

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**“INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE *Ginkgo biloba* SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE LESÕES HEPÁTICAS PRÉ-
NEOPLÁSICAS INDUZIDAS PELA DIETILNITROSAMINA EM
RATOS WISTAR MACHOS.”**

Marcos Correa Dias

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do
título de Mestre no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada.

Botucatu - SP

2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU**

**“INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE *Ginkgo biloba* SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE LESÕES HEPÁTICAS PRÉ-
NEOPLÁSICAS INDUZIDAS PELA DIETILNITROSAMINA (DEN)
EM RATOS WISTAR MACHOS.”**

Mestrando: Marcos Correa Dias

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan

Departamento de Morfologia

Instituto de Biociências – UNESP

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências de Botucatu da Universidade
Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do
título de Mestre no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada.

Botucatu - SP

2007

1. Resumo

Os efeitos benéficos potenciais do extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) sobre o desenvolvimento de hepatócitos iniciados e de lesões hepáticas pré-neoplásicas induzidas pela dietilnitrosiamina (DEN) e expressando a enzima glutationa-S-transferase forma placentária (GST-P) foram investigados. Dois protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com a investigação das propriedades anti-carcinogênicas do EGb, onde ratos Wistar machos com 6 semanas de idade foram iniciados para a hepatocarcinogênese pela administração de uma dose única i.p. da DEN e alimentados com dieta basal ou suplementada com EGb durante os estágios de iniciação ou pós-iniciação. Para a análise de atividade anti-iniciadora (estudo de curta duração), os animais foram alimentados com dieta basal ou suplementada com 500 ou 1000ppm de EGb duas semanas antes a 24 horas após dose única de 100 mg/Kg de DEN (segunda semana experimental). Os animais foram sacrificados 24 horas após a DEN ou duas semanas depois (quarta semana experimental) e amostras hepáticas foram coletadas para a análise imunistoquímica de hepatócitos isolados e mini-focos GST-P positivos, expressão do fator de crescimento e transformação alfa (TGF- α) e cálculo dos índices de marcação para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), p53 e apoptose. Para a análise de atividade anti-promotora (estudo de média duração), os animais foram alimentados com dieta basal ou suplementada com 500 ou 1000ppm de EGb administradas duas semanas após dose única de 200 mg/Kg de DEN e mantidos por 6 semanas. Todos os animais foram submetidos à hepatectomia parcial de 70% e sacrificados nas semanas 3 e 8, respectivamente. Amostras de tecido hepático foram coletadas para análises do número, tamanho médio e área agregada de focos GST-P positivos. O tratamento com EGb (1000ppm) mostrou efeitos benéficos quando administrados antes ou concomitantemente a

DEN, como demonstrado pela redução dos hepatócitos isolados e mini-focos GST-P positivos ($P < 1,001$), expressão de TGF- α e nos índices de proliferação celular, p53 e apoptose ($P = 0,003$; $P = 0,049$; $P = 0,001$, respectivamente). Por outro lado, a administração do EGb durante a etapa de pós-iniciação não foi eficaz contra o desenvolvimento de focos GST-P positivos induzidos pelo tratamento com a DEN. Esses dados sugerem que o EGb (1000ppm) pode inibir a iniciação por DEN mas não a etapa posterior da hepatocarcinogênese química no rato. Os mecanismos envolvidos na quimioprevenção da hepatocarcinogênese precisam ser ainda explorados.

2. Abstract

Potential beneficial effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb) on development of putative initiated hepatocytes and preneoplastic liver lesions induced by diethylnitrosamine (DEN), both expressing the enzyme glutathione S-transferase P-form (GST-P), were investigated. Two experimental protocols were designed according to anti-initiating or anti-promoting properties of EGb where male 6-week-old Wistar rats were initiated for hepatocarcinogenesis with a single i.p. dose of DEN and fed basal or supplemented diet with EGb during the initiation or post-initiation stages. For anti-initiating screening (short-term study), groups were fed basal diet or containing 500 or 1000ppm EGb during 2-week before and 24 hours after a single i.p. injection of 100 mg/kg b.w. of DEN. All animals were killed 24 hours or 2-week after DEN treatment and liver samples were collected for the analysis of immunohistochemically detected single hepatocytes and minifoci positive for GST-P, TGF- α expression and p53, PCNA and apoptosis indices. For anti-promoting screening (medium-term study), groups were fed basal or 500 or 1000ppm EGb supplemented diet 2-week after 200 mg/kg b.w. of DEN injection for 6 weeks. All animals were subjected to 70% partial hepatectomy and killed at weeks 3 and 8, respectively. Liver samples were collected for the number and area of GST-P positive foci analysis. The 1000ppm EGb treatment showed significantly chemopreventive effects when administered before or during the DEN-treatment, as shown by significantly reducing GST-P positive single hepatocytes and minifoci induction ($P < 0.001$), TGF- α expression and cell proliferation ($P = 0.003$), p53 ($P = 0.049$) and apoptosis rates ($P = 0.001$). On the other hand, dietary administration with EGb during post-initiation stage failed to show significant chemopreventive effects against the development of preneoplastic GST-P positive foci induced by DEN-treatment. The data suggest that the EGb (1000ppm) can inhibit DEN-

initiation but not the post-initiation stage of rat chemical hepatocarcinogenesis. The underlying mechanism(s) of chemoprevention of DEN-induced hepatocarcinogenesis need to be explored.

3. Introdução

3.1) Quimioprevenção do Câncer

A quimioprevenção do câncer pode ser definida como a utilização de compostos químicos específicos, naturais ou sintéticos, com a finalidade de prevenir, retardar ou reverter o processo de carcinogênese, ou seja, o desenvolvimento de neoplasias (Wattemberg, 1996; Kelloff et al., 2000). Vários estudos pré-clínicos, clínicos e de mecanismos de ação são necessários para se identificar e confirmar a atividade quimiopreventiva de um determinado composto químico. Levando-se em consideração que muitas alterações em genes e outros constituintes celulares têm sido relacionados com a formação e crescimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, possíveis mecanismos de ação para a quimioprevenção devem envolver estudos detalhados nas formas de se intervir em vias intrínsecas específicas envolvidas na evolução do processo carcinogênico (Kelloff et al., 2000).

Alguns pontos-chave devem ser avaliados em estudos de identificação de agentes quimioprotetores potenciais: (I) biomarcadores moleculares e genômicos que representem pontos de análise em experimentos de curta duração; (II) modelos animais que mimetizem o processo de carcinogênese humana (incluindo animais transgênicos e *knock-out*) e (III) novos regimes de tratamento incluindo combinações de fármacos e doses farmacodinâmicas desses agentes (Kelloff et al., 2000).

Retardar o desenvolvimento de uma neoplasia é um processo que exige muitos estudos minuciosos em cada uma das etapas da carcinogênese em análise. O controle do ciclo celular (equilíbrio entre proliferação e morte celular); diferenciação celular e angiogênese são fenômenos críticos à formação tumoral e, portanto, são os principais alvos dos estudos nessa área. Uma droga capaz de inibir a formação de novos vasos ou a atividade de metaloproteinases de matriz, de induzir apoptose ou diferenciação celular e/ou bloquear a proliferação celular certamente teria efeitos deletérios para as células tumorais erradicando-as ou impedindo a sua multiplicação, invasão local e formação de metástases (Kelloff et al., 2000; Kim et al, 2006; Rozanov et al, 2006; Vansaun et al, 2006). Entretanto, esses efeitos desejáveis para uma substância quimiopreventiva não devem interferir com a atividade das células normais do organismo, por isso vários estudos para a comprovação da relação dose-eficácia-toxicidade de substâncias químicas que suprimiriam o aparecimento de neoplasias devem ser desenvolvidos (Wattenberg, 1992).

A prevenção do câncer tem impacto importante sobre a saúde humana com conseqüências em nível familiar, social e econômico. Combinações de substâncias com comprovada eficácia anti-tumoral poderiam ser administradas oralmente na forma de cápsulas ou como suplementos alimentares. Entretanto, inúmeros testes de eficácia e testes toxicológicos são necessários para averiguar os possíveis riscos potenciais do uso crônico desses medicamentos e suas prováveis interações medicamentosas antes de sua comercialização (Crowel, 2005).

Existem três níveis de prevenção, dependendo do alvo da intervenção: (a) **Prevenção Primária** – para indivíduos saudáveis; (b) **Prevenção Secundária** – para pacientes em estágio inicial da doença; (c) **Prevenção Terciária** – para evitar recidivas em pacientes terapeuticamente curados (De Flora et al., 2001). Na prevenção primária, o

desenvolvimento de células neoplásicas é minimizado pela inibição de mutações e redução na formação de células iniciadas. A prevenção secundária explora uma série de mecanismos direcionados à inibição da progressão tumoral evitando que a malignidade se instale entre as células transformadas. A prevenção terciária deve levar em consideração os mecanismos tanto da prevenção primária quanto os da secundária.

O primeiro passo para a quimioprevenção do câncer no homem é tentar reduzir a exposição a fatores de risco conhecidos como o cigarro, álcool, poluentes ambientais, dietas ricas em gorduras, etc. (Lyman, 1992; Wogan et al., 2004; Greenwald et al., 2001). Entretanto, a maioria dos fatores de risco está diretamente relacionada ao estilo de vida, nível de desenvolvimento sócio-econômico ou fazem parte do dia a dia das pessoas como os poluentes ambientais (exposição ambiental, acidental ou ocupacional) e os raios UV. Nestes casos, a formação de células iniciadas é inevitável e a intervenção deve ser realizada pela orientação na redução dos níveis de exposição, aplicação de agentes inibitórios que sejam capazes de impedir, conjuntamente com a atividade imunológica, a evolução das células iniciadas para as etapas posteriores do desenvolvimento neoplásico. A administração dos agentes inibitórios geralmente é realizada por via oral, em suplementação dietética. Muitos compostos com essas características inibitórias e os respectivos mecanismos de ação sobre a evolução da carcinogênese vem sendo estudados e detalhados (Tabela 1).

