Index (JACOBSEN, et al., 2001).

Além dos sintomas relacionados acima, existem alguns sintomas sistêmicos relacionados ao trato urinário. Um deles é desconforto abdominal superior e dor no flanco durante a micção; eles são causados pela obstrução crônica do trato de saída que resulta em refluxo vesicouretral e dilatação dos tratos superiores. Isto pode levar a uma elevação da pressão às unidades renais, o que resulta em insuficiência podendo haver sintomas de uremia como fadiga crônica, perda de apetite e sonolência.

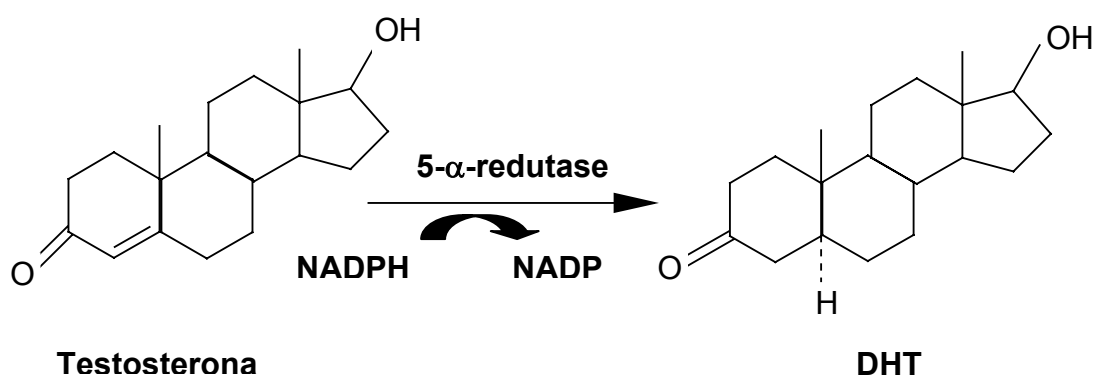
Hérnias e hemorragias podem aparecer como sintomas não relacionados ao trato urinário, e são resultantes do aumento da pressão abdominal e esforço durante a micção.

Complicações como cistite e pielonefrite podem aparecer em estágios posteriores da HBP, sendo causadas pela grande quantidade de urina residual e o refluxo vesicoureteral (TANAGHO, et al., 1994).

Análises laboratoriais podem auxiliar no diagnóstico diferencial da HBP, como por exemplo: análise da urina exclui infecções do trato urinário ou hematúria que causam sintomas parecidos com a HBP (STEERS, et al., 1995; ZIADA, et al., 1999) e creatinina sérica pode identificar pacientes com insuficiência renal (STEERS, et al., 1995). Níveis de fosfatase ácida são de grande importância, já que pacientes com hiperplasia prostática podem apresentar elevações desta enzima que está presente na próstata (HENRY, 1999). O uso do PSA (uma proteína sérica produzida pelo epitélio da glândula prostática) na avaliação de homens com ou sem sintomas de HBP é controverso, pois níveis de PSA são detectados em tecido normal, hiperplásico e com câncer; fazendo com que este exame sozinho não seja suficiente para um diagnóstico efetivo (JACOBSEN, et al., 2001).

3.5 5- α -REDUTASE

Como já foi mencionado anteriormente, o crescimento da próstata depende de níveis adequados de DHT formado pela conversão da testosterona sob a ação da enzima 5- α -redutase, como mostra o esquema 2 (STEERS, et al., 1995; BARTSCH, et al., 2000 STEERS, 2001;).



Esquema 2.

Esta enzima possui duas isoformas, tipo 1 (R1) e tipo 2 (R2), e ambas são dependentes de NADPH para a redução de testosterona a DHT (BARTSCH, et al., 2000; STEERS, 2001).

Estas enzimas estão associadas à membrana nuclear, sendo que o gene responsável pela isoforma R1 encontra-se no cromossoma 5, e a isoforma R2 no cromossoma 2 (CILOTTI, et al., 2001; STEERS, 2001).

A localização destas isoformas é bem variada; a R1 está expressa principalmente no fígado e na pele (especialmente nas glândulas sebáceas), e, apesar de sua função não estar ainda bem definida, acredita-se que esteja relacionada com o desenvolvimento da acne, já que tem importante distribuição nas glândulas sebáceas. A isoforma R2 está presente no fígado, próstata e folículo capilar, e sua função está

relacionada com o desenvolvimento da próstata e efeito androgênico no folículo capilar. Isto está bem demonstrado em homens com pseudo-hermafroditismo, os quais possuem deficiência na 5 α -redutase (uma mutação na R2), pois estes, além de terem uma deficiência na formação das genitálias externas, possuem poucos pêlos pelo corpo, possuem bastante cabelo, e uma próstata pequena (BARTSCH, et al., 2000).

3.6 RECEPTORES ADRENÉRGICOS

Os receptores adrenérgicos são receptores de membrana localizados tanto no tecido neuronal como não neuronal. Eles são responsáveis por mediar as respostas de catecolaminas endógenas como noradrenalina e adrenalina, sendo responsáveis pelo controle de funções importantes no sistema cardiovascular, respiratório, neuronal, digestivo, dilatação e contração da pupila, metabolismo energético, função endócrina, entre outros (CALZADA, et al., 2001).

Os receptores adrenérgicos podem ser divididos em dois tipos - α e β - sendo que cada um tem funções específicas. Os receptores α estão relacionados com funções de vasoconstrição, contração da musculatura uterina, contração da uretra, dilatação da pupila, relaxamento intestinal, enquanto que os receptores β estão relacionados com a vasodilatação, relaxamento da musculatura uterina, broncodilatação e função cardíaca. Os receptores β podem ainda ser divididos em β_1 e β_2 atuando na lipólise, função cardíaca, no músculo esquelético e broncodilatação, respectivamente (CALZADA, et al., 2001).

Na próstata ocorre uma importante distribuição de receptores α -adrenérgicos, os quais contribuem para o componente dinâmico da HBP. Existem dois subtipos de receptores α -adrenérgicos: α_1 e α_2 , sendo que o tipo α_1 predomina na próstata, tendo

como função mediar o tônus da musculatura lisa. A partir disto, bloqueadores α_1 -adrenérgicos seletivos têm sido utilizado para reduzir a obstrução na HBP via relaxamento de elementos contráteis no estroma hiperplásico da próstata. Não existem evidências destes receptores na bexiga, o que faz com que os medicamentos utilizados não afetem a contração da mesma (COOPER, et al., 1999).

3.7 TRATAMENTOS PARA HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA

Segundo TAMELLA T. (1997), a escolha do tratamento na HBP vai depender da gravidade dos sintomas e estado do paciente como relacionado abaixo:

- Sintomas leves: observação e acompanhamento médico;
- Sintomas moderados: terapia medicamentosa;
- Sintomas severos: cirurgia.

3.7.1 Tratamento cirúrgico

Este tipo de tratamento é indicado quando os sintomas obstrutivos causados pela HBP são graves, tendo sinais de dilatação do trato superior e insuficiência renal (TANAGHO, et al., 1994).

Entre as intervenções cirúrgicas padrões, a mais importante é a ressecção transuretral da próstata, onde cerca de 88% dos pacientes que sofrem este tipo de

intervenção melhoram, podendo ter até 85% de melhora dos sintomas (TAMELLA, 1997). O princípio desta terapia é a remoção da porção adenomatosa obstrutiva da próstata através da uretra, usando um ressectoscópio transuretral (TANAGHO, et al., 1994). Apesar de sua grande eficácia, esta terapia tem elevado risco de complicações para o paciente, como ejaculação retrógrada, impotência, infecção do trato urinário e incontinência urinária. Além destes riscos, após 5 anos cerca de 10% dos que sofrem esta cirurgia necessitam ser novamente tratados (STEERS, et al., 1995; TAMELLA, 1997).

3.7.2 Tratamento medicamentoso

Os pacientes para os quais este tipo de terapia é indicado são aqueles que sofrem de sintomas fracos a moderados, e que possuem obstrução do fluxo urinário sem infecções complicadas (TAN, 1995).

Segundo TAMELLA (1997), a terapia medicamentosa pode ser focalizada no uso de duas classes de fármacos: antagonistas dos receptores α -adrenérgicos e supressores androgênicos.

3.7.2.1 Antagonistas dos receptores α -adrenérgicos

Na HBP existe um aumento do tônus do músculo liso prostático, ocorrendo, desta maneira, uma compressão da uretra e uma obstrução do fluxo urinário. A presença de receptores α -adrenérgicos (principalmente α_1) nos músculos lisos da próstata estimulou estudos sobre o uso de bloqueadores α para o alívio da obstrução prostática (TANAGHO, et al., 1994).

Pacientes passíveis de receber este tipo de terapia são aqueles com sintomas moderados de obstrução sem complicações de retenção, sendo que a melhora dos sintomas é rápida e permanente enquanto o paciente mantém a medicação (TAN, 1995). Entretanto, a maior desvantagem no uso destes medicamentos são os seus efeitos adversos, como tonturas, hipotensão postural, sonolência, congestão nasal e palpitações (TAMMELLA, 1997). A ejaculação retrógrada pode ocorrer em consequência do relaxamento do colo vesical (TANAGHO, et al., 1994).

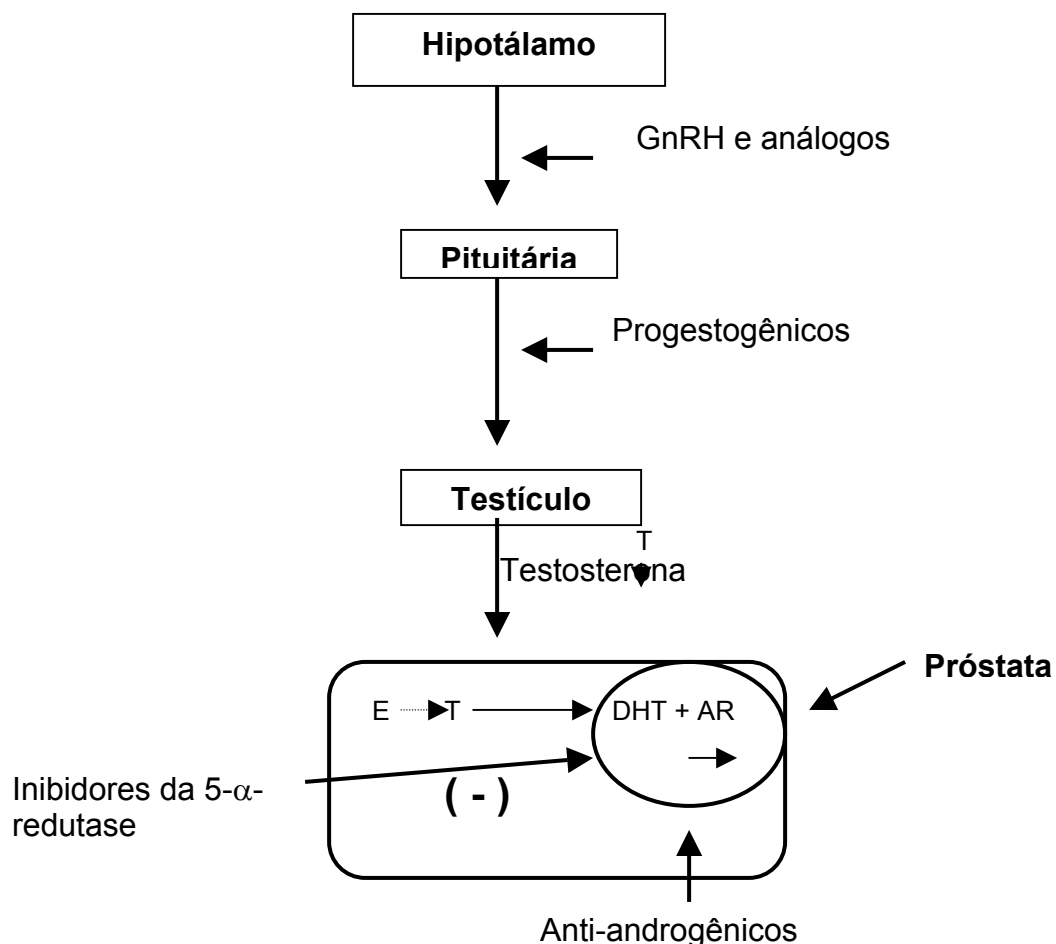
O primeiro fármaco bloqueador α -adrenérgico utilizado na clínica para o tratamento da HBP foi o antagonista não seletivo fenoxibenzamina (TAN, 1995; TAMMELLA, 1997). Este composto demonstrou ser eficiente na melhora dos sintomas clínicos, apesar de apresentar vários efeitos adversos como tonturas, sonolência, palpitações e hipotensão postural (TAMMELLA, 1997).

Atualmente, os fármacos utilizados são mais específicos para receptores α_1 , tendo menos efeitos colaterais, sendo desta forma mais aceitos pelos pacientes (TAN, 1995). Entre os primeiros fármacos seletivos α_1 usados terapeuticamente, estão a prazosina (Minipress[®]), a terazosina (Hytrin[®]), e a doxazosina (Carduran[®], Unoprost[®]), os quais apresentaram um bom efeito na HBP (COOPER, et al., 1999).

3.7.2.2 Supressores androgênicos

Estudos demonstram que a HBP não se desenvolve em homens e cachorros castrados, sugerindo que hormônios testiculares (principalmente testosterona, DHT e estradiol) têm um papel crítico na etiologia desta patologia (TAMMELLA, 1997).

Os supressores androgênicos atuam sobre a formação e/ou ligação da testosterona e DHT nos seus receptores, inibindo importante passo da sinalização hormonal com conseqüente alteração da resposta tecidual (Esquema 3).



Esquema 3. Alvos para ação de fármacos que atuam como supressores hormonais no tratamento da HBP. E: estradiol; T: testosterona; DHT: dihidrotestosterona; AR: receptor androgênico.

Existem várias classes de fármacos utilizados como supressores androgênicos, entre elas podemos citar os agonistas de GnRH (acetato de leuprolida, Lupron[®] e

acetato de goserrelina, Zoladex[®]), que impedem a produção de testosterona pelo testículo, através da inibição da liberação de GnRH pelo mecanismo de retroalimentação negativa, levando a uma redução significativa no volume da próstata, podendo reverter algumas manifestões clínicas associadas à HBP (TAMMELLA, 1997).

Os progestogênicos atuam através da inibição da liberação de LH e bloqueio dos receptores androgênicos, acarretando uma diminuição do volume prostático. Os mais utilizados são o acetato de megestrol (Megetrat[®]) e caproato de hidroxiprogesterona (TAMMELLA, 1997).

Anti-androgênicos ligam-se com alta afinidade a receptores localizados no citoplasma de células prostáticas, e, desta maneira, produzem uma deprivação de andrógenos sem a redução dos níveis séricos de testosterona (TAMMELLA, 1997), sendo os mais utilizados a bicalutamida (Casodex[®]), a flutamida (Eulexin[®]) e o acetato de ciproterona (KOROLKOVAS, 1999).

O desenvolvimento de inibidores para a 5- α -redutase permitiu uma nova abordagem no tratamento endócrino da HBP. Inibindo esta enzima, espera-se diminuir o crescimento da próstata, sem os efeitos adversos observados com os outros tratamentos endócrinos, já que a concentração plasmática da testosterona não é afetada (TAN, 1995).

A finasterida foi o primeiro inibidor da 5- α -redutase introduzido na prática clínica (Figura 4). Este fármaco exibe seletividade maior para a isoforma R2 da enzima, apesar de também atuar sobre a R1 (CILOTTI, et al., 2001). A finasterida não tem nenhuma atividade progestacional, estrogênica ou androgênica e nenhuma afinidade pelo receptor androgênico, sendo altamente efetiva na supressão dos níveis plasmáticos de DHT, sem provocar redução da concentração sanguínea de testosterona (TAN, 1995).

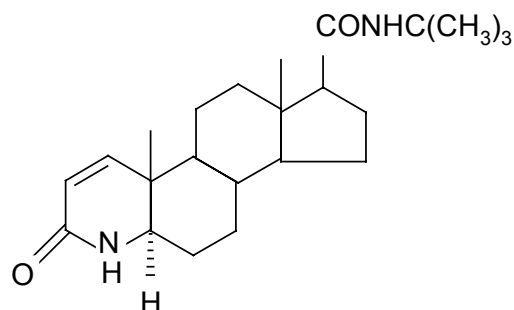


Figura 4. Estrutura química da finasterida

A finasterida, apesar de não ter nenhuma atividade progestacional, estrogênica ou androgênica, possui alguns efeitos adversos, como diminuição da libido (3,3%), problemas de ejaculação (2,9%) e disfunção erétil (3,7%) (TAN, 1995). Estudos realizados com células de ratos tentam explicar a disfunção erétil através dos níveis de DHT. Estes estudos demonstram que a DHT parece ser mais potente que a testosterona na manutenção da atividade da óxido nítrico sintase em corpos cavernosos, sendo a ereção induzida por óxido nítrico. A partir destas observações, não é de se surpreender que a administração em longo prazo de finasterida possa diminuir a ereção em alguns pacientes (STEERS, 2001).

A concentração de DHT na próstata pode ser reduzida de 80 a 90% pela ação da finasterida. Nos primeiros meses de tratamento é observada uma progressiva diminuição do tamanho da célula epitelial e estudos demonstram que existe um aumento da razão de apoptose nestas próstatas, desta forma, a finasterida causaria involução da próstata, através da combinação entre atrofia e morte celular (BARTSCH, et al., 2000).

A finasterida parece ser efetiva e bem tolerada em grupos de homens com HBP moderada a severa e apresentando alargamento da glândula prostática. O tamanho da próstata diminuiu em média 30% quando comparado ao grupo placebo após seis meses de tratamento com este fármaco (KAPLAN, 2001).

Enquanto o tratamento com a finasterida induz a redução dos níveis de DHT e PSA no soro com um concomitante aumento da concentração de testosterona no sangue, o impacto deste fármaco na concentração tecidual de andrógeno varia consideravelmente de paciente para paciente (BARTSCH, et al., 2000).

Outros fármacos desta classe têm sido sintetizados, mostrando diferentes potências de inibição e seletividade (CILOTTI, et al., 2001). Alguns pesquisadores têm tentado desenvolver fusão de fármacos que possuem atividade bloqueadora de α -adrenoreceptor e inibidores da 5- α -redutase (STEERS, 2001).

3.8 FITOTERAPIA NA HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA

Desde tempos antigos extratos de plantas são usados para o alívio de sintomas relacionados a disfunções urológicas. Atualmente, em muitos países, principalmente aqueles da Europa e do Oriente, utilizam plantas medicinais juntamente com bloqueadores α -adrenérgicos e inibidores da 5- α -redutase no tratamento da HBP (BUCK , 1996).

Em todo o mundo o interesse na fitoterapia para a HBP vem crescendo, principalmente na Alemanha, França, Áustria, Espanha, Itália e Japão. Na Alemanha e na Áustria, agentes fitoterápicos são utilizados como primeira linha de tratamento para pacientes com sintomas moderados de obstrução na HBP, somando um total de 90% de todas as prescrições. Na Itália, extratos de plantas representam 48,6% de todas as prescrições farmacológicas para a HBP, enquanto que α -bloqueadores e inibidores da 5- α -redutase representam somente 5,1% e 4,8% das prescrições, respectivamente (BUCK , 1996).

Neste tipo de terapia são utilizados extratos, frações e compostos isolados de algumas plantas, sendo as mais utilizadas: *Hypoxis rooperi*, *Urtica dioica*, *Serenoa repens*, *Curcubita pepoe*, *Pygeum africanum* (BACH, et al., 1996)

As plantas medicinais utilizadas apresentam geralmente similaridades em sua composição química, contendo uma variedade de compostos ativos como fitosteróis, fitoestrogênios, triterpenos (livres ou estereificados a ácidos graxos), lecitinas, lignanas e flavonóides. Estas substâncias possuem atividade anti-androgênica, anti-inflamatória, inibem a síntese de prostaglandinas e proliferação celular, sendo que o efeito destes extratos possivelmente não esteja relacionado a um único componente ativo, mas está baseado na ação sinérgica de todos os seus componentes (BACH, et al., 1996; CRISTONI, et al., 2000).

Dentre os efeitos relacionados a estas plantas, pode-se citar: redução do colesterol plasmático, efeito anti-inflamatório, efeito citotóxico direto, atividade anti-prostaglandina e atividade anti-androgênica e/ou anti-estrogênica (SILVERIO, et al., 1998).

3.8.1 *Serenoa repens*

A *S. repens* é uma pequena palmeira originária da América do Norte, também conhecida como *Sabal serrulata*, cujo extrato lipoesterólico é bastante utilizado no tratamento da HBP. Entre os constituintes principais deste extrato pode-se citar: ácidos graxos, fitosteróis (β -sitosterol, campesterol, stigmasterol), álcoois saturados, flavonóides como quercetina e ácido antracílico. Estes constituintes estão presentes em diferentes quantidades de acordo com o tipo de extrato feito com a fruta (BOMBARDELLI, et al., 1997).

Estudos clínicos realizados com homens acima de 50 anos tratados com Permixon[®] (nome comercial dado ao extrato lipofílico da planta), utilizando 320 mg/dia e comparando com a finasterida, 5 mg/dia, demonstraram que os dois são igualmente eficazes no controle da HBP. Os pacientes apresentaram melhoras em relação ao IPSS (International Prostate Symptom Score). O IPSS padroniza alguns parâmetros de comparação de sintomas como urgência e frequência em urinar, intermitência, sensação de esvaziamento incompleto da bexiga e força do jato urinário.

Neste estudo, tanto a finasterida como o Permixon[®] foram eficientes, apesar de provavelmente possuírem ações diferentes. A finasterida foi efetiva na inibição da 5- α -redutase, podendo também causar uma diminuição do tamanho da próstata e dos níveis de PSA. Já o Permixon[®], apesar de reduzir os sintomas da patologia e inibir *in vitro* a atividade prostática da 5- α -redutase, clinicamente teve um pequeno efeito nos níveis de DHT (tecidual e plasmático) e nenhum efeito sobre a testosterona, diminuiu o tamanho da próstata (menos que a finasterida), e não apresentou impacto significativo nos níveis de PSA (CARRARO, et al., 1996).

Outro estudo realizado com homens entre 68 e 74 anos tratados com 320 mg/dia de Permixon[®] por 3 meses, mostrou que este fitoterápico é eficiente no decréscimo de DHT tecidual, cerca de 50% quando comparado ao grupo controle, e associado a um aumento de 125% na concentração de testosterona tecidual, quando comparado ao grupo controle, sugerindo que o extrato pode estar atuando sobre a enzima 5 α -redutase. A concentração de EGF na zona periuretral do tecido prostático com HBP reduziu em cerca de 50% quando comparado ao controle, demonstrando a dependência androgênica da produção do fator de crescimento (SILVERIO, et al., 1998).

Alguns autores demonstraram sua eficácia na interação com receptores androgênicos no citosol, inibindo competitivamente a ligação do androgênio. O extrato desta planta também apresentou influência na síntese de metabólitos inflamatórios do ácido araquidônico, através da inibição da atividade da cicloxigenase e lipoxigenase (BOMBARDELLI, et al., 1997).

3.8.2 *Pygeum africanum*

Esta planta originária da África, cujos extratos são caracterizados pela presença de fitosteróis, triterpenos pentacíclicos e ésteres de ácido ferulico, é bastante usada no tratamento da HBP, sendo estes compostos os prováveis responsáveis pelo efeito anti-inflamatório atividade anti-edematosa e hipocolesterolêmica dos extratos (CRISTONI, et al., 2000),

Apesar do mecanismo de ação da *P. africanum* não estar bem definido, seus efeitos parecem estar relacionados com ação anti-inflamatória, melhora da função detrusora, e efeito anti-proliferativo (THOMPSON, 2001).

Estudo clínico realizado com 263 pacientes tomando 50 mg 2 vezes por dia de Tadenam[®] (nome comercial do extrato) durante 6 semanas, comparado com grupo placebo, mostrou significativa diminuição dos sintomas como noctúria e esvaziamento incompleto da bexiga (FRANKLIN, et al., 1996).

3.8.3 *Urtica dioica*

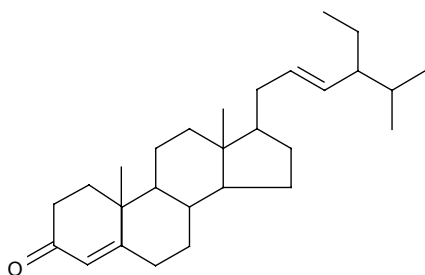
Folhas e raízes de *U. dioica* têm sido usadas no tratamento da HBP, sendo que os constituintes dos extratos variam de acordo com o solvente utilizado na extração; no extrato metanólico foram encontrados β -sitosterol, sitosterol- β -glicosídeo, triterpenos e seus glicosídeos, compostos fenólicos (ácido vanílico, glicosídeos fenólicos, entre outros) (BRINKER, 1993/94).

Um estudo clínico utilizando 67 pacientes tomando 5 ml de extrato hidroalcoólico de raízes de *U. dióica* durante 6 meses, resultou em uma melhora da sintomatologia. Não foi observada diminuição do volume da próstata e os melhores resultados foram obtidos após 3 meses de tratamento (BRINKER, 1993/94).

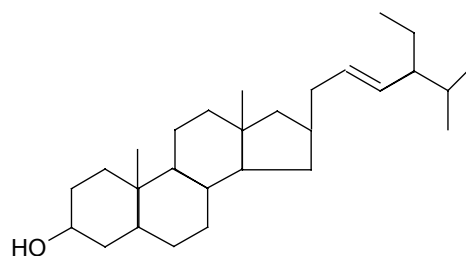
Estudo analisando o efeito de lignanas de extrato de raízes de *U. dioica* demonstrou que estas se ligam à globulina de ligação de hormônios sexuais (SHBG), uma proteína transportadora plasmática de hormônios sexuais que interage com alvos teciduais dos hormônios sexuais através de receptores localizados na próstata. A influência da SHBG na fisiologia da próstata sugere um envolvimento na HBP (SCHOTTNER, et al., 1997).

3.8.4 Fitosteróis

Os fitosteróis são esteróis álcoois formados por seis unidades de isopreno. São encontrados em algas e plantas superiores, sendo os principais: sitosterol, estigmasterol e campesterol (Figura 5) (SALISBURY, et al., 1991).



Estigmastadienona



Estigmastanol

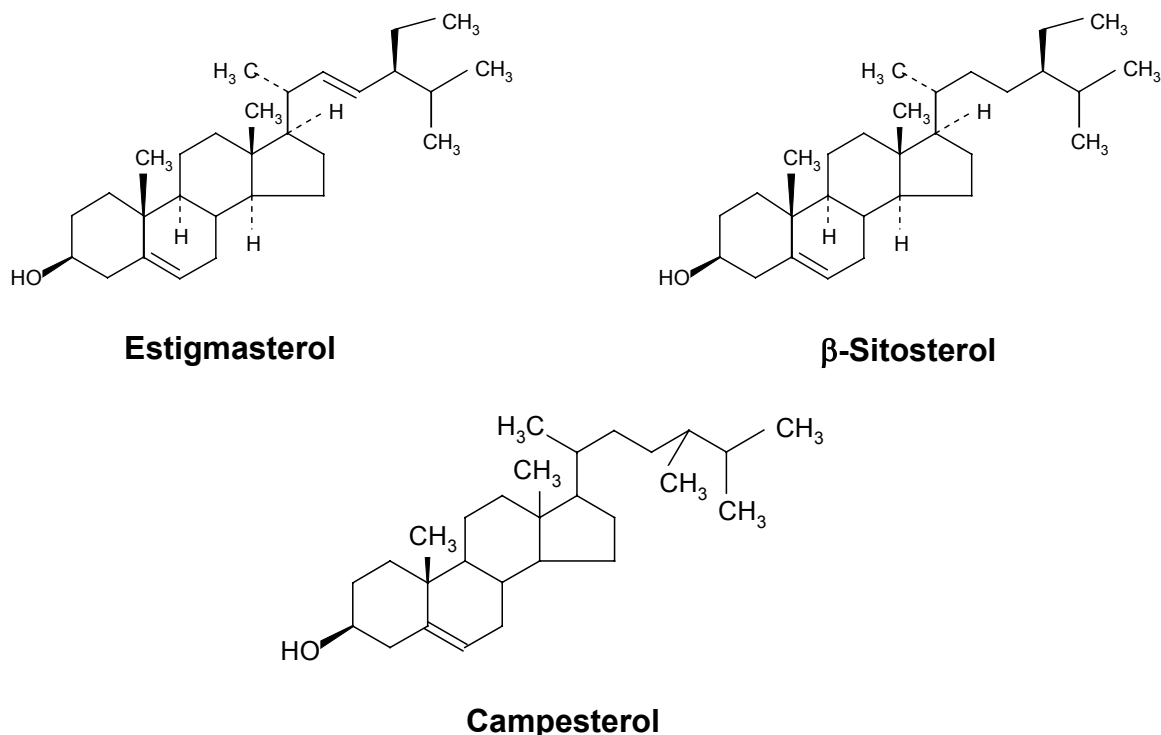


Figura 5. Estrutura química dos principais fitosteróis encontrados em plantas.

Os esteróis também podem ser obtidos na forma de glicosídeos, onde um grupo hidroxila do esterol está ligado a um açúcar e na forma de éster onde um grupo hidroxila está ligado a um ácido graxo (SALISBURY, et al., 1991).

A maioria dos extratos de plantas utilizados no tratamento da HBP contém fitoesteróis, principalmente β -sitosterol. Acredita-se que o seu efeito esteja relacionado com o metabolismo do colesterol e efeitos anti-inflamatórios, apesar de o mecanismo de ação exato ainda não estar bem definido (LOWE, et al., 1996).

Harzol é um extrato feito da raiz da *Hipoxis rooperi*, um capim estrela nativo da África do Sul (BUCK, 1996), que contém uma grande variedade de fitoesteróis, principalmente β -sitosterol (~50%). Estudos realizados com 200 pacientes tomando 200

mg/dia deste extrato, comparado com um grupo placebo, apresentaram resultados positivos com respeito à HBP. A melhora dos sintomas foi significativa, com um aumento do volume urinário e uma diminuição do volume residual na bexiga (BERGES, et al., 1995).

Estudos realizados por WILT et al. (1999) com outros tipos de extratos fitoesterólics contendo diferentes concentrações de fitoesteróis também demonstraram efeitos positivos em relação ao tamanho da próstata (diminuição do tamanho) e uma diminuição do volume de urina residual.