Diversos agentes quimiopreventivos em potencial possuem mais de um mecanismo de ação anti-carcinogênico. A interação entre esses mecanismos pode resultar em uma ação sinérgica da substância em questão (Kelloff et al., 1994). Desta forma, a administração simultânea ou seqüencial de diferentes compostos poderia ser capaz de aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade do tratamento anti-neoplásico.

Tabela 1 – Mecanismos Gerais de Quimioprevenção.

MECANISMO DE AÇÃO	DESCRIÇÃO DOS AGENTES QUÍMICOS
Antimutagênese	
Inibição da recarga de carcinógeno	Ligantes de ácidos biliares
Inibição da bioativação do carcinógeno	Inibidores da enzima Citocromo P450
Detoxificação do carcinógeno	Indutores dos sistemas GSH e GST hepáticos
Bloqueio da ligação carcinógeno-DNA	Inibidores da enzima Citocromo P450
Aumento dos níveis de reparo do DNA	Indutores da enzima Poli (ADP-ribosil) transferase
Antiproliferação / Antiprogessão	
Modulação da atividade de fatores de crescimento e hormônios	Antagonistas de receptores hormonais, inibidores da aromatase de esteróides, inibidores da esteróide α 5-reductase e IGF-I ²
Inibição da atividade de oncogenes	Inibidores da transferase da proteína Farnesil
Inibição do metabolismo de poliaminas	Inibidores da atividade da ODC ³
Indução de diferenciação	Indutores de TGF- β
Recrutamento da resposta imunológica	Inibidores de COX, indutores de linfócitos NK e células de Langherans
Aumento da intercomunicação celular	Indutores de expressão da conexina 43
Resgate da função supressora tumoral	Indutores da expressão do gene p53
Indução de apoptose	Indutores de TGF- β , inibidores de Telomerase, ativadores de Caspases
Inibição da angiogênese	Inibidores de COX-2 e Trombomodulina
Inibição da degradação da MB ¹	Inibidores de Colagenases tipo IV
Inibição da síntese de DNA	Inibidores de Glicose-6-fofato desidrogenase

¹MB = Membrana basal; ²IGF-I = Fator de crescimento sérico análogo à insulina; ³ODC = Ornitina Decarboxilase. Adaptado de Kelloff et al. (1996).

Uma das formas mais simples de prevenção do câncer para a população em geral é a orientação nutricional sobre o controle na qualidade da ingestão de alimentos. A menor ingestão de produtos sintéticos comprovadamente cancerígenos em roedores como conservantes, corantes, pesticidas agrícolas, álcool, combinada com uma dieta rica em alimentos funcionais como vitaminas do complexo B, folato, metionina, fenóis, indóis, terpenóides e outros agentes antioxidantes poderia ser considerada uma das melhores

formas de evitar o desenvolvimento de neoplasias (Wattenberg, 1990; Wang, 2005; Boffetta, 2006; Boffetta & Hashibe, 2006; Slattery et al, 2000). Muitos produtos naturais e alguns sintéticos podem ser utilizados com o objetivo de bloquear o desenvolvimento de neoplasias na forma de suplementação alimentar (Wattenberg, 1990). Em geral, pela segurança e por não serem enquadrados como medicamentos, o desenvolvimento de agentes quimiopreventivos derivados de produtos naturais tem mercado crescente.

Existem alguns vegetais como raízes, legumes e frutas que possuem naturalmente agentes que previnem a carcinogênese (Wattenberg et al, 1992; Kelloff et al, 2000). Muitas substâncias quimiopreventivas potenciais estão presentes na dieta como polifenóis, isoflavonas, curcumina, fenetil isoiocianato, sulforafano, licopeno, indol 3-carbinol, álcool perillil, ácidos salicílicos, cafeína entre outras (kelloff et al., 2000, Chuang et al, 2000).

Um dos mais impressionantes achados no campo da quimioprevenção é o grande número de compostos químicos que apresentam atividade anti-tumoral. Atualmente, mais de 20 classes diferentes de substâncias tem demonstrado efeitos dessa amplitude. A fim de melhorar a compreensão da forma de atuação dos elementos quimiopreventivos, estes foram classificados em grupos de acordo com a etapa da carcinogênese química sobre a qual são eficazes. Duas categorias principais foram definidas: os **agentes bloqueadores** e os **agentes supressores** (Wattenberg, 1985,1993). Os agentes bloqueadores devem modular os processos de absorção intestinal, biotransformação/bioativação microsomal, excreção renal e interação com o material genético de substâncias cancerígenas, impedindo, dessa maneira, a formação de células iniciadas (Figura 1). Os agentes bloqueadores mais conhecidos são os compostos antioxidantes cuja eficácia está diretamente relacionada à captura das formas reativas dos cancerígenos, impedindo sua interação com o DNA e outras moléculas celulares (lipídeos, proteínas e carboidratos). Os agentes supressores interferem

em alguns eventos celulares críticos à promoção e progressão da carcinogênese (Figura 1) e, conseqüentemente, previnem a evolução das células iniciadas à malignidade (Morse & Stoner, 1993). Desta forma, os agentes quimiopreventivos podem ser classificados nessas duas categorias considerando-se o fato de os bloqueadores serem efetivos quando administrados antes ou simultaneamente ao cancerígeno, enquanto que os supressores, após a etapa de iniciação da carcinogênese.

Durante os estudos de inibidores da carcinogênese, ficou claro que alguns agentes inibidores agem em mais de um ponto-chave da carcinogênese. Esses agentes possuem atividades tanto bloqueadoras como supressoras tumorais. Alguns constituintes específicos de hortaliças, como o benzil isotiocianato, possuem essas características de inibição dupla (Zhang & Talai, 1994). Os sucos de frutas cítricas apresentam os mesmos efeitos sobre a carcinogênese experimental. Em experimento de Wattenberg em 1983, o suco de laranja mostrou atividade bloqueadora e supressora da tumorigênese induzida pelo 7,12 dimetilbenzilantraceno (DMBA). Além da atividade dupla de alguns já citados, os extratos de alguns vegetais específicos podem conter mais de um elemento quimiopreventivo resultando em uma série de combinações de atividades bloqueadoras e supressoras que interagem sinergicamente, potencializando o efeito quimiopreventivo final do substrato. Isso os torna uns dos inibidores naturais de carcinogênese mais completos em modelos experimentais e humanos.

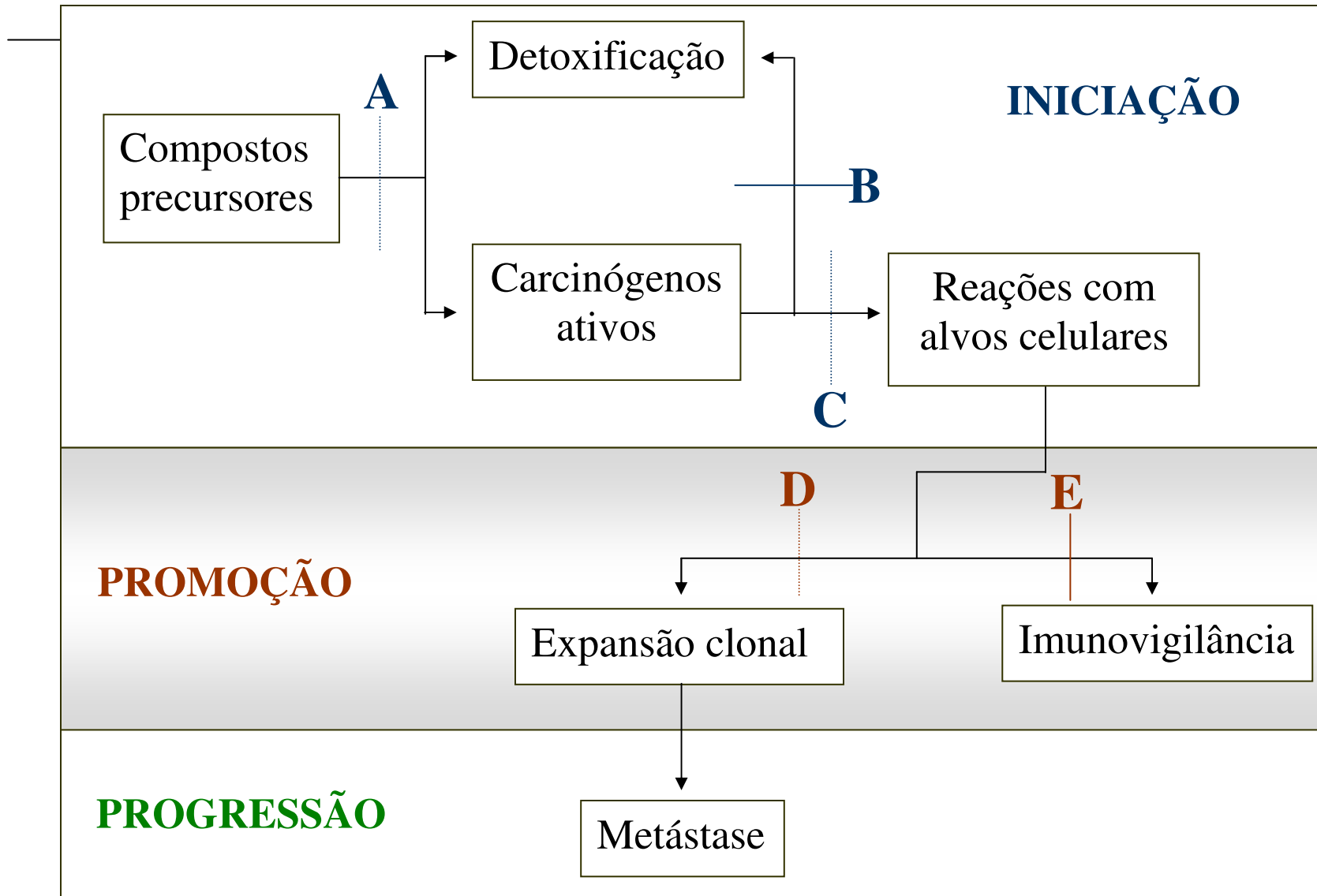


Figura 1 – Pontos-chave para a Quimioprevenção da Carcinogênese. Os Agentes Bloqueadores podem ser divididos em três categorias: A, B e C. Bloqueadores que evitam a bioativação do carcinógeno (A); Bloqueadores que estimulam a atividade do sistema hepático de detoxificação (B) e Bloqueadores que impedem os efeitos do carcinógeno ativo (C). Os Agentes Supressores podem ser divididos em duas categorias: D e E. Supressores que interferem nos eventos celulares críticos da carcinogênese (promoção/progressão) (D) e Supressores que estimulam mecanismos de imunovigilância do hospedeiro (E).