3.9 *Calendula officinalis*

A *C. officinalis* é uma planta medicinal nativa dos países do Mediterrâneo, sendo bastante utilizada em pomadas, tinturas e infusões em inflamações de pele e membranas mucosas, como faringite, dermatite, úlcera nas pernas, contusões, furúnculos e erupções de pele (BLUMENTAL, et al., 2000).



Figura 6. Foto de *C. officinalis*.

Seus principais constituintes são: flavonol glicosídeos, isoquercetina, narcisina, rutina, terpenóides α - e β -amirina, lupeol, esteróis, óleos voláteis, calentulina e polissacarídeos (BLUMENTAL, et al., 2000).

Estudos com ratos demonstraram que os triterpenóides (faradiol, lupeol, β -amirin) extraídos da *C. officinalis* tem um efeito anti-inflamatório tópico quando comparado com a indometacina (LOGGIA, et al., 1994). Na Europa, pomadas à base de extratos de *C. officinalis* são usadas no tratamento de lesões orais, cortes e feridas e mostraram efeito imunomodulatório e anti-bacterial, e ativaram a regeneração tecidual e desenvolvimento de tecido epitelial (BLUMENTAL, et al., 2000).

Foi demonstrado que polissacarídeos de alto peso molecular extraídos da *C. officinalis* têm efeito imunomodulador anti-viral, estimulando atividade do sistema imune (BLUMENTAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J., 2000). Estudos *in vitro* têm demonstrado que seus extratos são capazes de causar inibição do HIV-1, reduzindo a transcriptase reversa HIV-1 de maneira dose-dependente (KALVATCHEV, et al., 1997).

Estudos feitos com extrato aquoso de *C. officinalis* demonstraram um efeito de neovascularização, ajudando deste modo, na cicatrização. Estudos químicos feitos com este extrato demonstraram que os componentes predominantes são flavonóides e flavonóides glicosídicos, sendo provavelmente estes os responsáveis pelo efeito terapêutico (PATRICK, et al., 1996).

A *C. officinalis* tem sido bastante utilizada em produtos dermo cosméticos com ação anti-inflamatória. Sua utilização é maior nos casos de queimaduras, contusões, cortes e erupções, a qual é aplicada topicamente diversas vezes ao dia, sendo o seu uso considerado seguro (GUTERRES, et al., 2002)

A *acne vulgaris* é uma das doenças mais comumente tratadas por dermatologistas. Cerca de 80 a 90% de adolescentes tem algum tipo de acne e destes, 30% precisam de algum tipo de tratamento. As lesões podem ser do tipo inflamatórias e não inflamatórias, ocorrendo freqüentemente na face, nas costas, tórax e ombros. A etiologia precisa da acne é ainda desconhecida, entretanto, um processo complexo

envolvendo secreção sebácea glandular, bloqueio de glândula sebácea, resposta inflamatória, fatores hormonais e fatores ambientais, parece estar envolvido (KELLY, 1996).

A etiologia da acne possivelmente está relacionada com a estimulação hormonal androgênica em mulheres. A evidência do envolvimento dos andrógenos é que a acne não ocorre em homens castrados antes da puberdade. Sem os andrógenos, a glândula sebácea permanece pequena (KELLY, 1996); entretanto, a diferente conversão periférica de testosterona em DHT pela isoforma R1 da enzima 5α -redutase, a qual está expressa nas glândulas sebáceas da pele (CILOTTI, et al., 2001), pode explicar porque as glândulas presentes principalmente em áreas mais sebosas (face, costas, ombros), aumentam na puberdade, enquanto que em outras áreas não (KELLY, 1996).

Tendo em vista que os triterpenóides presentes na *C. officinalis* têm estruturas semelhantes aos sitosteróis, particularmente β -sitosterol, e que os extratos da *C. officinalis* são largamente utilizados no tratamento da acne, patologia associada à super expressão cutânea da isoforma R1 da 5α -redutase, o presente estudo propõe avaliar o potencial anti hiperplásico prostático desta planta.

Este trabalho faz parte do projeto Plano Sul / CNPq-1999 – “Desenvolvimento de novos fármacos e/ou fitofármacos que possam ser utilizados no tratamento da hiperplasia benigna de próstata” coordenado pelo Prof. Rosendo Augusto Yunes.

O objetivo principal do referido projeto consiste na implementação de uma estratégia para o tratamento da HBP que inclui a preparação de extratos e frações, bem como o isolamento e modelagem de novos compostos ou associações de moléculas oriundas de plantas da flora brasileira que possam ser utilizados como agentes terapêuticos nos processos patológicos associados à hiperplasia prostática, com potencial de se tornarem fármacos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

4.1.1 Extrato e frações purificadas da *C. officinalis*

O extrato bruto e as frações supercrítica e diclorometano da *C. officinalis* foram fornecidas pelo laboratório de Estrutura e Atividade do Departamento de Química da UFSC, coordenado pelo Dr. Rosendo Augusto Yunes, e pelo laboratório da Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira (UFSC).

As flores de *C. officinalis* foram coletadas no município de Campo Largo, no estado do Paraná, em setembro de 1998, e identificadas pela professora Rosemeri Moro (Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa-UEPG-Paraná). Após confirmação da espécie, a planta foi depositada no Herbário da UEPG, sob número 6483.

As flores de *C. officinalis* foram secas e maceradas em etanol 50% durante um período de 10 dias. Após este período, o extrato foi concentrado em evaporador rotatório a pressão reduzida, obtendo-se assim, o extrato hidroalcoólico. O extrato foi então deixado em repouso por várias horas à temperatura de 5°C, e filtrado para a retirada de precipitado marrom. O extrato filtrado foi então particionado sucessivamente com n-hexano e diclorometano, originando as respectivas frações.

A fração supercrítica foi obtida a partir do seguinte procedimento que utiliza CO₂ como solvente de arraste: as pétalas de *C. officinalis* foram moídas, permitindo

assim a exposição do soluto do interior das células vegetais ao solvente. As partículas foram separadas em quatro diferentes frações de tamanhos de partícula com auxílio de peneiras. A preparação da matéria-prima selecionada neste estudo constituiu da separação das frações peneiradas e do emprego da fração intermediária (malha entre 20 e 32), desprezando-se, assim, as partículas maiores (sem exposição do soluto) e menores (irregulares). As condições de operação, temperatura e pressão, foram estabelecidas, e o sistema foi deixado em repouso por um tempo pré-determinado (tempo estático - TE), para promover uma maior solubilização do soluto, já que o solvente permanecia em contato com o leito de sólidos para que ocorresse a transferência do soluto para a fase solvente, aumentando, desta forma, o rendimento da extração. A extração propriamente dita iniciou-se, após o período TE a abertura da válvula micrométrica (VM). Realizou-se a coleta de extrato em frascos de vidro previamente tarados e acoplados à linha de extração após a VM, em intervalos de tempo pré-definidos. Esses frascos com soluto eram pesados e o solvente utilizado quantificado com auxílio do bolhômetro acoplado ao frasco coletor.

A tomada de amostras foi feita em intervalos de 2 minutos e, gradativamente, esse intervalo de tempo foi aumentado para 60 minutos até o final das extrações, em torno de 14 horas, com vazão de solvente entre 2,79 e 3,00 g/min. Para experimentos realizados com baixa vazão de solvente (vazão entre 0,81 e 1,72 g/min) a tomada de amostras iniciou com um intervalo de 5 minutos e, da mesma forma, o intervalo foi aumentado para 60 minutos. O procedimento foi realizado nas seguintes condições: pressão entre 120 e 200 bar e temperatura entre 20 e 40 °C (JOCHMANN, 2000).

4.1.2 Reagentes e solventes

Solventes e sais foram adquiridos da Merck[®], AG (Darmstadt, Alemanha). A testosterona utilizada foi adquirida em farmácia comercial na forma de cipionato de testosterona (Deposteron[®]), bem como a finasterida (Finasterida[®]) e a fração lipoesterólica da *Serenoa repens* (Permixon[®]).

Os fitosteróis usados no presente estudo foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, USA).

Os kits bioquímicos utilizados em diferentes análises foram adquiridos do laboratório LABTEST-Sistema para Diagnóstico[®].

4.2 ANIMAIS

Para avaliar o efeito anti-hiperplásico prostático dos extratos, frações da *C. officinalis* e fitosteróis, foram utilizadas ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos de 40 dias, pesando aproximadamente 140 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram recebidos em nosso biotério, pesados e distribuídos dois a dois em gaiolas apropriadas, mantidos em temperatura ambiente controlada de 24 ± 2 °C, com ciclo claro/escuro de 12 horas, passando por um período de adaptação de 4 dias. Neste período os ratos receberam ração comercial padronizada e água *ad libitum* até o início dos experimentos.

4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos para experimentação animal, tendo sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFSC, sob número de cadastro 147/CEUA e protocolo 23080.007332/2002-48 conforme parecer em anexo.

4.3.1 Modelo para indução da hiperplasia prostática *in vivo*

Para o estudo dos possíveis efeitos do extrato, frações da *C. officinalis* e fitosteróis sobre o processo hiperplásico prostático, foi empregado o método proposto por STENGER, et al. (1997) com algumas modificações. Este modelo experimental simula uma hiperplasia prostática em ratos induzida por testosterona.

O modelo parte do princípio de que a HBP é um distúrbio que ocorre em células epiteliais e estromais prostáticas a partir de um desequilíbrio que ocorre originalmente na concentração sanguínea de colesterol, com posterior repercussão nos níveis totais e prostáticos da testosterona, levando, conseqüentemente, a um aumento da síntese de DHT. Portanto, admite-se neste modelo que a DHT seja responsável indireta pela sinalização da proliferação celular. Para avaliar bioquímica e morfológicamente a HBP, utilizou-se os seguintes parâmetros: concentração sérica de colesterol; níveis teciduais de testosterona e DHT, atividade da fosfatase ácida, além das medidas ponderais da próstata e vesícula seminal.

Os ensaios biológicos foram realizados com ratos púberes (n=6) submetidos à castração, e posteriormente tratados durante 7 dias com 2,4 mg de testosterona/kg de peso (IM) para indução da hiperplasia prostática.

Após este período os ratos foram tratados conforme a tabela abaixo:

Tabela 1. Tratamento de ratos com diferentes frações e extrato de *C. officinalis*, e alguns fitosteróis

Grupo	Tratamento	Dose (mg/kg)	Testosterona (mg/kg rato)
Controle hiperplásico	Óleo vegetal	-	2.4
Controle falso castrado	-	-	-
Finasterida	Deposteron [®]	4	2.4
Fração lipoesterólica da <i>S. repens</i>	Permixon [®]	12	2.4
β -sitosterol	β -sitosterol	12	2.4
Estigmastadienona	Estigmastadienona	12	2.4
Estigmasterol	Estigmasterol	12	2.4
Estigmastanol	Estigmastanol	12	2.4
<i>C. officinalis</i> (extrato bruto hidroalcoólico)	Extrato bruto hidroalcoólico	300	2.4
<i>C. officinalis</i> (fração supercrítica)	Fração supercrítica	12	2.4
<i>C. officinalis</i> (fração diclorometano)	Fração diclorometano	12	2.4

Após estes tratamentos, a partir da fração diclorometano foram feitos ensaios com diferentes concentrações conforme a tabela abaixo:

Tabela 2. Tratamento de ratos com diferentes concentrações da fração diclorometanica de *C. officinalis*

Grupo	Tratamento	Dose mg/kg	Testosterona mg/kg
<i>C.officinalis</i> (fração diclorometano)	Fração diclorometano	1	2.4
<i>C.officinalis</i> (fração diclorometano)	Fração diclorometano	12	2.4

<i>C.officinalis</i> (fração diclorometano)	Fração diclorometano	80	2.4
---	----------------------	----	-----

Todos os tratamentos duraram 30 dias, sendo que ao final foi coletado o sangue para as análises bioquímicas e em seguida os ratos foram anestesiados e sacrificados com éter, para posterior retirada da próstata e da vesícula seminal.

4.3.2 Método de castração

A metodologia utilizada para a orquiectomia (castração de machos), foi adaptada pelo Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco do Depto. de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP/SP) (CAIRASCO, 1986).

A técnica consiste em anestésiar o rato com éter e colocá-lo em decúbito dorsal, com as patas presas na mesa cirúrgica (Fig 7 - a). Os testículos foram localizados na bolsa escrotal, pressionados entre os dedos, e posteriormente feita uma incisão na bolsa escrotal, entre os testículos (Fig 7 - b). O tecido que rodeia o testículo de um dos lados foi cortado com uma tesoura e, por compressão, exposto e retirado da bolsa escrotal (Fig 7 -c, d). Exposto o cordão espermático, o mesmo foi pressionado com o auxílio de uma tesoura hemostática, juntamente com o pedículo vascular, e então as estruturas foram cauterizadas, de tal maneira que o testículo tenha sido removido (Fig 7 - e, f).

O testículo do lado oposto também foi removido pelo mesmo procedimento e, posteriormente, o tecido foi suturado com 2 ou 3 pontos separados (Fig 7 - g). Para evitar infecção, foi aplicado Polvidine na área da cirurgia, e, após a recuperação da anestesia, o rato foi colocado em uma gaiola com serragem limpa.

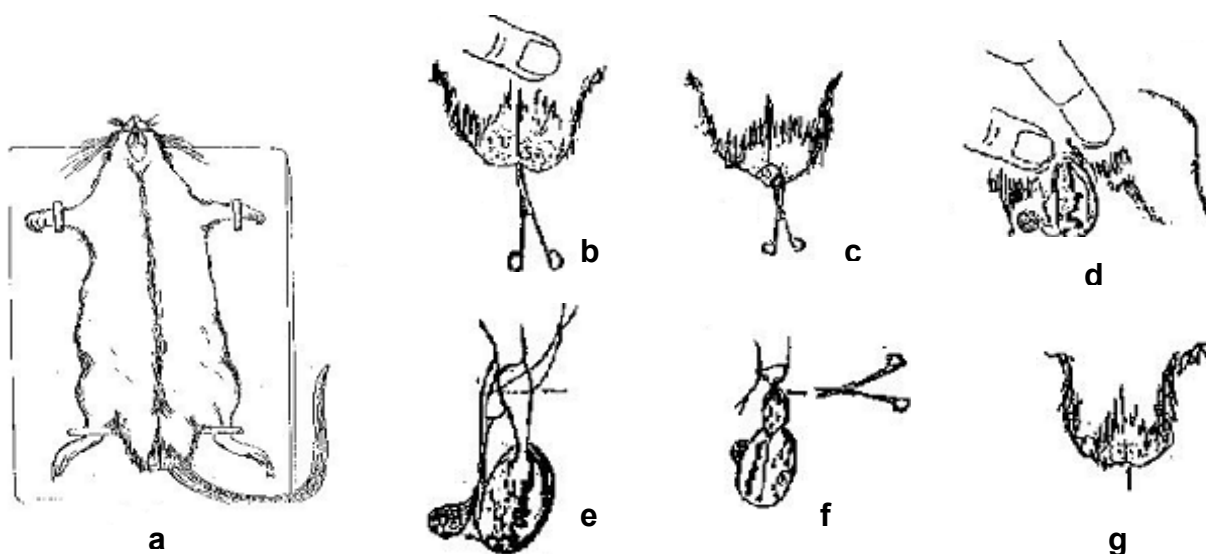


Figura 7- Método de castração; a: rato em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica; b: localização e incisão do testículo; c: corte do tecido que rodeia o testículo; d: retirada do testículo da bolsa escrotal; e: cordão espermático; f: cordão espermático pressionado por tesoura hemostática; g: sutura do tecido.

4.3.3 Preparação de homogenato de próstata e extração de andrógenos

Para a determinação de testosterona e DHT no tecido prostrático dos ratos foram preparados homogenatos de próstata, utilizando a metodologia proposta por I. FAREDIN (1992).

O tecido foi triturado manualmente e homogeneizado com 3ml de acetato de etila durante 1 minuto, sob ação de ultrasom. Posteriormente, a solução foi transferida para um tubo de ensaio. O processo foi repetido mais 2 vezes com o mesmo tecido, obtendo-se um volume final de 9 ml. O solvente foi então evaporado sobre corrente de nitrogênio e o resíduo foi recuperado com uma solução metanol/água 30% (v/v) e

armazenados em nitrogênio líquido até serem encaminhadas à CRIESP-Central de Radioimunoensaio de São Paulo, para dosagem dos andrógenos.

4.4 AVALIAÇÕES PONDERAIS E BIOQUÍMICAS

4.4.1 Peso da próstata e vesícula

A próstata e vesícula seminal dos ratos foram retiradas e pesadas, e os valores obtidos foram expressos em mg por 100 gramas de peso corporal.

4.4.2 Dosagem de Colesterol Total

Os níveis de colesterol foram determinados no soro pelo método de oxidase proposto por ALAIN, C. A. (1974). Este método tem como princípio a formação de um produto de coloração, através de 3 reações enzimáticas, que é proporcional à concentração de colesterol na amostra. Os ésteres de colesterol presentes na amostra são hidrolisados pela colesterol esterase em colesterol e ácidos graxos; o colesterol advindo desta reação é oxidado pela colesterol oxidase na presença de O_2 formando colest-4-em-3-ona e H_2O_2 . Em seguida, duas moléculas de H_2O_2 mais fenol e 4-

aminoantipirina são catalisadas por uma peroxidase, formando 4 moléculas de H₂O e a antipirilquinonimina, que é o produto de coloração, com absorção máxima em 500 nm.

4.4.3 Dosagem da atividade da fosfatase ácida

As dosagens da fosfatase ácida foram realizadas pelo método colorimétrico proposto por WALTER e SCHUTT (1970). Segundo este método, a fosfatase ácida prostática do soro fraciona o monofosfato de timolftaleína, em pH 6,0, liberando timolftaleína livre, cuja cor azul é determinada espectrofotometricamente a 590 nm. A absorbância obtida é comparada contra uma curva de calibração preparada com timolftaleína pura.

4.4.4 Dosagem da concentração de DHT e Testosterona

A quantificação de testosterona e DHT no tecido e no plasma foram realizadas pelo método de radioimunoensaio ¹²⁵I e ³H, proposto por FURUYAMA, S. (1970) e TREMBLAY, R. R. et al. (1970), respectivamente. O limite de sensibilidade é de 0,125 ng/ml para testosterona e 0,120 pg/ml para DHT, sendo que o coeficiente de variação é de 6,7 e 12,4% para testosterona e 8,1 e 13,7% para DHT.

As dosagens dos andrógenos foram realizadas na Central de Radioimunoensaio de São Paulo-CRIESP.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas através de análises de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey-Kramer, quando necessário. Para tal utilizou-se o software INSTAT (GraphPad, San Diego, CA, USA) admitindo níveis de significância de $p < 0,05$, $p < 0,01$, e $p < 0,001$.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERPLÁSICO PROSTÁTICO DA *C. officinalis*

5.1.1 Efeito anti-hiperplásico prostático de diferentes frações e extrato de *C. officinalis*

5.1.1.1 Peso da próstata

Os resultados obtidos demonstraram que o modelo experimental utilizado foi capaz de induzir a hiperplasia prostática em rato, uma vez que o peso da próstata sofreu um aumento de 54% ($p < 0,001$) nos animais castrados e tratados com testosterona (controle hiperplásico). Além disso, os grupos controle positivos representados pelo extrato lipoesterólico de *S. repens* e o inibidor específico para 5- α -redutase (finasterida), apresentaram uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente) no peso da próstata, quando comparados ao controle hiperplásico. As reduções foram de 34% e 57% para a *S. repens* e para a finasterida, respectivamente.

Ao analisar o efeito de diferentes frações e extrato da *C. officinalis* sobre o peso da próstata (Figura 8), observaram-se diferenças estatisticamente significativas para a fração diclorometânica ($p < 0,01$) e para a fração supercrítica ($p < 0,001$), em relação ao controle hiperplásico. A redução do peso da próstata foi de 43% e 54% para a fração diclorometânica e supercrítica, respectivamente, sendo que estas reduções podem ser comparadas ao valor expresso pelo grupo controle normal.

Os resultados das frações supercrítica e diclorometânica podem ser comparados aos controles positivos (finasterida e *S. repens*), já que não apresentarem diferença estatisticamente significativa em relação aos mesmos, e a fração supercrítica apresentou os melhores resultados com respeito à redução do peso prostático.

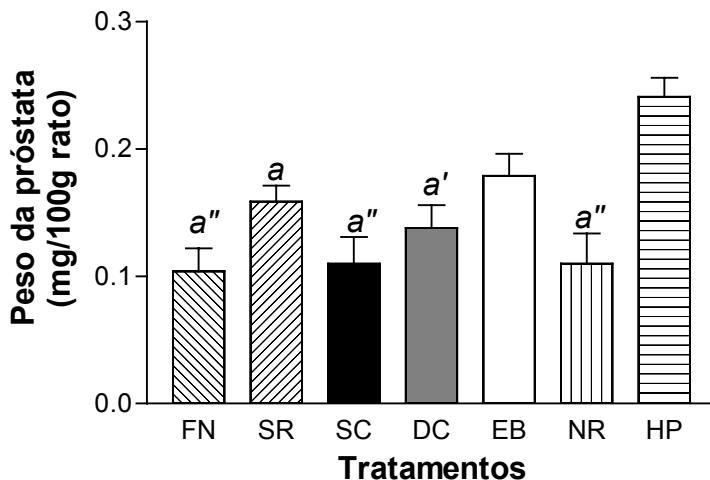


Figura 8 Peso da próstata (mg/100g) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP), tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), extrato lipoesterólico de *S. repens* (SR, 12 mg/kg), fração supercrítica (SC, 12 mg/kg), fração diclorometânica (DC, 12 mg/kg) e extrato bruto hidroalcoólico (EB, 300 mg/kg) de *C. officinalis*. Todos os resultados foram expressos em termos de média \pm EPM, n=6, sendo que (a), (a'), (a'') representam diferenças significativas em relação ao controle HP para $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente.

5.1.1.2 Peso da vesícula seminal

A vesícula seminal é uma glândula cuja secreção é fortemente influenciada pela ação da testosterona e DHT. Devido a esta característica, o peso desta glândula pode ser utilizado como um dado complementar para avaliar o efeito dos extratos e frações testados sobre os níveis de testosterona e DHT. Da mesma forma que o peso da próstata, a vesícula seminal apresentou uma elevação de sua massa pelo

tratamento com testosterona (37%). Este crescimento foi inibido pelo tratamento dos animais com extrato lipoesterólico da *S. repens* ou finasterida (redução de 34 e 45%, respectivamente), demonstrando mais uma vez a eficiência do modelo experimental utilizado.

Entretanto, o extrato e frações da *C. officinalis* não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo hiperplásico. Apesar dos tratamentos não apresentarem uma diferença estatisticamente significativa (Figura 9), houve uma tendência de redução.

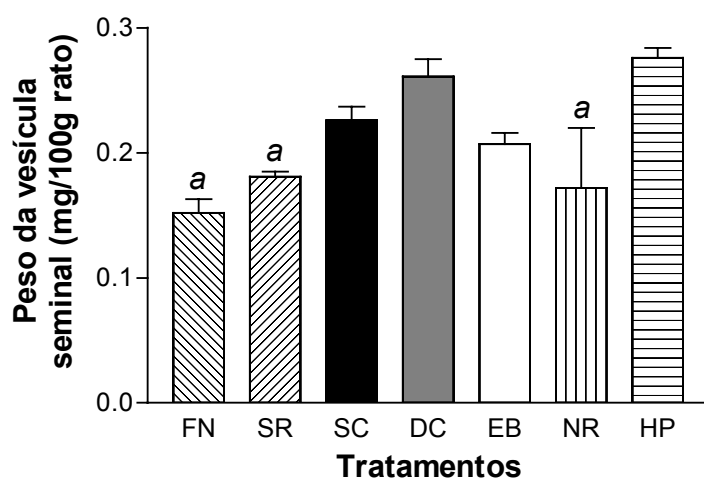


Figura 9. Peso da vesícula seminal (mg/100g) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásico (HP), ratos tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), extrato lipoesterólico de *S. repens* (SR, 12 mg/kg), fração supercrítica (SC, 12 mg/kg), fração diclorometânica (DC, 12 mg/kg) e extrato bruto hidroalcoólico (EB, 300 mg/kg) de *C. officinalis*. Todos os resultados foram expressos em termos de média \pm EPM, $n=6$, sendo que (a) representa diferença significativa em relação ao grupo controle HP.

5.1.1.3 Atividade da fosfatase ácida

Pode-se observar diferenças estatisticamente significativas na atividade da fosfatase ácida para a fração supercrítica ($p<0,01$) e para o extrato bruto hidroalcoólico

($p < 0,001$), quando comparados ao grupo controle hiperplásico, sendo as reduções de 37% para a fração supercrítica e de 43% para o extrato bruto hidroalcoólico (Figura 10). Estas reduções podem ser comparadas ao grupo controle normal por não apresentarem diferença significativa entre estes grupos.

Quando a fração supercrítica e o extrato bruto hidroalcoólico foram comparados à finasterida, ambos apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente), apresentando uma redução de 38% para a fração supercrítica e 44% para o extrato bruto hidroalcoólico.

A fração diclorometânica, apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa, mostrou uma tendência de redução. A fração supercrítica foi a que apresentou melhores resultados com respeito à redução da atividade da fosfatase ácida.

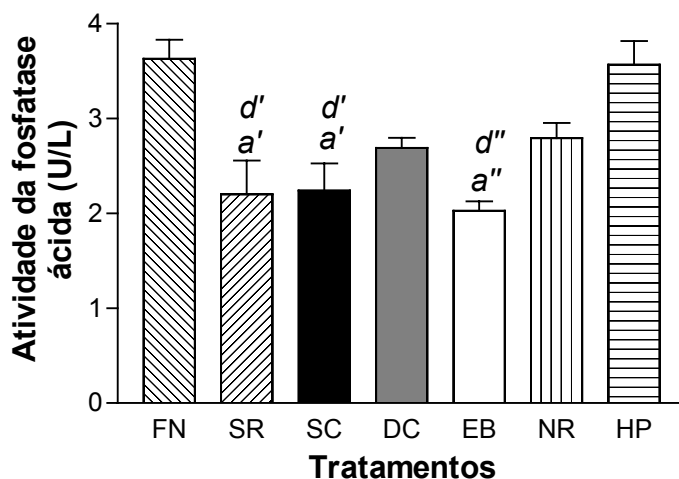


Figura 10. Atividade da fosfatase ácida (U/L) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP) tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), extrato lipoesterólico de *S. repens* (SR, 12 mg/kg), fração supercrítica (SC, 12 mg/kg), fração diclorometânica (DC, 12 mg/kg) e extrato bruto hidroalcoólico (EB, 300 mg/kg) de *C. officinalis*. Todos os resultados foram expressos em termos de média \pm EPM, $n=6$, sendo que (a') e (a'') representam diferenças significativas em relação ao controle HP ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) e (d'), (d'') expressam diferenças significativas em relação à finasterida ($p < 0,01$ e $p < 0,001$).

5.1.1.4 Níveis séricos de colesterol total

Ao analisar o efeito de diferentes frações e extrato da *C. officinalis* sobre os níveis séricos de colesterol (Figura 11), pode-se observar que nenhum destes tratamentos apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle hiperplásico, apesar de que se observou uma tendência de redução na concentração deste esterol.

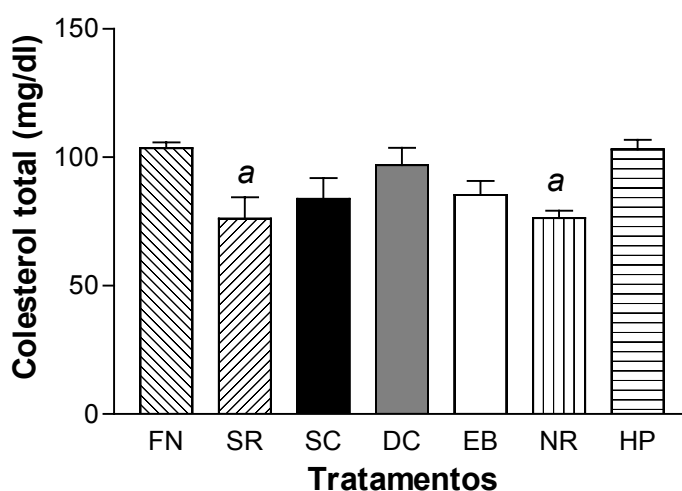


Figura 11. Valores de colesterol total (mg/dL) de ratos dos rato normais (falso castrados) (NR), hiperplásico (HP), tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), extrato lipoesterólico de *S. repens* (SR, 12 mg/kg), fração supercrítica (SC, 12 mg/kg), fração diclorometânica (DC, 12 mg/kg) e extrato bruto hidroalcoólico (EB, 300 mg/kg) de *C. officinalis*. Todos os resultados foram expressos em termos de média \pm EPM, n=6, sendo que (a) representa diferença significativa em relação ao grupo controle hiperplásico ($p < 0,05$).

5.1.1.5 Níveis de testosterona tecidual

Nenhuma das frações ou extrato da *C. officinalis* apresentou uma diferença estatisticamente significativa, quando comparadas ao controle hiperplásico, apesar de

que apresentaram uma tendência de aumento na concentração de testosterona, sugerindo um efeito sobre os níveis deste andrógeno (Figura 12).

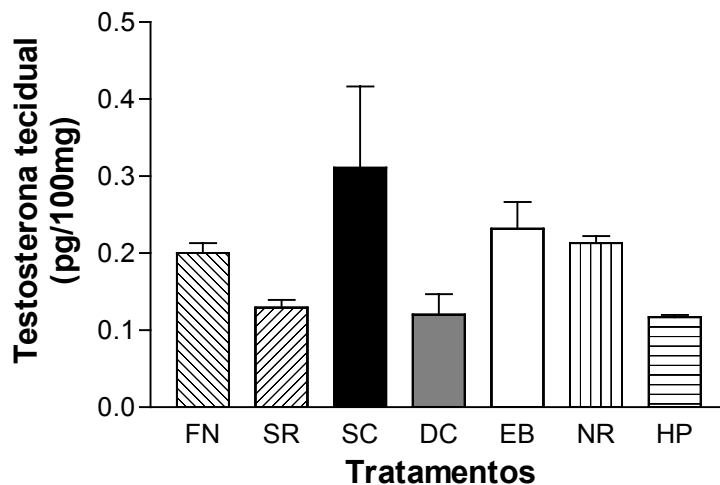


Figura 12. Níveis de testosterona tecidual (pg/100mg de tecido prostático) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP) tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), extrato lipoesterólico de *S. repens* (SR, 12 mg/kg), fração supercrítica (SC, 12 mg/kg), fração diclorometânica (DC, 12 mg/kg) e extrato bruto hidroalcoólico (EB, 300 mg/kg) de *C. officinalis*. Todos os resultados foram expressos em termos de média \pm EPM, n=6.