3.2) Lesões hepáticas pré-neoplásicas e modelo do Ito.

O fígado tem se destacado como um dos órgãos preferenciais para o estudo das diferentes etapas da carcinogênese química e de substâncias químicas com potencial cancerígeno, e em particular, pela facilidade de indução e detecção de lesões pré-neoplásicas (Farber & Sarma, 1987; Ito et al., 1988, 1989; Bannasch et al., 1989; Bannasch & Zerban, 1992; Dragan et al., 1991; Hasegawa & Ito, 1992;).

A neoplasia hepática induzida quimicamente em roedores ocorre através do desenvolvimento de alterações seqüenciais caracterizadas inicialmente por focos de hepatócitos alterados (FHA), seguidos pelo desenvolvimento de adenomas e do hepatocarcinoma celular (HCC) (Bannasch et al., 1989, 2002; Bannasch & Zerban, 1992). A demonstração de que estas alterações estão seqüencialmente associadas indica que os FHA representam etapas pré-neoplásicas, podendo ser considerados biomarcadores histológicos da futura neoplasia hepática (adenomas e HCC) (Bannasch, 1986; Farber & Sarma, 1987; Enzmann & Bannasch, 1987; Farber, 1988). Os FHA também foram identificados em amostras coletadas de autópsias e biópias de fígado e considerados lesões precursoras de adenomas e do HCC no homem (Su et al., 1997, 2003).

Diferentes tipos de FHA, induzidos por várias classes de cancerígenos químicos, têm sido caracterizados no fígado de roedores, em decorrência de alterações morfológicas nos hepatócitos, mais especificamente, em seus componentes citoplasmáticos, como glicogênio, retículo endoplasmático, ribossomos e peroxissomos (Bannasch et al., 1989; Bannasch & Zerban, 1992). Assim, sob coloração de rotina, as alterações em componentes citoplasmáticos e suas afinidades pela hematoxilina ou eosina permitem classificar os FHA em: focos de células claras, focos de células acidófilas ou eosinofólicas, focos de células intermediárias, focos de células anfófilas, focos de células xenomórficas, focos de células

tigróides, focos de células basofílicas e focos de células mistas. Três linhagens hepatocíticas podem-se identificadas durante a evolução dos FHA para tumores hepáticos em roedores: glicogenólica-basofílica, anofílica-basofílica e xenomórfica-basofílica (Bannasch et al., 2001, 2003). A demonstração de que os hepatócitos nos FHA exibem atividade enzimática diferente das células normais permite detectá-los imuno e histoquimicamente através de marcadores enzimáticos como gama-glutamil transpeptidase (γ -GT), adenosiltrifosfatase (ATPase), glicose-6 fosfatase (G-6-Pase) e glutathione S-transferase, forma placentária (GST-P) (Satoh et al., 1985; Moore et al., 1987; Tatematsu et al., 1988; Bannasch et al., 1989). A GST-P é reconhecida como um dos melhores marcadores dos FHA no fígado de rato (Satoh et al., 1985; Ito et al., 1989; Dragan et al., 1991).

A expressão da GST-P é normalmente baixa em hepatócitos fetais, adultos quiescentes ou em regeneração, placenta, coração e outros órgãos de ratos machos, mas significativamente elevada nos rins e pâncreas (Satoh et al., 1985). Nódulos hiperplásicos e tumores hepáticos induzidos quimicamente apresentam conteúdos de GST-P cerca de 20 a 50 vezes e de 10 a 30 vezes, respectivamente, quando comparados aos valores do fígado normal do rato (em torno de 34 μ g e 9,4 μ g/g de tecido) (Satoh et al., 1985; Soma et al., 1986). Esse aumento é acompanhado pelo aumento da expressão do mRNA da GST-P em nódulos hiperplásicos e tumores hepáticos (Imai et al., 1997). A expressão aumentada da GST-P em FHA e nos tumores hepáticos pode ser consequência, entre outros fatores, do processo de hipometilação de sítios CpG da região promotora do gene da GST-P, o que contribuiria para aumento da expressão desse gene (Steinmetz et al., 1998).

O significado biológico da expressão aumentada da GST-P em lesões hepáticas pré-neoplásicas e neoplásicas não foi, ainda, totalmente estabelecido. No entanto, este fato parece ser importante nas etapas iniciais do processo de hepatocarcinogênese química, assim como na adaptação e crescimento seletivo de células iniciadas em ambiente químico tóxico (Satoh et al., 1991; Satoh, 1998). A GST-P, contrariamente às demais glutatonas, parece ser mais eficiente na neutralização de cancerígenos hidrossolúveis (fracos eletrófilos), e sua expressão é pouco sensível à inibição por ânions orgânicos ou induzida de forma inespecífica por compostos químicos e cancerígenos (Satoh et al., 1985, 1988, 1991; Satoh, 1998). Da mesma forma, a expressão da GST-P parece ser um bom biomarcador de lesões pré-neoplásicas durante a evolução da carcinogênese oral, em especial da língua em ratos, hamster e no ser humano (Li et al., 1997; Lin et al., 1999).

Os bioensaios de média-duração para o fígado de ratos são baseados na detecção de FHA GST-P positivos (Ito et al., 1988; 1989; Hasegawa & Ito, 1992; Dragan et al., 1991, Ito et al., 2003). Esses modelos experimentais são, operacionalmente, mais rápidos e de menor custo, quando comparado ao modelo tradicional de longa-duração (dois anos), uma vez que, a manutenção dos animais em biotério por longos períodos implica em maiores gastos com alimentação e cuidados gerais e demora na conclusão do estudo (Ito et al., 1988; 1989; Hasegawa & Ito, 1992; Ito et al., 2003). Por esse motivo, os protocolos de carcinogênese química de média, em especial para o fígado que utiliza a detecção de FHA como biomarcador, vem sendo considerado como complementar ao protocolo de longa duração convencional (Ito et al., 1988, 1989; Hasegawa & Ito, 1992; Dragan et al., 1991; Shirai, 1997; Ito et al., 2003).

O protocolo mais utilizado na detecção de substâncias cancerígenas foi proposto por Ito et al. (1988), desenvolvido a partir do modelo de Solt & Farber (1976). A seqüência de

eventos envolvidos nesse protocolo experimental leva em consideração as etapas de iniciação e promoção da carcinogênese química e está estruturado para a detecção de substâncias químicas promotoras da carcinogênese hepática (Ito et al., 1988, 1989; Hasegawa & Ito, 1992; Shirai, 1997; Ito et al., 2003). Nesse modelo, os animais são iniciados com dose única intra-peritoneal de 200 mg/kg de peso corpóreo de dietilnitrosamina (DEN). Após duas semanas da iniciação os animais recebem a substância-teste (vias oral, subcutânea, intraperitoneal, intravenosa etc.) até o final do experimento. Todos os animais são submetidos à hepatectomia parcial de 70% (retirada dos lóbulos esquerdo e lateral direito) e sacrificados ao final da oitava semana do experimento. O número e área agregada de FHA GST-P positivos são utilizados como parâmetros de comparação entre o grupo controle iniciado com a DEN e os grupos iniciados e tratados com diferentes doses da substância teste. A substância-teste pode potencializar (atividade promotora) ou inibir (atividade quimiopreventiva) o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas iniciadas pela DEN (Ito et al., 1996; Shirai et al., 1997; Moore et al., 1999; Ito et al., 2003).

No modelo do Ito já foram testadas mais de 300 substâncias químicas pelo modelo DEN-HP. Este se mostra adequado para a detecção de substâncias hepatocancerígenas, genotóxicas (97%) e não-genotóxicas (84%), mas apresenta baixa sensibilidade para detecção de cancerígenos que tem organotropismo diferente do fígado (Ito et al., 2003). Recentemente, este tipo de ensaio biológico vem sendo adaptado para outros propósitos como a detecção de substâncias com potencial quimiopreventivo (Ito et al., 1996; Moore et al., 1999). De acordo com a etapa da carcinogênese a ser estudada, a substância-teste com potencial quimiopreventivo é administrada concomitantemente ao iniciador (experimentos de anti-iniciação, com a análise de hepatócitos iniciados e mini-focos GST-P positivos) ou

após a etapa de iniciação (experimentos de anti-promoção, com a análise do número (focos/cm²) e da área agregada (mm²/cm²) de FHA GST-P positivos). Desta forma, a substância-teste pode ser classificada como bloqueadora ou supressora de acordo com seus efeitos sobre a hepatocarcinogênese química.

3.3) Efeitos biológicos da *Ginkgo biloba*

3.3.1) Características Gerais

A *Ginkgo biloba* (do chinês, *ginkgo*: damasco prateado e *biloba*: formato bilobado de suas folhas) é uma gimnosperma dióica da família *Ginkgoaceae* que foi descrita inicialmente pelo médico alemão, Engelbert Kaelmpter, por volta de 1690. A *Ginkgo biloba* é um das espécies vegetais mais antigas e conhecidas pelo homem. No entanto, despertou o interesse de pesquisadores somente após a Segunda Guerra Mundial, quando os mesmos perceberam que esta árvore tinha sobrevivido à radiação em Hiroshima. Após a explosão da bomba nuclear, a espécies da família *Ginkgoaceae* foram as primeiras a reaparecer no solo da cidade devastada, sem apresentar sinais de alterações ou mutações genéticas (Jacobs et al., 2000).

Nativa da Coreia, China e Japão, essa árvore pode chegar a uma altura de até 30 metros e viver por cerca de quatro mil anos. A *Ginkgo biloba* tem sobrevivido sem grandes alterações fenotípicas a mais de 200 milhões de anos e, por esse motivo, é intitulada de "fóssil vivo" (Charles Darwin). Essa longevidade pode ser relacionada à grande capacidade de suportar insultos tóxicos e à resistência a infecções microbianas (Robbers et al., 1997).

3.3.2) Composição bioquímica e indicações gerais da *Ginkgo biloba*

A *Ginkgo biloba* contém muitos compostos farmacologicamente ativos. O extrato hidroalcoólico obtido das folhas dessa planta contém uma mistura complexa de aproximadamente 300 elementos (Smith et al., 1996). Os principais componentes ativos são flavonóides e glicosídeos de flavona, lactonas diterpênicas, ginkgolídeos, sesquiterpenos, superóxido dismutase ferro-dependente, ácido p-hidroxibenzoico, ácido ascórbico e catequinas (Jacobs et al., 2000). Extratos hidroacetônicos a *Ginkgo biloba* (EGb) são comercializados desidratados e ajustados para conterem aproximadamente 24% de flavonóides (glicosídeos ginkgo-flavona) e 6% de terpenóides (ginkgolídeos e bilobalídeos) (Robbers et al., 1997).

O EGb é um dos medicamentos mais vendidos em lojas de produtos naturais em todo o mundo (Brevoort, 1998). Extratos das folhas de *Ginkgo biloba* têm sido utilizados na medicina chinesa por mais de quatro mil anos para o tratamento de disfunções cardiopulmonares, e para promover a longevidade. Na Europa (principalmente França e Alemanha) e nos Estados Unidos, os extratos dessa planta figuram entre os produtos naturais mais comercializados, embora nem sempre sob a fiscalização de agências governamentais reguladoras (Robbers et al., 1997). A ação combinada final da interação sinérgica entre os diferentes princípios ativos presentes no EGb resultam no incremento do suprimento sangüíneo (redução da viscosidade do sangue) e na redução da densidade de radicais livres de oxigênio em diferentes tecidos animais, sendo o tecido nervoso o mais estudado (Birks et al., 2002).

As indicações mais comuns da *Ginkgo biloba* são no tratamento e na prevenção das disfunções relacionadas ao envelhecimento, em particular para distúrbios de memória e as funções cognitivas correlatas, bem como no tratamento de labirintopatias (zumbidos e

vertigens) e cefaléias e doenças vasculares periféricas, sobretudo nos distúrbios circulatórios do cérebro e do sistema arterial periférico (Robbers et al., 1997; Luo, 2001; Bartolo, 1973). O EGb apresenta eficácia moderada para essas doenças do sistema nervoso central e poucos efeitos colaterais descritos, tais como alterações gastrintestinais leves e cefaléia (Karnowski et al., 1996; McKenna et al., 2001).

Os glicosídeos de flavona do tipo rutínico (flavonóides), em geral, reduzem a fragilidade vascular podendo evitar a lesão cerebral isquêmica. Os ginkgolídeos A, B, C e M são as principais lactonas diterpênicas do EGb. Estes são capazes de inibir o fator de ativação plaquetária (PAF) e assim, conseqüentemente, inibir a broncoconstrição, a vasodilatação periférica, a agregação plaquetária, a quimiotaxia de fagócitos e a liberação de compostos inflamatórios. Os efeitos biológicos finais bloqueados pelos ginkgolídeos resultam em aumento na fluidez e na circulação sanguínea local (Ahlemeyer et al., 2003; Robbers, 2003). O ginkgolídeo B é um antagonista do receptor do PAF, o que caracteriza suas propriedades de antiagregação plaquetária úteis no tratamento de algumas doenças como a inflamação aguda, rejeição tecidual, asma e lesão isquêmica (Zhu et al., 2005). Além de todos esses efeitos sobre a circulação sanguínea, o EGb exerce efeitos sobre o SNC, atuando contra danos neuronais, alterando níveis de neurotransmissores, de óxido nítrico e o sistema antioxidante celular (Ahlemeyer & Krieglstein, 2003; Yang et al., 2005). O EGb protegeu células neuronais em cultura da morte celular induzida por estímulos nocivos como a hipóxia (Klein et al., 1997), peróxido de hidrogênio (Guidetti et al., 2001) e óxido nítrico (Bastianetto et al., 2000). Além disso, o bilobalídeo isolado do EGb protegeu as células neuronais PC12 em cultura do estresse oxidativo induzido pela indução da via xantina oxidase (Zhou & Zhu, 2000) e reduziu os níveis de danos neuronais (redução de apoptose) induzidos por oclusão da artéria média cerebral em ratos (Zhang et al., 2000). Em

contrapartida, 100µM de ácidos ginkgólicos, isolados a partir da ginkgo, induziram a apoptose de células neuronais (Ahlemeyer & Krieglstein, 2001). Contudo, a proporção de ácidos ginkgólicos no EGb é menor que 0,0005% e, portanto, efeitos tóxicos para o homem não são esperados (Ahlemeyer & Krieglstein, 2000). Provavelmente, os efeitos neuroprotetores do EGb possam estar associados com a capacidade de modulação do fluxo sanguíneo cerebral e o antagonismo de PAF, combinados com a amplificação do sistema antioxidante e modulação da homeostase iônica, níveis de glicocorticóides e fatores de crescimento (Ahlemeyer & Krieglstein, 2003).

3.3.3) *Propriedades anti-carcinogênicas da Ginkgo biloba*

Estudos recentes têm demonstrado que extratos da folha de *Ginkgo biloba* apresentam propriedades quimiopreventivas potenciais (anticarcinogênicas) que podem ser relacionadas à presença de moléculas com atividades antioxidantes, anti-proliferativas, pró-apoptóticas, indutoras de enzimas hepáticas de detoxificação, anti-angiogênicas e de regulação gênica (DeFeudis et al., 2003).

Muitos extratos diferentes e componentes purificados da folha e casca da *Ginkgo biloba* têm sido testados e avaliados para determinar os seus efeitos sobre a carcinogênese experimental e humana. A interação dos efeitos presentes nesses extratos tem mostrado eficácia anti-tumoral em culturas de células tumorais, em diferentes modelos animais, e em estudos em humanos. Alguns deles serão citados a seguir.

Papadopoulos et al. (2000) demonstraram que o EGb e a ginkgolida B (componente purificado) foram capazes de inibir, de forma dose-dependente, a proliferação de células

tumorais MDA-231 de mama com características altamente agressivas (i.e., elevado grau de anaplasia e displasia, associados com alta capacidade de invasão e infiltração tecidual). Do EGb foram extraídos ácidos orgânicos denominados de ácidos ginkgólicos capazes de inibir seletivamente (50%) o crescimento em cultura de células tumorais LTEP-a-2 de adenocarcinoma pulmonar humano (Yang et al., 2004). Polissacarídeos extraídos da casca dessa árvore modularam negativamente a expressão do oncogene c-Myc e gene anti-apoptótico Bcl-2 e, conseqüentemente, exerceram efeitos anti-proliferativos sobre células HL-60 em cultura (Xu et al., 2004). Outros estudos confirmaram os efeitos anti-proliferativos do EGb observados em cultura de células de hepatoma SMMC-7721 e cultura de células de carcinoma oral SCC 1483 (Chen et al., 2002; Kim et al., 2005).

Em outro trabalho, foram analisados os efeitos quimiopreventivos do EGb em dois estudos: um epidemiológico e outro com cultura de diversas linhagens de células epiteliais e mucinosas de câncer de ovário. No estudo epidemiológico foi observado que o uso regular do EGb como único suplemento dietético foi relacionado à redução dos riscos de desenvolvimento de neoplasia não-mucinosas de ovário em mulheres portadoras dessa neoplasia (Ye et al., 2006). Além disso, a *Ginkgo biloba* mostrou efeitos anti-proliferativos significativos (~40%) nas células epiteliais em cultura de câncer ovariano (HOSE-E6E7, OVCA429, OVCA433 e OVCA420) e menor eficácia nas células mucinosas (RMUG-S e RMUG-L) de câncer ovariano. A combinação e análise dos dados epidemiológicos e biológicos obtidos nesse estudo evidenciaram os potenciais efeitos quimiopreventivos e terapêuticos da ginkgo sobre a carcinogênese ovariana humana (Ye et al., 2006).