5.1.1.6 Níveis de DHT tecidual

O presente modelo experimental apresentou resultados favoráveis no que se refere aos níveis de DHT tecidual, já que o controle normal e os controles positivos apresentaram uma redução estatisticamente significativa em relação ao grupo controle hiperplásico ($p < 0,05$). As reduções foram de 71% e 78% para a finasterida e *S. repens* (Figura 13).

Todos os tratamentos apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) com reduções de 59%, 43% e 39% para a fração supercrítica, diclorometano e extrato bruto hidroalcoólico, respectivamente.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as reduções nas concentrações de DHT nos grupos tratados com a fração supercrítica, diclorometano e o grupo normal. Entretanto, a ação da fração supercrítica pode ser comparada aos controles positivos finasterida e extrato lipoesterólico de *S. repens*.

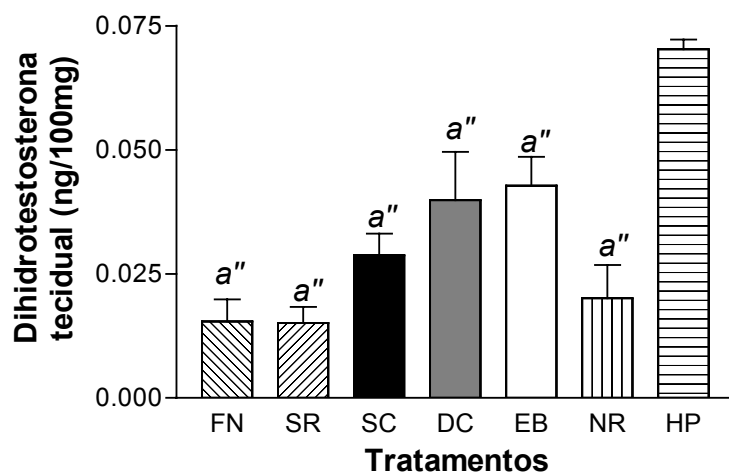


Figura 13. Níveis de DHT tecidual (ng/100mg de tecido prostático) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP) tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), extrato lipoesterólico de *S. repens* (SR, 12 mg/kg), fração supercrítica (SC, 12 mg/kg), fração diclorometânica (DC, 12 mg/kg) e extrato bruto hidroalcoólico (EB, 300 mg/kg) de *C. officinalis*. Todos os resultados foram expressos em termos de média \pm EPM, $n=6$, sendo que (a'') representa diferença significativa em relação ao controle HP para $p < 0,001$.

5.2 ESTUDO DOSE-DEPENDENTE COM A FRAÇÃO DICLOROMETÂNICA DE *C.officinalis*

5.2.1 Peso da próstata

Ao analisar o efeito da fração diclorometânica da *C. officinalis* em diferentes concentrações (Figura 14) sobre o peso da próstata, observou-se que apenas a concentração de 80 mg/kg apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle hiperplásico ($p < 0,05$), sendo sua redução de 30%. Esta redução pode ser comparada ao valor do grupo controle normal e do fitoterápico de referência (extrato lipoesterólico de *S. repens*).

Apesar das concentrações 1 e 12 mg/kg não apresentarem diferenças estatisticamente significativas, ambas apresentaram tendência de redução, sugerindo seu efeito sobre o peso da próstata.

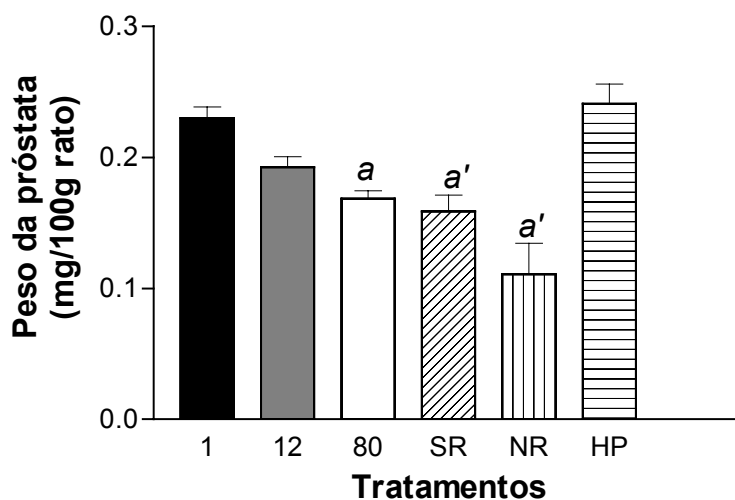


Figura 14. Peso da próstata (g/100g) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP) tratados durante 30 dias (V.O.) com extrato lipoesterólico de *S. repens* (SR, 12 mg/kg), fração diclorometânica de *C. officinalis* (1, 12, 80 mg/kg). Todos os resultados foram expressos em termos de média \pm EPM, n=6, sendo que (a) e (a') representam diferenças significativas em relação ao controle hiperplásico ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente).

5.2.2 Peso da vesícula seminal

Ao analisar o efeito de diferentes concentrações da fração diclorometânica (Figura 15) sobre o peso da vesícula seminal, observou-se que nenhuma das concentrações apresentou uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle hiperplásico, nem em relação aos grupos controles positivos, *S. repens* e finasterida. Entretanto para todas as concentrações testadas houve tendência de redução no peso da vesícula seminal.

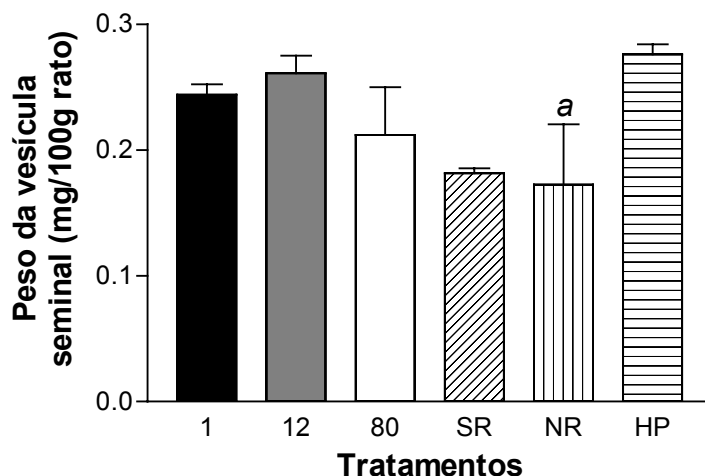


Figura 15. Peso da vesícula seminal (g/100g) de ratos normais (falso castrados) (NR) e hiperplásico (HP), ratos tratados durante 30 dias (V.O.) com extrato lipoesterólico de *S. repens* (SR, 12 mg/kg) e fração diclorometânica de *C. officinalis* (1, 10, 80 mg/kg). Todos os resultados foram expressos em termos de média \pm EPM, n=6. (a) diferença significativa em relação ao grupo controle hiperplásico para $p < 0,05$.

5.2.3 Atividade da Fosfatase ácida

Houve diferença estatisticamente significativas em relação ao grupo controle hiperplásico para as concentrações de 1 e 80 mg/kg, com redução de 33% ($p < 0,05$) e 52% ($p < 0,001$), respectivamente (Figura 16). Estas reduções podem ser comparadas à redução do fitoterápico de referência, já que não apresentaram diferença estatisticamente significativa, quando comparados a estes.

Curiosamente, a concentração de 12 mg/kg apesar de não apresentar uma diferença significativa, apresentou uma tendência de redução na atividade da enzima. A

concentração de 80 mg/kg foi a que teve melhor resultado com respeito à inibição da atividade desta enzima.

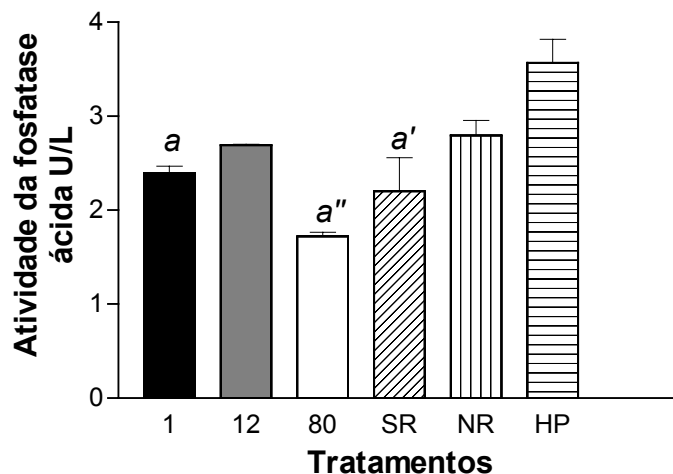


Figura 16. Atividade da fosfatase ácida (U/L) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP) tratados durante 30 dias (V.O.) com extrato lipoesterólico de *S. repens* (SP, 12 mg/kg), fração diclorometânica de *C. officinalis* (1, 12, 80 mg/kg). Todos os resultados foram expressos em termos de média \pm EPM, $n=6$, sendo que (a), (a'), (a'') representam diferenças significativas em relação ao controle hiperplásico para $p<0,05$, 0,01 e 0,001, respectivamente.

5.2.4 Níveis séricos de colesterol total

Ao se analisar o efeito de diferentes concentrações da fração diclorometano de *C. officinalis* (Figura 17) observou-se que nenhum destes tratamentos apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle hiperplásico e em relação ao grupo controle positivo, apesar de mostrarem uma tendência de redução nos valores obtidos.

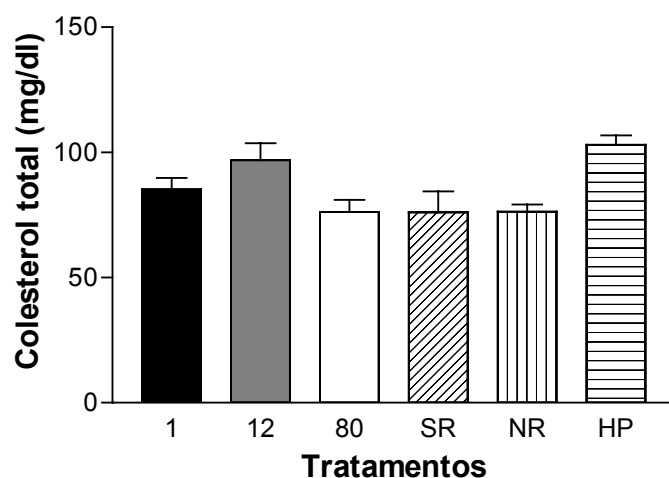


Figura 17. Valores de colesterol total (mg/dL) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásico (HP), tratados durante 30 dias (V.O.) com extrato lipoesterólico de *S. repens* (SR, 12 mg/kg) e fração diclorometânica de *C. officinalis* (1, 12, 80 mg/kg). Resultados expressos em média \pm EPM, n=6.

5.2.5 Níveis de testosterona tecidual

As concentrações de *C. officinalis* de 1 e 80 mg/kg causaram uma elevação na concentração tecidual de testosterona com uma diferença significativa ($p < 0,001$), em relação ao grupo controle hiperplásico, apresentando um aumento de 89% e 164%, respectivamente (Figura 18). Quando a concentração de 80mg/kg foi comparada ao grupo controle normal, apresentou um aumento de 45%, sendo este aumento estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

Quando os resultados obtidos para *C. officinalis* nas concentrações de 1 e 80 mg/kg foram comparadas aos de *S. repens* observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$), com aumentos de 71% para a concentração de 1 mg/kg, e 139% para 80 mg/kg. Sendo que estas concentrações apresentam um efeito melhor que a *S. repens*.

A concentração de 12 mg/kg, apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa, mostrou uma tendência de aumento, sugerindo um efeito sobre os níveis teciduais de testosterona. Entretanto, mas uma vez os dados obtidos com esta dose intermediária foram inesperados, uma vez que este apresentou valores de testosterona menores que a dose de 1mg/Kg.

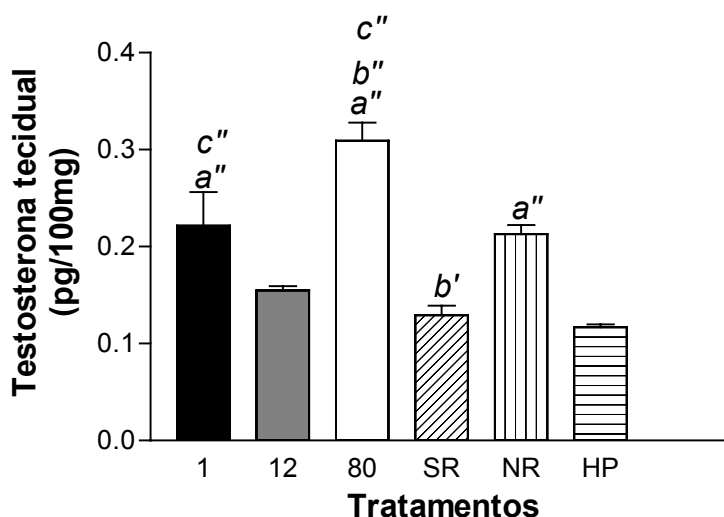


Figura 18. Níveis de testosterona tecidual (pg/100mg tecido prostático) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP) tratados durante 30 dias (V.O.) com extrato lipoesterólico de *S. repens* (SP, 12 mg/kg), fração diclorometânica de *C. officinalis* (1, 12, 80 mg/kg). Todos os resultados foram expressos em termos de média \pm EPM, n=6, sendo que (a'') representa diferença significativa em relação ao controle hiperplásico ($p < 0,001$), e (b'), (b'') representam diferenças significativas em relação ao controle normal ($p < 0,01$ e $0,001$), respectivamente, e (c'') representa diferença significativa em relação à *S. repens* ($p < 0,001$).

5.2.6 Níveis de DHT tecidual

Ao analisar o efeito de diferentes concentrações da fração diclorometano de *C. officinalis* (Figura 19) sobre os níveis teciduais de DHT, observou-se uma redução na concentração deste andrógeno em relação ao grupo hiperplásico, com uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) para as concentrações de 1, 12 e 80 mg/kg,

sendo as reduções de 64%, 52% e 82%, respectivamente, para estas concentrações. Estes valores podem ser comparados aos valores expressos pelo grupo controle normal, já que estes tratamentos não apresentaram diferenças significativas.