Efeitos terapêuticos da administração oral de cápsulas de extratos da casca polissacarídica da *Ginkgo biloba* foram obtidos e bem definidos para pacientes com neoplasias malignas do trato digestório superior (faringe, esôfago e estômago) (Chen et al.,

2003; Xu et al., 2003). Em outro estudo foi determinada a existência de uma estrita relação entre esses efeitos e a modulação da expressão dos genes *c-myc*, *Bcl-2* e *c-fos* cujas funções sobre a proliferação, apoptose e diferenciação celulares são bem descritas (Xu et al., 2003).

Alterações de expressão gênica em resposta ao estímulo pelo EGb tem sido observadas em diferentes sistemas, o que indica que esta planta pode ser capaz de alterar atividades intrínsecas ao genoma de células de mamíferos. Esses dados fornecem o conceito de que as ações da *Ginkgo biloba* são mediadoras nos processos de transcrição gênica, implicando em grande potencial para o tratamento de doenças crônicas (Gohil et al., 2002). Em estudo utilizando a técnica de *cDNA microarray*, foi demonstrado que o EGb é capaz de alterar a expressão de genes envolvidos na regulação da proliferação celular, diferenciação e apoptose em células de câncer de mama humano em cultura (Li et al., 2002). Esse efeito pode auxiliar na elucidação do(s) mecanismo(s) pelo qual(is) a *Ginkgo biloba* inibe a proliferação celular e, conseqüentemente, reduz a deterioração de funções cerebrais que são dependentes da perda de neurônios, presumivelmente através da indução de apoptose. Evidências de redução da expressão dos genes controladores da apoptose *Bax* e *Bcl-2* pelo EGb foram obtidas e confirmadas por análises de *Western-blotting* em modelo experimental de rato SAMP8 (Mak et al, 2006).

Dois experimentos em roedores foram realizados para averiguar os efeitos quimiopreventivos do EGb sobre a carcinogênese química. Os tratamentos com EGb ou bilobalídeos purificados inibiram significativamente a formação de lesões pré-neoplásicas intestinais (focos de criptas aberrantes) induzidas pelo azoximetano (AOM) em ratos F344 machos (Suzuki et al., 2004). A administração de EGb, antes e durante iniciação da

carcinogênese gástrica pelo benzo(a)pireno reduziu a multiplicidade de tumores no estômago anterior de fêmeas de camundongos Swiss (Agha et al., 2001).

Os efeitos antioxidantes, anti-proliferativos, anti-angiogênicos e indutores enzimáticos apresentados pelo EGb são importantes para a prevenção da carcinogênese, como previamente citado. A propriedade antioxidante desses extratos é devida à presença de compostos que capturam os radicais livres formados pela interação de agentes cancerígenos eletrofilicos com sítios nucleofílicos celulares, bloqueando a mutagenicidade e genotoxicidade desses elementos (Bickers & Athar, 2006; Briqanti & Picardo, 2006). O EGb possui diversos elementos químicos com propriedades antioxidantes, sendo os flavonóides e os terpenóides os mais bem descritos (Smith et al., 1996). Esses elementos antioxidantes encontrados na ginkgo são capazes de proteger o fígado contra o dano oxidativo induzido pela administração de acetaminofeno, álcool e tetracloreto de carbono (Senner et al., 2006; Yuan et al., 2006; He et al., 2006). Essa característica biológica de possuir agentes antioxidantes naturais poderia conferir à *Ginkgo biloba* potencial quimiopreventivo contra o câncer (Xu et al., 1998; DeFeudis et al., 20003).

A atividade anti-angiogênica do EGb é resultante da presença de compostos capazes de inibir a enzima óxido nítrico sintase (Boveris et al., 2000; De feudis et al., 2003). O mais importante flavonóide presente na ginkgo, o ginkgolídeo B, modula negativamente a expressão gênica de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Zang et al., 2002), além de ser um potente antioxidante.

Muitas interações perigosas entre plantas medicinais e drogas têm sido reportadas. Os principais efeitos colaterais são a potencialização ou atenuação dos efeitos de cada uma das drogas co-administradas. O EGb pode interagir com produtos farmacêuticos como drogas anti-plaquetárias, antidepressivos, diuréticos e antiinflamatórios não esteroidais

(Sorensen, 2002; Brazier et al., 2003; Valli et al., 2002). As enzimas do citocromo P450 são uma família de enzimas necessárias ao metabolismo de drogas e outras moléculas exógenas, bem como para a biossíntese de esteróides e prostaglandinas. No homem, as P450 são concentradas principalmente nos sistemas microssomais dos hepatócitos, sob as isoformas de CYPs (Ortiz de Montelano, 1995). Devido ao papel crítico sobre o metabolismo de drogas das CYPs, a inibição ou indução dessas enzimas frequentemente leva à interações medicamentosas. Alguns constituintes do EGb são potentes indutores e inibidores de enzimas do complexo citocromo P450, em humanos (Sugiyama et al., 2004; Yang et al., 2003; Gaudineau et al., 2004; Von Moltke et al., 2004; Chang et al., 2006). Estudos “*in vitro*” demonstraram que os flavonóides presentes no EGb reduziram a toxicidade genética de cancerígenos via inibição dos citocromos CYP1A2 e CYP 1A1 (Lautraite et al, 2002). Em outro estudo, o EGb potencializou a toxicidade do acetaminofeno em cultura de hepatócitos de rato pela indução da CYP3A (Rajaraman et al., 2006). Estudos “*in vivo*” também têm sido realizados para demonstrar a capacidade do EGb em modular a atividade de importantes enzimas do sistema microssomal hepático como a indução das citocromos CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2 e CYP3A1 (Ryu et al., 2003; Shinozuka et al., 2002). Em modelos humanos, o EGb é capaz de inibir significativamente a atividades das CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 e CYP3A4 (Gaudineau et al., 2004). Todos esses dados ressaltam a idéia de que o EGb é capaz de interferir no metabolismo de diversas drogas podendo modificar o balanço entre ativação de pró-cancerígenos ou a excreção de cancerígenos potenciais ou de drogas utilizadas no tratamento do câncer.

Outros efeitos quimiopreventivos potenciais da *Ginkgo biloba* são os efeitos de modulação do crescimento de algumas neoplasias hormônio-dependentes como a de mama e a de próstata. Recentemente, pesquisadores descreveram atividades estrogênicas fracas de

alguns flavonóides extraídos da ginkgo como a quercetina e isoramnetina (fitoestrógenos) com efeitos potenciais como moduladores seletivos dos receptores de estrógeno (RE) (Oh et al., 2004). Essas moléculas foram capazes de induzir a proliferação seletiva de células MCF-7 RE-positivas, mas não de células MDA-MB-231 RE-negativas. Além disso, o EGb induziu a transcrição dos genes pS2 (responsivo de estrógeno) e PR (receptor de progesterona) em células MCF-7. Esses resultados comprovam atividade anti-estrogênica do EGb pela antagonização por competição seletiva pelos receptores de estrógenos em experimentos com células em cultura (Oh et al., 2004; Oh et al., 2006). Portanto, esses estudos sugerem uma atividade quimiopreventiva potencial para a carcinogênese de mama.

4. Considerações finais e Objetivos

Em vários modelos experimentais, os extratos dessa gimnosperma têm mostrado uma série de propriedades quimiopreventivas potenciais como propriedades antioxidantes, antiproliferativas, anti-angiogênicas, antiestrogênicas e atividades moduladoras da expressão de genes controladores do ciclo celular. Poucos estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” têm sido realizados para avaliar os efeitos hepatoprotetores da *Ginkgo biloba*. Os extratos nas concentrações de 50 a 1000 mg/L são capazes de inibir a proliferação de células das linhagens HepG2 e Hep3B de hepatocarcinoma humano e aumentar a liberação de LDH (lactato desidrogenase), um indicador de citotoxicidade (Chao et al., 2004). A administração de *Ginkgo biloba* previne o processo de fibrose hepática em ratos senis (Huang et al., 2005) e também é capaz de reverter a fibrose hepática induzida pela administração de tetracloreto de carbono (CCl₄) (Luo et al., 2004; He et al., 2006) ou induzida pela obstrução de ducto biliar (Sener et al., 2005).

Em vista de todos os efeitos biológicos e, principalmente, os efeitos anticarcinogênicos da *Ginkgo biloba* para a carcinogênese experimental de cólon e estômago citados acima, este trabalho teve como objetivos avaliar as atividades quimiopreventivas do extrato hidroalcoólico das folhas da *Ginkgo biloba* sobre as etapas de iniciação e promoção hepatocarcinogênese química induzida pela dietilnitrosamina (DEN) em ratos Wistar machos. Para determinar possíveis propriedades bloqueadoras e/ou supressoras tumorais desse extrato, foram realizadas as seguintes análises:

- 1) Avaliar a resposta hepática frente à toxicidade induzida pela DEN por meio de determinação dos níveis de transaminases séricas (ALT e AST), determinação da resposta proliferativa pela análise do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e do fator de crescimento e transformação alfa (TGF- α), determinação da resposta hepática apoptótica e da expressão da proteína p53 (selvagem).
- 2) Avaliar o desenvolvimento e as atividades tóxicas e/ou genotóxicas da DEN.
- 3) Avaliar o potencial quimiopreventivo do extrato por meio de determinações imunohistoquímicas de Lesões GST-P⁺ (hepatócitos isolados, mini-focos e focos) que podem ser utilizadas, com elevada confiabilidade, como biomarcadores da hepatocarcinogênese química em roedores.

5. Referências*

1. AGHA, A.M., EL-FATTAH, A.A., AL-ZUHAIR, H.H., AL-RIKABI, A.C. Chemopreventive effect of Ginkgo biloba extract against benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice: amelioration of doxorubicin cardiotoxicity. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v. 20, p. 39-50, 2001.
2. AHLEMEYER, B., SELKE, D., SCHAPER, C., KLUMPP, S., KRIEGLSTEIN, J. Ginkgolic acids induce neuronal death and activate protein phosphatase type-2C. **Eur J Pharmacol.** V. 26, p. 1-7, 2001.
3. AHLEMEYER, B.; KRIEGLSTEIN, J. Pharmacological studies supporting the therapeutic use of *Ginkgo biloba* extract for Alzheimer's disease. **Pharmacopsychiatry**, v. 36, p. 8-14, 2003.
4. AHLEMEYER, B., KRIEGLSTEIN, J. Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 60, p. 1779-92, 2003.
5. BANNASCH, P. Preneoplastic lesions as end-points in carcinogenicity testing I- Hepatic preneoplasia. **Carcinogenesis**, v. 7, p. 689-95, 1986.
6. BANNASCH, P.; ENZMANN, H.; KLIMEK, F.; WEBER, E.; ZERBAN, H. Significance of sequential cellular changes inside and outside foci altered hepatocytes during hepatocarcinogenesis. **Toxicol. Pathol.**, v. 17, p. 617-29, 1989.
7. BANNASCH, P.; ZERBAN, H. Predictive value of hepatic preneoplastic lesions as indicators of carcinogenic response. In: Vainio H, Magee PN, McGregor DB, McMichael AJ, editors. Mechanism of Carcinogenesis in Risk Identification. **IARC Sci. Publ.**, v. 116, p. 389-427, 1992.

* Normas baseadas em ABNT, numeradas conforme ordem alfabética.

-
8. BANNASCH, P., NEHRBASS, D., KOPP-SCHNEIDER, A. Significance of hepatic preneoplasia for cancer chemoprevention. **IARC Sci. Publ.**, v. 154, ,p. 223-40, 2001.
 9. BANNASCH, P. Hormonal and hormone-like effects eliciting hepatocarcinogenesis. **Folia Histochem. Cytobiol.**, v. 39, p. 28-9, 2002.
 10. BANNASCH, P., HAERTEL, T., SU, Q. Significance of hepatic preneoplasia in risk identification and early detection of neoplasia. **Toxicol. Pathol.**, v. 31, p.. 134-9, 2003.
 11. BARTOLO, M. Clinical results in therapy of peripheral vascular diseases with ginkgo-biloba. **Minerva Med.**, v. 64, p. 4187-93, 1973.
 12. BASTIANETTO, S., RAMASSAMY, C., DORE, S., CHRISTEN, Y., POIRIER, J., QUIRION, R. The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid. **Eur. J. Neurosci.**, v. 12, p. 1882-90, 2000.
 13. BICKERS DR, ATHAR M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. **J. Invest. Dermatol.**, v. 126, p. 2565-75, 2006.
 14. BRIGANTI S, PICARDO M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 17, p. 663-9, 2003.
 15. BOVERIS, A.D., GALATRO, A., PUNTARULO, S. Effect of nitric oxide and plant antioxidants on microsomal content of lipid radicals. **Biol. Res.**, v. 33, p. 159-65, 2000.
 16. BIRKS, J.; GRIMLEY, E.V.; VAN DONGEN, M. *Ginkgo biloba* for cognitive impairment and dementia. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 4, CD003120, 2002.
 17. BOFFETTA, P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. **Mutat. Res.**, v.608, p.157-62, 2006.

-
18. BOFFETTA, P., HASHIBE, M. Alcohol and cancer. **Lancet. Oncol.**, v.7, p.149-56, 2006.
 19. BRAZIER, N.C., LEVINE, M.A. Drug-herb interaction among commonly used conventional medicines: a compendium for health care professionals. **Am. J. Ther.**, v. 10, p. 163-9, 2003.
 20. BREVOORT P. The booming US botanical market – a new overview. **Herbalgram**, p.44, v. 33-46, 1998.
 21. CHANG, T.K., CHEN, J., YEUNG, E.Y. Effect of Ginkgo biloba extract on procarcinogen-bioactivating human CYP1 enzymes: identification of isorhamnetin, kaempferol, and quercetin as potent inhibitors of CYP1B1. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** V. 15, p.18-26, 2006.
 22. CHAO, J.C.; CHU, C.C. Effects of *Ginkgo biloba* extract on cell proliferation and cytotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells. **World J. Gastroenterol.**, v. 10, p. 37-41, 2004.
 23. CHEN, Q., YANG, G.W., AN, L.G. Apoptosis of hepatoma cells SMMC-7721 induced by Ginkgo biloba seed polysaccharide. **World J. Gastroenterol.**, v.8, p. 832-6, 2002.
 24. CHEN, H.S.; ZHAI, F.; CHU, Y.F.; XU, F.; XU, A.H.; JIA, L.C. Clinical study on treatment of patients with upper digestive tract malignant tumors of middle and late stage with *Ginkgo biloba* exocarp polysaccharides capsule preparation. **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.** , v. 1, p. 189-91, 2003.
 25. CHUANG, S.E., KUO, M.L., HSU, C.H., CHEN, C.R., LIN, J.K., LAI, G.M., HSIEH, C.Y., CHENG, A.L. Curcumin-containing diet inhibits diethylnitrosamine-induced murine hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.21, p.331-5, 2000.

-
26. CROWEL, J.A. The chemopreventive agent development research program in the Division of Cancer Prevention of the US National Cancer Institute: An overview. **European Journal of Cancer**, v.41, p.1889–1910, 2005.
 27. DEFEUDIS, F.V.; PAPADOPOULOS, V.; DRIEU, K. *Ginkgo biloba* extracts and cancer: a research area in its infancy, 2003 **Blackwell Publishing Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 17, p. 405–17, 2003.
 28. DE FLORA, S., IZZOTTI, A., D'AGOSTINI, F., BALANSKY, R.M., NOONAN, D., ALBINI, A. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation related diseases, **Mutat. Res.**, v.480–481, p.9–22, 2001.
 29. DRAGAN, Y.P.; RIZUI, T.; XU, Y-H. An initiation-promotion assay in rat liver as a potential complement to the 2-year carcinogenesis bioassay. **Fund. Appl. Toxicol.**, v. 16, p. 525-47, 1991.
 30. ENZMANN, H., BANNASCH, P. Potential significance of phenotypic heterogeneity of focal lesions at different stages in hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 8, p. 1607-12, 1987.
 31. FARBER, E. Cancer development and its natural history. A cancer prevention perspective. **Cancer**, v. 62, p. 1676-79, 1988.
 32. FARBER, E., SARMA, R.S.D. Biology of disease. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. **Lab. Invest.**, v. 56, p. 4-22, 1987.
 33. GAUDINEAU, C., BECKERMAN, R., WELBOURN, S., AUCLAIR, K. Inhibition of human P450 enzymes by multiple constituents of the *Ginkgo biloba* extract. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, v.318, p. 1072-8, 2004.

-
34. GOHIL, K.; PACKER, L. Global gene expression analysis identifies cell and tissue specific actions of *Ginkgo biloba* extract, EGb 761. **Cell Mol. Biol.**, v. 48, p. 625-31, 2002.
 35. GREENWALD, P., CLIFFORD, C.K., MILNER, J.A. Diet and cancer prevention. **European Journal of Cancer**, v.37, p.948-65, 2001.
 36. GUIDETTI, C., PARACCHINI, S., LUCCHINI, S., CAMBIERI, M., MARZATICO, F. Prevention of neuronal cell damage induced by oxidative stress in-vitro: effect of different *Ginkgo biloba* extracts. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 53, p. 387-92, 2001.
 37. HASEGAWA, R.; ITO, N. Liver medium-term bioassay in rats for screening of carcinogens and modifying factors in hepatocarcinogenesis. **Fd. Chem. Toxic.**, v. 30, p. 979-92, 1992..
 38. HE, S.X., LUO, J.Y., WANG, Y.P., WANG, Y.L., FU, H., XU, J.L., ZHAO, G., LIU, E.Q. Effects of extract from *Ginkgo biloba* on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. **World J. Gastroenterol.**, v. 12, p.3924-8, 2006.
 39. HUANG, S.Z., LUO, Y.J., WANG, L., CAI, K.Y. Effect of ginkgo biloba extract on livers in aged rats. **World J. Gastroenterol.**, v.11, p.132-5, 2005.
 40. IMAI, T.; MASUI, T.; ICHINOSE, M.; NAKANISHI, H.; YANAI, T.; MASEGI, T.; MURAMATSU, M.; TATEMATSU, M. Reduction of glutathione S-transferase P-form mRNA expression in remodeling nodules in rat liver revealed by in situ hybridization. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 545-51, 1997.
 41. ITO, N.; TSUDA, H.; TATEMATSU, M.; INOUE, T.; TAGAWA, Y.; AOKI, T.; UWAGAWA, S.; KAGAWA, M.; OGISO, T.; MASUI, T.; IMAIDA, K.; ASAMOTO, M. Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats; an

-
- approach for a new medium-term bioassay system. **Carcinogenesis**, v. 9, p. 387-94, 1988.
42. ITO, N.; IMAIDA, T.; HASEGAWA, R.; TSUDA, H. Rapid bioassay methods for carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 19, p. 385-41, 1989.
43. ITO, S., TATENO, C., TUDA, M., YOSHITAKE, A. Immunohistochemical demonstration of the gap junctional protein connexin 32 and proliferating cell nuclear antigen in glutathione S-transferase placental form-negative lesions of rat liver induced by diethylnitrosamine and clofibrate. **Toxicol. Pathol.**, v. 24, p. 690-5, 1996.
44. ITO, N., TAMANO, S., SHIRAI, T. A medium-term rat liver bioassay for rapid in vivo detection of carcinogenic potential of chemicals. **Cancer Sci.**, v. 94, p. 3-8, 2003.
45. JACOBS, B.P., BROWNER, W.S. *Ginkgo biloba*: a living fossil. **Am. J. Med.**, v. 108, p. 341-342, 2000..
46. KARNOWSKI S., HERMAN W.M., STEFAPHAN, K. Proof of efficacy of the *Ginkgo biloba* special extract EGb 761 in outpatients suffering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-infarct dementia. **Pharmacopsychiatry**, v. 29, p. 47-56, 1996.
47. KELLOFF, G.J., BOONE, C.W., STEELE, V.E., FAY, J.R., LUBET, R.A., CROWELL, J.A., SIGMAN, C.C. Mechanistic considerations in chemopreventive drug development, **J. Cell Biochem.**, v. 20, p. 1-24, 1994.
48. KELLOFF, G.J., CROWELL, J.A., STEELE, V.E., LUBET, R.A., MALONE, W.A., BOONE, C.W., KOPELOVICH, L., HAWK, E.T., LIEBERMAN, R.,