As reduções apresentadas pelas concentrações de 1 e 80 mg/kg podem ser comparadas às do fitoterápico de referência (*S. repens*), já que não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

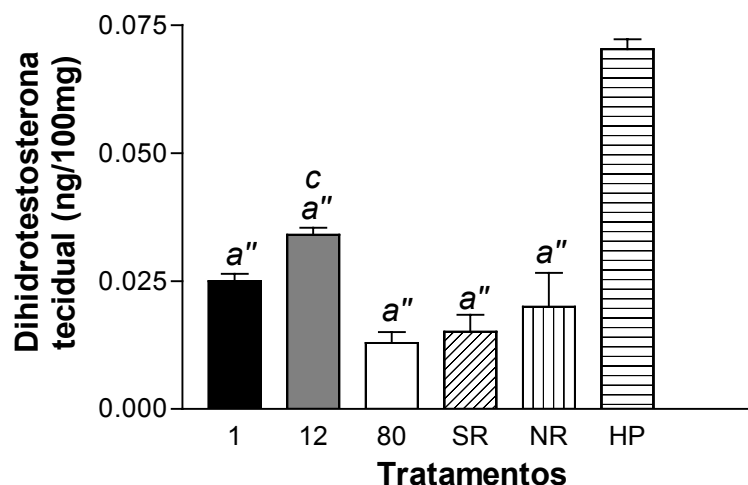


Figura 19. Níveis de DHT tecidual (ng/100 mg tecido prostático) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP) tratados durante 30 dias (V.O.) com extrato lipoesterólico de *S. repens* (SP, 12 mg/kg), fração diclorometânica de *C. officinalis* (1, 12, 80 mg/kg). Todos os resultados foram expressos em termos de média \pm EPM, n=6, sendo que (a), (a') representam diferenças significativas em relação ao controle hiperplásico ($p < 0,05$ e $0,01$ respectivamente), e (c) representa diferença significativa em relação à *S. repens* ($p < 0,05$).

5.3 EFEITO ANTI-HIPERPLÁSICO PROSTÁTICO DE FITOSTERÓIS

5.3.1 Peso da próstata

Ao analisar o efeito de diferentes fitosteróis (β -sitosterol, estigmastadienona, estigmasterol, estigmastanol) sobre o peso da próstata (figura 20), observou-se uma redução no peso da próstata, com uma diferença estatisticamente significativa para o β -sitosterol ($p < 0,001$), estigmastadienona ($p < 0,01$), estigmasterol e estigmastanol ($p < 0,05$), em relação ao controle hiperplásico. Estas reduções foram de 49%, 35% e 26% e 25% para o β -sitosterol, estigmastadienona, estigmasterol e estigmastanol, respectivamente. Tais reduções podem ser comparadas ao valor de normalidade expresso pelo grupo controle normal.

Quando os tratamentos com os diferentes fitosteróis foram comparados ao tratamento com a finasterida, observou-se que, apesar de apresentarem uma redução significativa do peso da próstata, esta redução foi menor que aquela obtida pelo fármaco sintético.

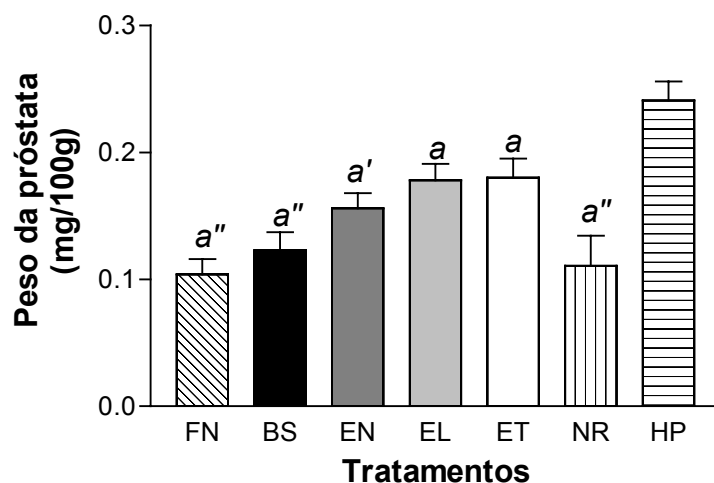


Figura 20. Peso da próstata (mg/100g) de ratos normais (falso castrados) (NR) e hiperplásicos (HP), tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), e diferentes fitosteróis (12 mg/kg): β -sitosterol (BS); estigmastadienona (EN); estigmasterol (EL); estigmastanol (ET). Todos os resultados são expressos em termos de média \pm EPM, n=6, Sendo que (a), (a'), (a'') representam diferenças significativas em relação ao controle hiperplásico ($p < 0,05$, 0,01 e 0,001, respectivamente).

5.3.2 Peso da vesícula seminal

Ao analisar o efeito dos diferentes tratamentos sob o peso da vesícula seminal (Figura 21) não se observou nenhuma redução estatisticamente significativa, quando comparados ao controle hiperplásico e normal.

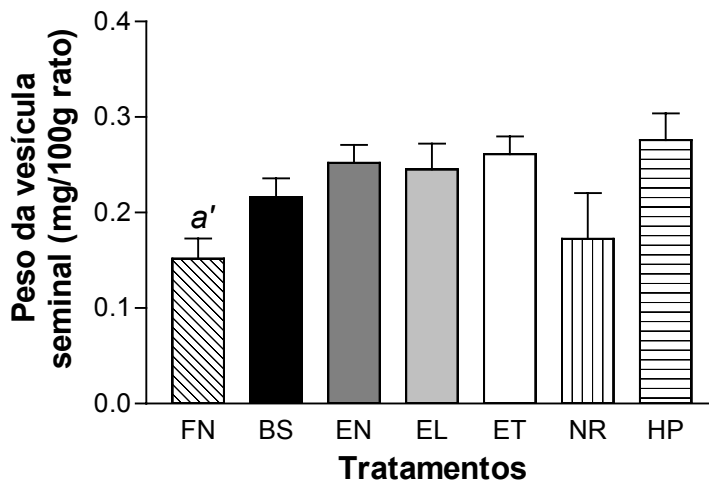


Figura 21. Peso da vesícula seminal (mg/100g rato) de ratos normais (falso castrados) (NR) e hiperplásicos (HP) durante 30 dias (V.O.), tratados com finasterida (FN, 4 mg/kg), e diferentes fitosteróis (12 mg/kg): β -sitosterol (BS); estigmastadienona (EN); estigmasterol (EL); estigmastanol (ET). Todos os resultados são expressos em termos de média \pm EPM, $n=6$, sendo que (a') representa diferença significativa em relação ao grupo controle hiperplásico ($p<0,01$).

5.3.3 Atividade da fosfatase ácida

Observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p<0,001$) na atividade da fosfatase ácida para o β -sitosterol, estigmastanol e estigmasterol em relação ao grupo controle hiperplásico (Figura 22). Estas reduções corresponderam a 32%, 31% e 28% de redução, respectivamente. Entretanto, estes valores não podem ser comparados àqueles do grupo controle normal, já que apresentaram uma diferença significativa. O efeito dos fitosteróis testados podem ser comparados ao inibidor específico da 5- α -redutase já que não apresentaram diferença significativa.

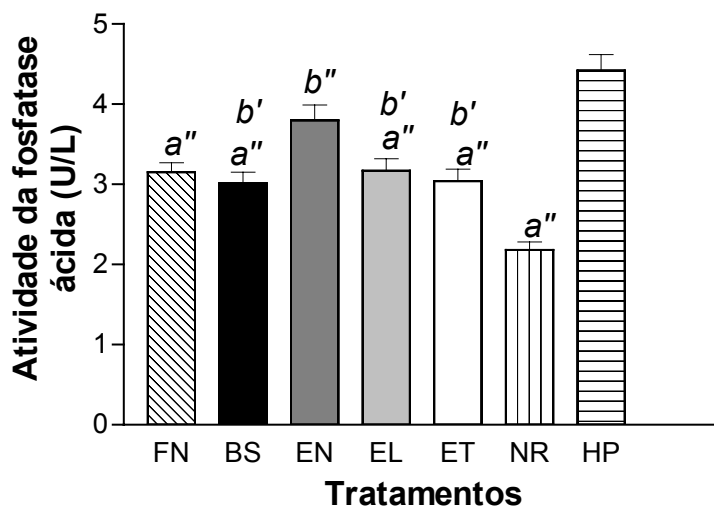


Figura 22. Atividade da fosfatase ácida (U/L) de ratos normais (falso castrados) (NR), ratos hiperplásicos (HP), tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), e diferentes fitosteróis (12 mg/kg): β -sitosterol (BS); estigmastadienona (EN); estigmasterol (EL); estigmastanol (ET). Todos os resultados expressos em termos de média \pm EPM, n=6, sendo que (a'') representa diferença significativa em relação ao controle hiperplásico para $p < 0,001$, e (b'), (b'') representam diferenças significativas em relação ao grupo controle normal para $p < 0,01$ e $0,001$, respectivamente.

5.3.4 Níveis séricos de colesterol total

Ao se analisar o efeito dos diferentes fitosteróis (Figura 23) sobre os níveis de colesterol, pode-se observar que nenhum dos tratamentos testados apresentou alterações estatisticamente significativas nas concentrações de colesterol em relação ao grupo controle hiperplásico. Em relação ao inibidor específico da 5α -redutase (FN), também não houve redução significativa.

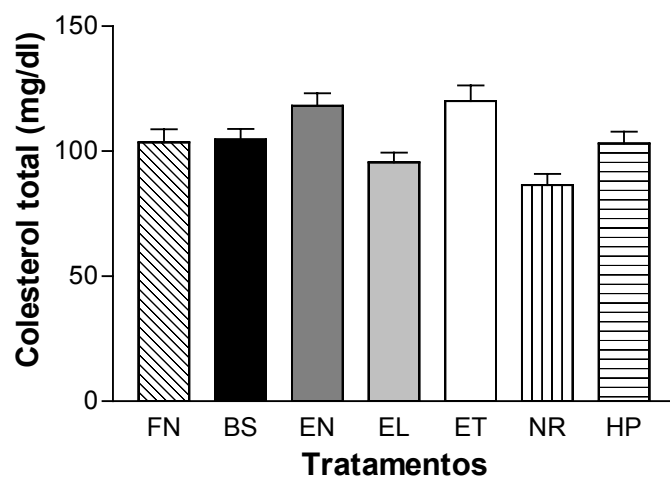


Figura 23. Níveis de colesterol (mg/dL) dos ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP), tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), e diferentes fitosteróis (12 mg/kg): β -sitosterol (BS); estigmastadienona (EN); estigmasterol (EL); estigmastanol (ET). Todos os resultados estão expressos em termos de média \pm EPM, n=6.

5.3.5 Níveis teciduais de testosterona

Observou-se uma redução de 29% dos valores de testosterona tecidual em relação ao grupo controle hiperplásico para o estigmastanol ($p < 0,05$) (Figura 24), Porém, estes valores ainda foram superiores àquele observado no grupo controle normal.

Quando o efeito dos diferentes fitosteróis foram comparados ao da finasterida, não houve diferença estatisticamente significativa.

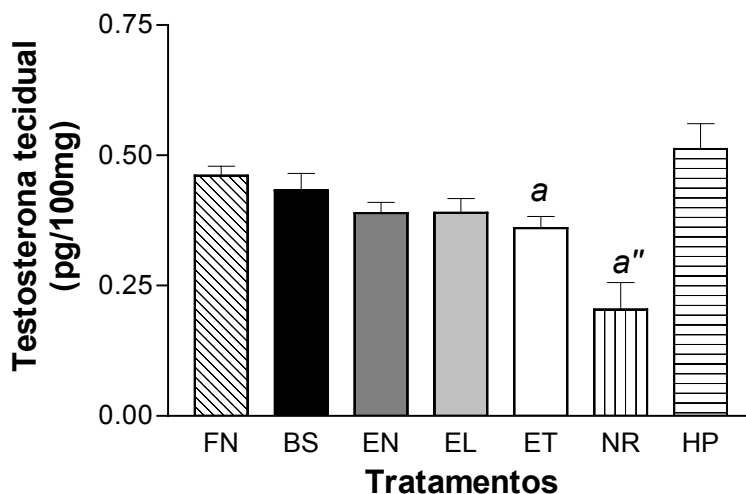


Figura 24. Níveis teciduais de testosterona (pg/100mg) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP), tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), e diferentes fitosteróis (12 mg/kg): β -sitosterol (BS); estigmastadienona (EN); estigmasterol (EL); estigmastanol (ET). Todos os resultados foram expressos termos de média \pm EPM, n=6, sendo que (a), (a'') representam diferenças significativas em relação ao controle hiperplásico ($p < 0,05$ e 0,001, respectivamente).

5.3.6 Níveis teciduais de DHT

Ao analisar o efeito de diferentes fitosteróis (Figura 25) sobre os níveis teciduais de DHT, observou-se uma redução significativa dos valores de DHT tecidual para o β -sitosterol ($p < 0,001$), estigmasterol ($p < 0,01$) e estigmastanol ($p < 0,05$) e estigmastadienona ($p < 0,05$), em relação ao grupo controle hiperplásico. Estas reduções foram de 60% para o β -sitosterol, 43% e 40% para o estigmasterol e estigmastanol, respectivamente, e de 33% para a estigmastadienona. Estes valores são comparáveis aos valores expressos pelo grupo controle normal.

Quando os efeitos destes fitosteróis foram comparados ao tratamento com a finasterida, observou-se que, apesar do β -sitosterol, estigmasterol, estigmastanol e estigmastadienona tendo levado a uma redução significativa dos valores de DHT tecidual, esta redução foi menor que aquela obtida pela finasterida (Figura 25).

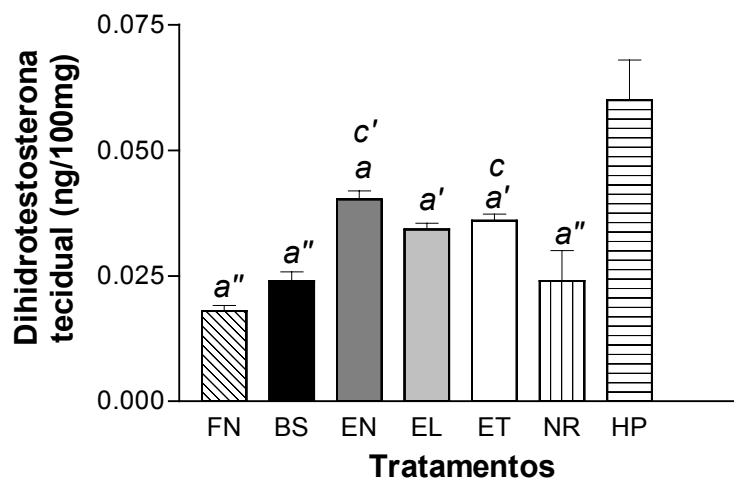


Figura 25. Níveis séricos de DHT (ng/100mg) de ratos normais (falso castrados) (NR), hiperplásicos (HP), tratados durante 30 dias (V.O.) com finasterida (FN, 4 mg/kg), e diferentes fitosteróis (12 mg/kg): β -sitosterol (BS); estigmastadienona (EN); estigmasterol (EL); estigmastanol (ET). Todos os resultados foram expressos em termos de média \pm EPM, n=6, sendo que (a), (a') e (a'') representam diferenças significativas em relação ao controle hiperplásico ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $0,001$, respectivamente), e (c), (c') representam diferenças significativas em relação à finasterida para $p < 0,05$ e $0,01$, respectivamente.

6 DISCUSSÃO

A próstata é um órgão que depende da regulação da DHT para o seu crescimento e desenvolvimento. A DHT é sintetizada no testículo a partir da testosterona pela ação da enzima 5- α -redutase (STEERS, et al., 1995). Além da próstata, a vesícula seminal, glândula responsável pela secreção do líquido seminal, também tem seu desenvolvimento celular fortemente influenciado pela ação destes mesmos andrógenos (STEERS, 2001). Desta forma a hipertrofia ou hiperplasia desta glândula também pode ser utilizada como um dado complementar na avaliação da influência da testosterona, DHT e compostos agonistas ou antagonistas destes hormônios esteróides. O modelo experimental utilizado no presente trabalho utiliza a avaliação de possíveis alterações do peso da próstata e vesícula seminal associado a medida da atividade da fosfatase ácida, concentração do colesterol sanguíneo e testosterona e DHT tecidual como indicadores de progressão ou regressão da HBP induzida em ratos. Através deste modelo foi testado o efeito de extrato e frações da *C. officinalis* bem como alguns fitosteróis, padrões de fármacos sintéticos e fitofármacos empregados no tratamento da HBP.

A elevação do peso da próstata em ratos castrados e submetidos a tratamento com testosterona foi utilizado como principal indicador de hiperplasia prostática e reversão deste processo foi medida através da redução do peso deste órgão. Desta forma as frações diclorometano e supercrítica da *C. officinalis* apresentaram importante reversão do processo proliferativo. Apesar da fração supercrítica apresentar melhores resultados, a dificuldade de obtenção de quantidade suficiente para realizar os estudos com diferentes concentrações nos obrigou a continuar os ensaios com a fração diclorometano. Estes ensaios demonstraram que o efeito anti-hiperplásico prostático foi dose/dependente uma vez que houve uma redução progressiva do peso da próstata com a elevação das concentrações da fração diclorometânica atingindo uma redução máxima em 80 mg/kg. O efeito destas frações pode estar associado com sua composição química, rica em fitosteróis e triterpenos (LOGGIA, et al., 1994;

BLUMENTAL, et al., 2000). Entretanto, outros estudos fitoquímicos e ensaios biológicos se fazem necessários para avaliar a real participação destes compostos nesta atividade anti-hiperplásica.

Por outro lado, os fitosteróis testados também apresentaram atividade anti-hiperplásica uma vez que foram capazes de reduzir o peso da próstata. Dentre estes compostos o que apresentou melhor resultado foi o β -sitosterol. Nossos dados estão de acordo com dados apresentados na literatura onde alguns estudos clínicos têm demonstrado o efeito anti-hiperplásico prostático do β -sitosterol em pacientes com HBP tratados com β -sitosterol (60 mg/Kg/dia) durante 6 meses (BERGES, et al., 1995; KLIPPEL, et al., 1997; WILT, et al., 1999; BERGES, et al., 2000).

As estruturas químicas do β -sitosterol e estigmasterol têm levado alguns autores a sugerirem que o mecanismo de ação destes fitosteróis possam estar relacionados ao metabolismo de andrógenos porque eles poderiam competir com compostos endógenos de estrutura similar e reduzir desta maneira a exposição de células prostáticas a estimulação hormonal (MARANDOLA, et al., 1997).

Também é interessante notar que o efeito redutor do peso da próstata tanto para o tratamento com *C. officinalis* como para o β -sitosterol pode ser comparado a aquele observado com os dois controles positivos utilizados, finasterida e extrato lipoesterólico da *S. repens*, já que não apresentaram uma diferença estatisticamente significativa entre eles. Desta forma podemos supor que a planta em pauta poderia efetivamente possuir um potencial terapêutico, uma vez que apresentou um efeito semelhante a fitofármacos já existentes no mercado, Azuprostat[®] e Permixon[®].

O efeito das frações e extrato da *C. officinalis* e fitosteróis sobre a vesícula prostática não foi significativo. Apesar de terem levado a certa redução matemática no que se refere ao peso da vesícula seminal, esta não foi estatisticamente significativa, o que seria sugestivo de uma baixa atividade sobre esta glândula. Desta forma acredita-se que as frações e o extrato de *C. officinalis* e fitosteróis testados apresentariam um possível efeito anti-androgênico seletivo para próstata.

Na clínica médica a medida da atividade da fosfatase ácida sérica tem sido utilizada como um marcador bioquímico para o acompanhamento da evolução do processo hiperplásico prostático (MOTTA, 2000). O aumento da atividade desta enzima têm sido observadas em homens com HBP e com câncer de próstata (JACOBSEN, et al., 1995). Estas elevações têm sido atribuídas ao aumento da massa epitelial, destruição do tecido local, congestionando o ducto prostático e concomitante extravasamento de enzimas do líquido seminal para circulação sanguínea. Então a atividade da fosfatase ácida pode ser utilizada como marcador bioquímico indireto para detectar proliferação do epitélio prostático (MACNEAL, 1990). Portanto, com o modelo experimental utilizado esperava-se que os ratos controle hiperplásicos apresentassem atividade da fosfatase ácida sérica superior aos ratos normais. Por outro, lado também era esperado que tanto o extrato e frações da *C. officinalis* como os fitosteróis, por redução do volume prostático, levassem a um menor extravasamento sanguíneo do líquido seminal com conseqüente redução da fosfatase ácida circulante. Os dados obtidos confirmaram parcialmente estas expectativas, tendo-se observado reduções significativas na atividade desta enzima com a maior parte dos extratos e frações testados bem como os fitosteróis, exceto com a estigmastadienona. Os ensaios com diferentes concentrações da fração diclorometânica da *C. officinalis* também demonstraram uma tendência a uma resposta dose-dependente, apesar de a concentração de 12 mg/kg ter apresentado uma redução menor que a concentração de 1 mg/kg.

Apesar de não termos encontrado na literatura nenhuma referência sobre o comportamento da fosfatase ácida frente ao tratamento com a finasterida, seria de se esperar que ocorresse uma redução na atividade desta enzima uma vez que este fármaco quando utilizado na terapia da HBP tem apresentado bons resultados no que se refere a redução do volume prostático, podendo chegar a até 27% de redução do volume do órgão (GORMLEY, 1995). Entretanto, em nossos experimentos, a finasterida não reduziu a atividade da fosfatase ácida, no experimento com a calêndula, que está presente no tecido prostático e se encontra elevada no sangue pelo seu extravasamento na circulação como explicado anteriormente. Entretanto, os extratos e frações da calêndula apresentaram efeito similar àqueles obtidos com a fração

lipoesteróica da *S. repens*, que também reduziu a atividade da fosfatase ácida. Estes resultados, juntamente com a redução do peso prostático contribuem para evidenciar o efeito anti-hiperplásico prostático da calêndula e do β -sitosterol.

Um efeito inesperado foi observado com a fração diclorometânica na concentração de 12mg/kg, que apresentou um perfil diferente das outras concentrações. Em praticamente todas as dosagens, exceto no peso da próstata, ela sempre apresentou um efeito menor que a concentração de 1 mg/kg. A partir do modelo experimental utilizado e de todos os dados obtidos até o presente momento não possuímos nenhuma expliação que possa justificar este comportamento errático na dose de 12 mg/kg.

O fato de haver alguns resultados controversos em relação a atividade da fosfatase ácida, nos fez perceber a necessidade da medida da atividade desta enzima diretamente no tecido prostático, como uma medida mais precisa da proliferação celular. Pois o que a literatura descreve sobre este marcador bioquímico é que este é caracterizado por uma baixa especificidade no sangue uma vez que ele poderia estar alterado em outras condições fisiológicas e patológicas (RAVEL, 1995).

A fosforilação e a desfosforilação de resíduos de tirosina têm um papel importante na proliferação e diferenciação das células, e este processo é regulado por um equilíbrio dinâmico entre proteínas tirosina kinases e proteínas tirosina fosfatase (LIN, et al., 2001). A atividade da fosfatase ácida no tecido prostático, uma enzima da família proteína tirosina fosfatase, está relacionada com a inibição da proliferação celular, uma vez que esta enzima defosforila as proteínas tirosina kinases responsáveis pela ativação da comunicação celular via cascata de fosforilação, que ativam os fatores de transcrição citosólicos e nucleares, que estimulam a síntese protéica e de fatores de crescimento e proliferação celular (LIN, et al., 2001). Estudos recentes comprovam que a atividade da fosfatase ácida prostática tecidual está inversamente relacionada com a razão de crescimento das células cancerosas prostáticas, sugerindo um papel direto da fosfatase ácida celular no controle da taxa de proliferação destas células (LIN, et al., 2001).

Os andrógenos testiculares são sintetizados no tecido intersticial pelas células de Leydig. O precursor imediato dos esteróides gonadais, da mesma forma que para os esteróides da adrenal, é o colesterol (WILSON, 1998). Uma vez que este esteróide é o precursor da testosterona acredita-se que esteja envolvido na gênese da HBP uma vez que se observa aumento da concentração deste esteróide no tecido hiperplásico prostático (DREICORN, et al., 1990). Segundo CRISTONI A. e colaboradores (2000), o colesterol e seus ésteres estão envolvidos no metabolismo dos androgênios, sendo responsáveis em parte pelo aumento do número de receptores de androgênio no tecido prostático. Eles relatam um efeito hipocolesterolêmico para algumas plantas medicinais utilizadas popularmente no tratamento da HBP, como por exemplo a *P. africanum*. Curiosamente o extrato e as frações da *C. officinalis* testados não levaram a alteração significativa nos níveis sanguíneos do colesterol. Da mesma forma os fitosteróis testados também não apresentaram efeito sobre os níveis circulantes desse esteróide. Portanto, é provável que o possível efeito anti-hiperplásico prostático da *C. officinalis* e fitosteróis não envolveria a redução da concentração do colesterol e a ação destes não estaria associada ao metabolismo da testosterona a partir do colesterol.

A testosterona e DHT são hormônios androgênicos predominantes nos mamíferos machos. Eles estão envolvidos na diferenciação sexual, na espermatogênese, no desenvolvimento de órgãos sexuais, no metabolismo anabólico, na regulação gênica e com o padrão masculino de comportamento (NEIVA, 2002). As células-alvo clássicas para a DHT são as prostáticas, a vesícula seminal, a genitália externa e a pele genital (STEERS, 2001).

A testosterona livre penetra na célula através da membrana plasmática, tanto por difusão passiva como facilitada. Células-alvo retêm testosterona, presumivelmente devido à associação do hormônio com um receptor intracelular específico. O citoplasma de muitas células-alvo contém a enzima 5- α -redutase, que converte testosterona em DHT. A localização do complexo testosterona/DHT-receptor é pré-requisito para a ação androgênica. A ligação do complexo receptor-esteróide à cromatina ativa genes específicos. Então, a testosterona estimula síntese protéica em órgãos acessórios masculinos, um efeito usualmente associado ao acúmulo de RNA, incluindo mRNA,

tRNA e rRNA com conseqüente aumento da taxa de transcrição gênica (ADLER, et al., 1992). Através deste mecanismo os hormônios androgênicos estimulam a replicação de células em alguns tecidos-alvos, como por exemplo a próstata e vesícula seminal. Desta forma, testosterona e DHT parecem estar implicadas na divisão extensiva e descontrolada de células da próstata, o que resulta em HBP, uma condição patológica que aflige mais de 75% dos homens a partir dos 60 anos. Portanto, hipoteticamente utilizando nosso modelo experimental o tratamento com elevada concentração de testosterona (2,4 mg/kg) induz o processo hiperplásico com conseqüente elevação do peso da próstata e que seria revertido na presença de fármacos ou fitofármacos anti-HBP. Do ponto de vista bioquímico este processo poderia ser acompanhado pela medida da concentração de testosterona e DHT na próstata.

De fato, ao observarmos os resultados obtidos podemos notar que na maioria dos tratamentos, tanto controles positivos (finasterida e *S. repens*) quanto *C. officinalis* e fitosteróis ocorreram elevações nas concentrações teciduais de testosterona, apesar de não apresentarem diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle hiperplásico. Entretanto, não é surpreendente termos encontrado dificuldades em mensurarmos alterações significativas deste andrógeno, uma vez que é sabido que seu nível plasmático e gonadal pode atingir concentrações no mínimo 200 vezes maiores que a DHT (WILSON, et al., 1998), concentração esta que dificilmente poderia ser revertida ou alterada por algum tipo de tratamento.

A testosterona é o principal produto de secreção das células de Leydig dos testículos e sofre conversão a DHT em algumas células-alvos de andrógenos, antes da ligação ao receptor androgênico. Esta conversão requer a atividade da 5- α -redutase e o produto reduzido formado é o ligante preferencial do receptor (CARSON, et al., 1990). Utilizando nosso modelo experimental podemos constatar que os níveis de DHT teciduais foram significativamente reduzidos para todas as frações e extrato de *C. officinalis*, inclusive nas três concentrações testadas da fração diclorometânica e para os fitosteróis, sugerindo uma possível ação destes produtos sobre a enzima 5- α -redutase. Entretanto, novos estudos precisam ser realizados para se confirmar esta

suposição, particularmente a determinação *in vitro* do efeito de extratos e frações da calêndula bem como de fitosteróis sobre a enzima conversora da testosterona.

Houve uma divergência com respeito aos valores de testosterona obtidos nos grupos controle hiperplásicos do tratamento com fitosteróis e com a calêndula. Esta diferença nos dados obtidos se deve ao fato de que para o ensaio com os fitosteróis foi feita uma conversão matemática dos valores de testosterona no sangue para o tecido prostático. Já no caso do tratamento com a calêndula houve efetivamente a determinação deste andrógeno no tecido prostático. Este resultado controverso nos fez perceber a necessidade de se fazer a repetição dos experimentos para melhor caracterizar o efeito dos fitosteróis sobre os níveis teciduais de testosterona.

Relatos clínicos recentes que têm demonstrado a moderada eficácia terapêutica dos inibidores da enzima 5- α -redutase, bem como dos antagonistas de receptores α 1-adrenérgicos, têm conduzido a novas investigações bioquímicas sobre a base desta patologia, com o objetivo de propor alvos moleculares para a pesquisa de novos fármacos para HBP (PAPATSORIS, et al., 2001). Desta forma muito tem sido investido no estudo de fatores de crescimento e proliferação celular, particularmente EGF, bem como na compreensão das cascatas de fosforilação associadas a transdução de sinal via receptores de EGF e DHT. Neste contexto tem papel preponderante as proteínas kinases de ativação mitogênica (MAPKs) da cascata de transdução de sinal que intermediam respostas celulares ligadas a modificações do meio e que freqüentemente estão associadas a patofisiologias caracterizadas por proliferação celular, entre elas a HBP (PAPATSORIS, et al., 2001).

As MAPKs são uma família de proteínas prolina-serina/treonina kinase que é forma uma cascata de fosforilação composta por três componentes, ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase), SAPK (Stress-Activated Protein Kinase) e p38MAPK. A cascata ERK é iniciada por ligantes mitogênicos via receptores da superfície celular tipo portina G-receptor serpentiforme e receptor tirosina-kinase resultando na fosforilação da cascata e subsequente potenciação de fatores de transcrição associados a proliferação e diferenciação celular (DAVIS, R. J., 2000). Um grande número de fatores

de crescimento que são produzidos pelas células basais e estromais da próstata (exemplo, EGF [epidermal growth factor], IGF[insulin-like growth factor], FGF[fibroblast growth factor]) já estão caracterizados como estimuladores da cascata ERK, e estão superexpressos na próstata (HABIB, et al., 1991). Por outro lado, andrógenos como DHT, podem também ativar a cascata ERK diretamente (PETERZIEL, et al., 1999). Então, novos fármacos e fitofármacos anti-hiperplásicos prostáticos e os já existentes poderiam ter sua ação sobre a HBP associada também à inibição das MAPKs, particularmente a ERKs .