-
- LAWRENCEE, J.A., ALI, L., VINER, J.L., SIGMAN, C.C. Progress in Cancer Chemoprevention: Development of Diet-Derived Chemopreventive Agents. **J. Nutr.**, v.130, p.467s-71s, 2000.
49. KELLOFF, G.J. Perspectives on cancer chemoprevention research and drug development. **Adv. Cancer Res.**, v.78, p.199–334, 2000.
50. KIM, Y., CHONGVIRIYAPHAN, N., LIU, C., RUSSELL, R.M. AND WANG, X.D. Combined antioxidant (b-carotene, a-tocopherol and ascorbic acid) supplementation increases the levels of lung retinoic acid and inhibits the activation of mitogen-activated protein kinase in the ferret lung cancer model. **Carcinogenesis**, v.27, p.1410-19, 2006.
51. KIM KS, RHEE KH, YOON JH, LEE JG, LEE JH, YOO JB. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) induces apoptosis by the activation of caspase-3 in oral cavity cancer cells. **Oral Oncol.**, v. 41, p.383-9, 2005.
52. KLEIN, J., CHATTERJEE, S.S., LOFFELHOLZ, K. Phospholipid breakdown and choline release under hypoxic conditions: inhibition by bilobalide, a constituent of *Ginkgo biloba*. **Brain Res.**, v. 755, p. 347-50, 1997.
53. LAUTRAITE, S., MUSONDA, A.C., DOEHMER, J., EDWARDS, G.O., CHIPMAN, J.K. Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. **Mutagenesis**, v. 17, p. 45-53, ,2002.
54. Reciprocal relationship between development of glutathione S-transferase positive liver foci and proliferation of surrounding hepatocytes in rats.
55. LI, T.J., HIRAYAMA, Y., KITANO, M. Glutathione S-transferase pi-class as a tumour marker in lingual preneoplastic and neoplastic lesions of rats and humans. **Virchows Arch.**, v. 431, p. 37-43, 1997.

-
56. LI, W.; PRETNER, E.; SHEN, L.; DRIEU, K.; PAPADOPOULOS V. Comon gene targets of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) in human tumor cells: relation to cell growth. **Cell Mol. Biol.**, v. 48, p. 655-62, 2002.
 57. LIN, C.C., CHEN, Y.K., LIN, L.M. Placental glutathione S-transferase isoenzyme expression during promotion of two-stage hamster cheek-pouch carcinogenesis. **Arch. Oral Biol.**, v. 44, p. 525-9, 1999.
 58. LUO, Y.J., YU, J.P., SHI, Z.H., WANG, L. Ginkgo biloba extract reverses CCl₄-induced liver fibrosis in rats. **World J. Gastroenterol.**, v.10, p. 1037-42, 2004.
 59. LUO, Y. Ginkgo biloba neuroprotection: Therapeutic implications in Alzheimer's disease. **J. Alzheimers. Dis.**, v. 3, p. 401-407, 2001.
 60. LYMAN, G.H. Risk factors for cancer. *Prim. Care.*, v.19, p.465-79, 1992.
 61. MAK, Y.T., CHAN, W.Y., LAM, W.P., YEW, D.T. Immunohistological evidences of Ginkgo biloba extract altering Bax to Bcl-2 expression ratio in the hippocampus and motor cortex of senescence accelerated mice. **Microsc. Res. Tech.**, v. 69, p.601-5, 2006.
 62. MCKENNA, D.J., JONES, K., HUGHES, K. Efficacy, safety, and use of ginkgo biloba in clinical and preclinical applications. **Altern. Ther. Health Med.**, v. 7, p. 70-86, 2001.
 63. MOORE, M.A.; KITAGAWA, T. Hepatocarcinogenesis in the rat: the effect of promoters and carcinogens “*in vivo*” or “*in vitro*”. *Intern. Ver. Cytol.*, v. 101, p. 125-73, 1986.
 64. MOORE, M.A., NAKAGAWA, K., SATOH, K., ISHIKAWA, T., SATO, K. Single GST-P positive liver cells--putative initiated hepatocytes. **Carcinogenesis**, v. 8, p. 483-6, 1987.

-
65. MOORE, M.A., TSUDA, H., TAMANO, S., HAGIWARA, A., IMAIDA, K., SHIRAI, T., ITO, N. Marriage of a medium-term liver model to surrogate markers--a practical approach for risk and benefit assessment. **Toxicol. Pathol.**, v.27, p.237-42, 1999.
66. MORSE, M.A., STONER, G.D. Cancer chemoprevention: principles and prospects. **Carcinogenesis**, v.14, p.1737-46,1993.
67. OH, S.M. AND CHUNG, K.H. Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. **Life Sci.**, v. 74, p. 132535, 2004.
68. OH, S.M. AND CHUNG, K.H. Activities of *Ginkgo biloba* extracts. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v.100, p. 167-76, 2006.
69. ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. The 1994 Bernard B. Brodie Award Lecture. Structure, mechanism, and inhibition of cytochrome P450. **Drug Metab. Dispos.** v. 23, ,p. 1181-7, 1995.
70. PAPADOPOULOS, V.; KAPSIS, A., LI. H.; AMRI, H.; HARDWICK, M.; CULTY, M.; KASPRZYK, P.G.; CARLSON, M.; MOREAU, J.P.; DRIEU, K. Drug-induced inhibition of the peripheral type benzodiazepine receptor expression and cell proliferation in human breast cancer cells. **Anticancer Res.**, v. 20, p. 2835-2847, 2000.
71. RAJARAMAN, G., CHEN, J., CHANG, T.K. Ginkgolide A contributes to the potentiation of acetaminophen toxicity by *Ginkgo biloba* extract in primary cultures of rat hepatocytes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 217, p. 225-33, 2006.
72. ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V.E. Farmacognosia & Farmacobiocnologia ; **Rev. psiquiatr. Clín.**, v.30, no.6, São Paulo 2003.

-
73. ROZANOV, D.V., SAVINOV, A.Y., GOLUBKOV, V.S., TOMLINSON, S., STRONGIN, A.Y. Interference with the complement system by tumor cell membrane type-1 matrix metalloproteinase plays a significant role in promoting metastasis in mice. **Cancer Res.**, v.66, p.6258-63, 2006.
74. RYU, S.D., CHUNG, W.G. Induction of the procarcinogen-activating CYP1A2 by a herbal dietary supplement in rats and humans. **Food Chem. Toxicol.**, v. 41, p. 861-6, 2003.
75. SATOH, K. Weak electrophile selective characteristics of the rat preneoplastic marker enzyme glutathione S-transferase P-form, GST-P (7-7): a theory of linear free energy relationships for evaluation of the active site hydrophobicity of isoenzymes. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 1665-71, 1998.
76. SATOH, K.; KITAHARA, A.; SOMA, Y.; INABA, Y.; HATAYAMA, I.; SATO, K.. Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase; a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 82, p. 3964-8, 1985.
77. SENNER, G., KABASAKAL, L., YUKSEL, M., GEDIK, N., ALICAN, Y. Hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats is prevented by Ginkgo biloba treatment. **World J. Gastroenterol.**, v.11, p.5444-9, 2005.
78. SENNER, G., OMURTAG, G.Z., SEHIRLI, O., TOZAN, A., YUKSEL, M., ERCAN, F., GEDIK, N. Protective effects of ginkgo biloba against acetaminophen-induced toxicity in mice. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 283, p. 39-45, 2006.
79. SMITH, P.F., MACLENNAN, K., DARLINGTON, C.L. The neuroprotective properties of the Ginkgo biloba leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). **J. Ethnopharmacol.**, v. 50, p. 131-9, 1996.