Os dados obtidos com o presente trabalho nos levam a sugerir que o possível efeito do extrato e frações da *C. officinalis* e fitoesteróis possivelmente estejam associados à inibição da enzima 5- α -redutase uma vez que estes quase sempre foram capazes de reduzir o peso da próstata e vesícula seminal, bem como elevar o níveis tecidual de testosterona e reduzir os de DHT, e também com redução da atividade da fosfatase ácida. Entretanto, os resultados não foram completamente homogêneos o que nos faz especular sobre a possibilidade de uma redução do processo hiperplásico por bloqueio das cascatas de fosforilação tipo MAPKs desencadeadas por receptores EGF. É importante ressaltar que alguns estudos *in vitro* têm demonstrado a capacidade de alguns flavonóides de inibirem a transdução de sinal via receptores tirosina-kinase desencadeados por EGF (AKIYAMA, et al, 1987), e a *C. officinalis* é uma planta rica em flavonóides (BLUMENTAL, et al., 2000). Entretanto, outros estudos *in vitro* e *in vivo* precisam ser realizados para avaliar esta hipótese. Em resumo, nossos resultados nos permitiram sugerir que os extratos e frações da *C. officinalis* e fitosteróis possuem atividade anti-hiperplásica prostática, e que possivelmente a inibição da 5- α -redutase esteja envolvida na mediação deste efeito.

7 PERSPECTIVAS

Os questionamentos que surgiram durante o desenvolvimento deste trabalho e que não puderam ser respondidos até a sua conclusão, são apresentados como perspectivas futuras:

- O fato de que o perfil dos nossos tratamentos terem sido a diminuição do peso da próstata juntamente com a diminuição dos níveis teciduais de DHT nos fez acreditar que o mecanismo de ação para os compostos testados poderia estar relacionado com a inibição da enzima 5- α -redutase. Desta forma uma das perspectivas para este trabalho seria uma caracterização do efeito das frações e extrato da *C. officinalis* e fitosteróis sobre a atividade da 5- α -redutase, em tecido prostático e em cultura de células prostáticas.
- Uma vez que a atividade da fosfatase ácida é caracterizada por uma baixa especificidade no sangue, e o fato de nossos resultados terem sido controversos a respeito deste marcador bioquímico, nos fez ter como perspectiva a medida da atividade da fosfatase ácida diretamente no tecido. A atividade desta enzima no tecido está inversamente relacionada com o crescimento das células prostáticas, uma vez que sua ação no tecido prostático está relacionado com a inibição da proliferação celular já que desfosforila as proteínas tirosina kinases responsáveis pela ativação da comunicação celular.
- O fato de existir a possibilidade de uma redução do proceso hiperplásico por bloqueio das cascatas de fosforilação tipo MAPK que são desencadeadas por receptores EGF, que são reguladas por testosterona e DHT, nos fez ter como perspectiva a medida de EGF como uma possível caracterização do mecanismo de ação destes compostos testados. Juntamente com esta possibilidade existe o fato de que a *C. officinalis* é uma planta rica em flavonóides e estudos *in vitro* estarem demonstrando a capacidade de alguns

flavonóides inibirem a transdução do sinal via receptores tirosina-kinase desencadeadas por EGF.

8 CONCLUSÕES

O modelo experimental para hiperplasia prostática induzida em ratos utilizado neste trabalho, nos permitiu evidenciar o efeito anti-hiperplásico prostático de alguns produtos naturais. Desta forma foi possível concluir que:

- A fração supercrítica de *C. officinalis*, na dose testada, possui um efeito redutor na hiperplasia prostática, já que reduziu o peso da próstata, a atividade da fosfatase ácida e a concentração tecidual de DHT.
- A fração diclorometano de *C. officinalis* também apresentou um efeito anti-hiperplásico prostático, já que reduziu o peso da próstata juntamente com a redução dos níveis teciduais de DHT e aumento dos níveis teciduais de testosterona, sendo este efeito dose-dependente.
- Todos os fitosteróis testados, especialmente o β -sitosterol, exercem alguma atividade anti-hiperplásica prostática, sobretudo em relação a redução do peso da próstata, diminuição da atividade da fosfatase ácida e níveis teciduais de DHT.
- O efeito redutor de peso prostático associado a redução nos níveis teciduais de DHT apontam para uma possível atividade inibitória sobre a enzima 5- α -redutase.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, A. J.; DANIELSON, M.; ROBINS, D.M. Androgen-specific gene activation via a consensus glucocorticoid response element is determined by interaction with nonreceptor factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 11660, 1992.

AKIYAMA, T., et al. Genistein, a specific inhibitor of Tyrosine-specific protein kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 12, p. 5592-5595, 1987.

ALAIN, C. A., et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, p. 470-475, 1974.

BACH, D.; SCHMITT, M.; EBELING, L. Phytopharmaceutical and synthetic agents in the treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH). **Phytomedicine**, v. 3, n. 4, p. 309-313, 1996.

BARTSCH, G.; RITTMASER, R. S.; KLOCKER H. Dihydrotestosterone and the Concept of 5 α -Reductase Inhibition in Human Benign Prostatic Hyperplasia. **European Urology**, v. 37, p. 367-380, 2000.

BERGES, R.R.; KASSEN A.; SENGE, T. Treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia with [beta]-sitosterol: an 18-month follow-up. **British Journal of Urology**, v. 85, p.842-846, 2000.

BERGES, R. R., et al. Randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial of β -sitosterol in patients with benign prostatic hyperplasia. **The Lancet**, v. 345, n. 17, p. 1529-1532, 1995.

BERRY, S. J., et al. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. **The Journal of Urology**, v. 132, n. 3, p. 474-479, 1984.

BLOCK, L. C., et al. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 1, p. 85-89, 1998.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. **Herbal Medicine**. 1ª edição. Newton M.: Integrative Medicine Communications, 2000, p. 44-45.

BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. *Serenoa repens* (Bartram) J. K. Small. **Fitoterapia**, v. LXVIII, n. 2, p.99-113, 1997.

BRINKER, F. An overview of conventional, experimental, and botanical treatments of non-malignant prostate conditions. **The British Journal of Phytotherapy**, v. 3, n.4, p. 154-176, 1993/94.

BUCK, A. C. Phytotherapy for the prostate. **British Journal of Urology**, v. 78, n. 3, p. 325-336, 1996.

CAIRASCO, N. G. Orquiectomia de rato adulto. **Roteiro de aulas práticas do curso de verão da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP/SP)**, 1986, p. 1.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALZADA, B. C.; ARTIÑANO, A. A. Alpha-adrenoceptor subtypes. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 3, p. 197-208, 2001.

CARRARO, J. C., et al. Comparison of Phytotherapy (Permixon) with Finasteride in the treatment of benign prostatic hyperplasia: a randomized international study of 1.098 patients. **The prostate**, v. 29, p. 231- 240, 1996.

CARSON, J. M. A.; SCHRADER, W. T.; O'MALLEY, B. W. Steroid receptor family: structure and functions. **Endocr. Ver**, v.11, p. 201-245, 1990.

CILOTTI, A.; DANZA, G.; SERIO, M. Clinical application of 5 α -reductase inhibitors. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 24, p. 199-203, 2001.

COOPER, K. L. M.; MCKIERMAN, J. M.; KAPLAN S. A. α -Adrenoceptor Antagonists in the treatment of Benign Prostatic Hyperplasia. **Drugs**, v. 57, n. 1, p. 9-17, 1999.

COTRAN, R. S., et al. **Patologia estrutural e funcional**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p. 920-928.

CRISTONI, A.; PIERRO, F.; BOMBARDELLI, E. Botanical derivatives for the prostate. **Fitoterapia**, v. 71, p. 21-28, 2000.

DAVIS, R.J.. Signal transduction by ERK group of MAP kinase. **Cell**, v. 103, p. 239-252, 2000.

DREIKORN, K.; RICHTER, R.; SCHONHOFER, P. S. P. S. Konservative, nicht hormonelle Behandlung der benigne Prostatahyperplasie. **Urologie**, v. 28, p. 8-16, 1990.

FAREDI, I., et al. In vitro study of rat prostate 5 α -reductase activity and its inhibition. **International Urology and Nephrology**, v. 24, n. 2, p. 145-154, 1992.

FRANKLIN, C.; LOWE, KU J. C. Phytotherapy in treatment of benign prostatic hyperplasia: a critical review. **Urology**, v. 48, n. 1, p.12-20, 1996.

FURUYAMA, S.; MAYES, D. M.; NUGENT, C. A. A radioimmunoassay for plasma testosterone. **Steroids**, v.16, p. 415-428, 1970.

GOEPEL, M., et al. *Saw palmeto* extracts potently and noncompetitively inhibit human alpha1-adrenoceptors in vitro. **The Prostate**, v. 38, n. 3, p. 208-15, 1999.

GORMLEY, G. J. Finasteride: a clinical review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 49, p. 319-324, 1995.

GUTERRES, S.; ZIEGLER, S. Matérias-primas vegetais com ação antiinflamatória empregadas em produtos dermo-cosméticos. **Pharmacia Brasileira**, v. 30, p. 79-83, janeiro, fevereiro e março. 2002.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9ª edição Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 914.

HABIB, F.K.; CHISHOLM, G.D. The role of growth factors in the human prostate. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology** , v. 138, p. 53-58, 1991.

HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 19ª edição Editora Manole, 1999.

JACOBSEN, S. J.; GIRMAN, C. J.; LIEBER, M. M. Natural history of benign prostatic hyperplasia. **Urology**, v. 58, n. 6A, p. 5-16, 2001.

JOCHMANN, A. **Extração supercrítica de oleoresina de calêndula (*Calendula officinalis*)**. 2000. 113f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

KALVATCHEV, Z.; WALDER, R.; GARZARO, D. Anti-HIV activity of extract from *Calendula officinalis* flowers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 51, n. 4, p. 176-180, 1997.

KAPLAN, S. A. 5 α -reductase inhibitors: what role should they play?. **Urology**, v. 58, n. 6A, p. 65-69, 2001.

KELLY, A. P. **Principles and practice of dermatology**. 2ª edição, New York: Churchill Livingstone, p: 801-808, 1996.

KLIPPEL, K.F.; HILTL, D.M.; SCHIPP B. A multicentric, placebo-controlled, double-blind clinical trial of β -sitosterol (phytosterol) for the treatment of benign prostatic hyperplasia. **British Journal of Urology**, v. 80, p. 427-432, 1997.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Edição 1999. p. 12.22.

LEVINE, A. C.; KIRSCHENBAUM, A.; GABRILOVE J. L. The Role of Sex Steroids in the Pathogenesis and Maintenance of Benign Prostatic Hiperplasia. **The Mount Sinai Journal of Medicine**, v. 64, n. 1, p. 20-25, 1997.

LIN, M. F., et al. Decreased expression of cellular prostatic acid phosphatase increased tumorigenicity of human prostate cancer cells. **The Journal of Urology**, v. 166, p. 1943-1950, 2001.

LOGGIA, R. D., et al. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. **Planta Medica**, v. 60, p. 516-520, 1994.

LOWE, F. C.; KU, J. C. Phytotherapy in treatment of benign prostatic hyperplasia: a critical review. **Urology**, v. 48, n. 1, p.12-20, 1996.

MACNEAL, J. Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology. **The Urologic Clinics of North America**, v. 17, p. 477-486, 1990.

MARANDOLA, P.; BOMBARDELLI, E.; MARAZZONI, P. Main phytoderivatives in the management of benign prostatic hyperplasia. **Fitoterapia**, v. 68, p. 195, 1997.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações**. 3ª edição. Porto Alegre: Médica Missau, 2000, 101 p.

NEIVA, A. Andrógenos. In: Penildon Silva. **Farmacologia**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. volume único, 870-882.

PAPATSORIS, A. G.; PAPAVALASSILIOU, A. G. Molecular 'palpation' of BHP: a tale of MAPK signalling?. **Trends in Molecular Medicine**, v.7, n. 7, p. 287-292, 2001.

PATRICK, K. F. M., et al. Induction of vascularisation by an aqueous extract of the flowers of *Calendula officinalis* L. the European marigold. **Phytomedicine**, v. 3, n. 1, p. 11-18, 1996.

PAUBERT-BRAQUET, M., et al. Effect of *Serenoa repens* extract (Permixon®) on estradiol/testosterone-induced experimental prostate enlargement in the rat. **Pharmacological Research**, v. 34, n. 3-4, p. 171-179, 1996.

PETERZIEL, H. E.; BRONDELLO, J.M.; GUO, C. Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells. **Oncogene**, v. 18, p. 6322-6329, 1999.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico: Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogman, 1997. 491p.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. California: Wadsworth, Inc. 4ª edição, p. 315 – 317, 1991.

SCHOTTNER, M.; GANBER, D.; SPITELLER, G. Lignans from the roots of *Urtica dioica* and their metabolites bind to human sex hormone binding globulin (SHBG). **Planta Medica**, v. 63, p. 529-532, 1997.

SILVERIO, F. D., et al. Effects of long-term treatment with *Serenoa repens* (Permixon®) on the concentrations and regional distribution of androgens and epidermal factor in benign prostatic hyperplasia. **The prostate**, v. 37, p. 77-83, 1998.

STEERS, W. D. 5 α -reductase activity in the prostate. **Urology**, v. 48, n. 1, p. 17-24, 2001.

STEERS, W. D.; ZORN, B. Benign Prostatic Hyperplasia. **Disease-a-Month**, v. 41, n. 7, p. 447-497, 1995.

STENGER A., et al. Étude pharmacologique et biochemique de l'extrait hexanique de *Serenoa repens*. **Gazet Medicinal de France**. v. 89, p. 2041-2048, 1997.

TAMMELA, T. Benign Prostatic Hyperplasia – Practical Treatment Guidelines. **Drugs & Aging**, v. 10, n. 5, p. 349-366, 1997.

TAN, E. C. Pharmacotherapy in Benign Prostatic Hyperplasia. **Annals Academy of Medicine**, v. 24, n. 4, p. 615-618, 1995.

TANAGHO, E. A.; MCANINCH, J. W. **Urologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 13ª edição, p. 6-8, 292-302.

THOMPSON, I. M. Pharmacologic agents in complementary medicine in prostatic disease. **Drugs of Today**, v. 37, n. 6, p. 427-433, 2001.

TREMBLAY, R. R., et al. Measurement of plasma dehydrotestosterone by competitive protein-binding analysis. **Steroids**, v. 16, p. 29, 1970.

UNIGES. **Atlas de Salud** (gravura). Disponível em:
www.uniges.com/type/mod/pl01.asp?p01=atlasprostata. Acesso em: 13/04/2002.

WALTER, K.; SCHUTT, C. Saure and alkalische Phosphatase in Serum (Zwei-Punkt-Methode); in Bergmeyer H.U. (ed): Methoden der enzymatischen Analysen. **Weinheim, Verlag Chemie**, v.1, p. 818-822, 1970.

WILSON, D., et al. **Williams textbook of endocrinology**. 9^a edição. Philadelphia, WB: Saunders, 1998, p.546.

WILT, T. J.; MACDONALD, R.; ISHANI, A. β -sitosterol for the treatment of benign prostatic hyperplasia: a systematic review. **British Journal of Urology**, v. 83, p. 976-983, 1999.

ZIADA, A.; ROSENBLUM, M.; CRAWFORD, E. D. Benign prostatic hyperplasia: an overview. **Urology**, v. 53, p. 1-6, 1999.

10 ANEXOS