-
80. SHIRAI, T. A medium-term rat liver bioassay as a rapid “*in vivo*” test for carcinogenic potential: a historical review of model development and summary of results from 291 tests. **Toxicol. Pathol.**, v. 25, p. 453-60, 1997.
81. SHINOZUKA, K., UMEGAKI, K., KUBOTA, Y., TANAKA, N., MIZUNO, H., YAMAUCHI, J., NAKAMURA, K., KUNITOMO, M. Feeding of Ginkgo biloba extract (GBE) enhances gene expression of hepatic cytochrome P-450 and attenuates the hypotensive effect of nicardipine in rats. **Life Sci.**, v. 70, p. 2783-92, 2002.
82. SLATTERY, M.L. Diet, lifestyle, and colon cancer. Diet, lifestyle, and colon cancer. **Semin. Gastrointest. Dis.**, v. 11, p. 142-6, 2000.
83. SMITH, P.F., MACLENNAN, K., DARLINGTON, C.L. The neuroprotective properties of the Ginkgo biloba leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). **J. Ethnopharmacol.**, v. 50, p. 131-9, 1996.
84. SOLT, D.; FABER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. **Nature**, v. 263, p. 701-3, 1976.
85. SORENSEN, J.M. Herb-drug, food-drug, nutrient-drug, and drug-drug interactions: mechanisms involved and their medical implications. **J. Altern. Complement Med.**, v. 8, p. 293-308, 2002.
86. STEINMETZ, K.L.; POGRIBNY, I.P.; JAMES, S.J.; PITOT, H.C. Hypomethylation of the rat glutathione S-transferase pi (GSTP) promoter region isolated from methyl-deficient livers and GSTP-positive liver neoplasms. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 1487-94, 1998.
87. SUGIYAMA, T., KUBOTA, Y., SHINOZUKA, K., YAMADA, S., YAMADA, K., UMEGAKI, K. Induction and recovery of hepatic drug metabolizing enzymes

-
- in rats treated with Ginkgo biloba extract. **Food. Chem. Toxicol.**, v.42, p.953-7, 2004.
88. SUZUKI R, KOHNO H, SUGIE S, SASAKI K, YOSHIMURA T, WADA K, TANAKA T. Preventive effects of extract of leaves of ginkgo (*Ginkgo biloba*) and its component bilobalide on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. **Cancer Lett.**, v. 210, p.159-69, 2004.
89. TATEMATSU, M., AOKI, T., KAGAWA, M., MERA, Y., ITO, N. Reciprocal relationship between development of glutathione S-transferase positive liver foci and proliferation of surrounding hepatocytes in rats. **Carcinogenesis**, v. 9, p. 221-5, 1988.
90. VALLI, G., GIARDINA, E.G. Benefits, adverse effects and drug interactions of herbal therapies with cardiovascular effects. **J. Am. Coll. Cardiol**, v. 39, p. 1083-95, 2002.
91. VANSANUN, M.N., MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteinases and cellular motility in development and disease. **Birth Defects Res. C. Embryo Today**, v.78, p.69-79, 2006.
92. VON MOLTKE, L.L., WEEMHOFF, J.L., BEDIR, E., KHAN, I.A., HARMATZ, J.S., GOLDMAN, P., GREENBLATT, D.J. Inhibition of human cytochromes P450 by components of *Ginkgo biloba*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 56, p. 1039-44, 2004.
93. XU, A.; CHEN, H.; WANG, L.; WANG, Q.. Influence of *Ginkgo biloba* L. exocarp polysaccharides on serum superoxide dismutase activity and malondialdehyde level in mice under different states. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 23, p. 746-7, 1998.

-
94. Xu, A.H., Chen, H.S., Sun, B.C., Xiang, X.R., Chu, Y.F., Zhai, F., Jia, L.C. Therapeutic mechanism of ginkgo biloba exocarp polysaccharides on gastric cancer. **World J. Gastroenterol.**, v. 9, p.2424-7, 2003.
 95. XU, A., CHEN, H., SUN, B. Experimental study of Ginkgo biloba exocarp polysaccharides on HL-60 cells in vitro. **Zhong Yao Cai.**, v. 27, p. 361-3, 2004.
 96. WANG, X.D. Alcohol, vitamin A, and cancer. *Alcohol*, v.35(3), p.251-8, 2005.
 97. WATTENBERG, L.W. Inhibition of carcinogenesis by minor nutrients constituents of the diet. **Proc. Nutr. Society**, v.49, p.173-83, 1990.
 98. WATTENBERG, L.W. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. **Cancer Res.**, v.52, p.2085-91, 1992.
 99. WOGAN, G.N., HECHT, S.S., FELTON, J.S., CONNEY, A.H., LOEBE, L.A. Environmental and chemical carcinogenesis. *Sem. Cancer Biol.*, v.14, p.473-86, 2004.
 100. YANG, X.F., WANG, N.P., LU, W.H., ZENG, F.D. Effects of Ginkgo biloba extract and tanshinone on cytochrome P-450 isozymes and glutathione transferase in rats. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 24, p.1033-8, 2003.
 101. YANG, X.; QIAN, Z.; CHEN, J.; ZHU, W.; XIE, J. Study on antitumor activities of ginkgolic acids from Ginkgo sarcotestas "in vitro" **Zhong Yao Cai**, v. 27, p. 40-2, 2004.
 102. YANG, G.F.; WANG, L.N.; YANG, L.B.; ZHANG, Q.J. Effect of *Ginkgo biloba* extract on neuronal apoptosis in rabbit with kaolin-induced syringomyelia. **Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao**, v. 25, p. 83-6, 2005.

-
103. YE, B., APONTE, M., DAI, Y., LI, L., HO, M-C.D., VITONIS, A., EDWARDS, D. HUANG, T-N., CRAMER, D.W. *Ginkgo biloba* and ovarian cancer prevention: Epidemiological and biological evidence. **Cancer Let.**, Epub ahead of print, 2006.
104. YUAN, G., GONG, Z., LI, J., LI, X. Ginkgo biloba extract protects against alcohol-induced liver injury in rats. **Phytother. Res.**, 2006 (in press article).
105. ZHANG, Y., TALALAY, P. Anticarcinogenic Activities of Organic Isothiocyanates: Chemistry and Mechanisms. **Cancer Research**, v.54, p. 19768, 1994.
106. ZHANG, W.R., HAYASHI, T., KITAGAWA, H., SASAKI, C., SAKAI, K., WARITA, H., WANG, J.M., SHIRO, Y., UCHIDA, M., ABE, K. Protective effect of ginkgo extract on rat brain with transient middle cerebral artery occlusion. **Neurol. Res.**, v. 22, p. 517-21, 2000.
107. ZHOU, L.J., ZHU, X.Z. Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.293, p.982-8, 2000.
108. ZHU, W.; CHEN, G.; HU, L.; LUO, X.; GUI, C.; LUO, C.; PUAH, C.M.; CHEN, K.; JIANG, H. QSAR analyses on ginkgolides and their analogues using CoMFA, CoMSIA, and HQSAR. *Bioorg. Méd. Chem.*, v. 13, p. 313-22, 2005

6. Artigo

**Protective effects of *Ginkgo biloba* against rat chemical
hepatocarcinogenesis**

O artigo será submetido à revista Liver International

Protective effects of *Ginkgo biloba* against rat chemical hepatocarcinogenesis

Marcos C. Dias¹, Maria A. M. Rodrigues², Maria C.H. Reimberg³ and Luís F. Barbisan^{1*}.

¹UNESP Sao Paulo State University, Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu, SP, 18618-000, Brazil.

²UNESP Sao Paulo State University, School of Medicine, Department of Pathology, Botucatu, SP, 18618-000, Brazil.

³Grupo CentroFlora, Botucatu, SP, 18603-970, Brazil.

Keywords: Diethylnitrosamine; GST-P positive foci; Liver carcinogenesis; *Ginkgo biloba*; Chemoprevention.

**Address correspondence to:*

Luís Fernando Barbisan, Ph.D.

Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, 18618-000, SP, Brazil.

Telephone/Fax-simile: 55-14-68116264

E-mail: barbisan@ibb.unesp.br

Abstract

Potential beneficial effects of a *Ginkgo biloba* extract (EGb) on development of putative initiated hepatocytes and preneoplastic foci of altered hepatocytes, expressing the enzyme glutathione S-transferase P-form (GST-P), were investigated. Male 6-week-old Wistar rats were initiated for liver carcinogenesis with a single dose of diethylnitrosamine (DEN) and fed a basal diet or supplemented diet with 500 or 1000ppm EGb in the initiation (2-week before and 24 hours after 100 mg/kg of DEN) or post-initiation stages (6-weeks after 200 mg/kg of DEN). In the short-term study, the animals were killed 24 hours and 2-week after DEN-initiation and liver samples were collected for the analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), transforming growth factor alpha (TGF- α), p53, apoptosis and induction of single hepatocytes and minifoci positive for GST-P, respectively. In the medium-term study, the animals were subjected to 70% partial hepatectomy at week 3, killed at week 8 and liver samples were collected for the analysis of development of GST-P positive foci. Pre-treatment of rats with 1000ppm EGb decreased the PCNA, apoptosis, TGF-alpha and p53 liver responses and induction of GST-P positive hepatocytes. However, EGb treatment during post-initiation stage failed to reduce the development of GST-P positive foci induced by DEN. The data suggest that the EGb can inhibit DEN-initiation but not the post-initiation stage of rat liver hepatocarcinogenesis.

Running title: Ginkgo biloba and rat liver carcinogenesis

Introduction

Ginkgo biloba extract (EGb) is a commercial medicinal herb which comes from the green leaves of the ginkgo tree, one of the oldest living plant species (Jacobs and Browner, 2000). EGb is a mixture mainly composed of flavonoid glycosides and terpenoides (ginkgolides and bilobalide) that has been shown to exhibit various pharmacological activities (Ahlemeyer and krieglstein, 2003; De Feudis et al., 2003; Boonkaew and Camper, 2005). This extract has shown several *in vivo* effects, including the increases of blood flow, acts as platelet activating factor antagonist, prevents the cell membrane against the damage caused by free radicals and has protective effects against myocardial and brain ischemia/reperfusion injury (Zhang, 2000; Ahlemeyer and krieglstein, 2003), and has been clinically used in the treatment of neurological (i.e., Alzheimer, dementia, labirintopathies and other cognitive misfunctions) and cardiovascular diseases (Ahlemeyer et al., 2001; Luo, 2001).

EGb has shown protects hepatic tissue against chemically-induced oxidative injury and fibrosis (Ding et al., 2005, He et al., 2006; Yuan et al., 2006; Sener et al., 2006; Tozan et al., 2007). Also, EGB has been shown to modulate the phase I enzymes, including the induction or inhibition of specific cytochrome P450 (CYP) isozymes, and phase II enzymes, including the induction of glutathion S-transferases, DT-diaphorase and quinine reductase (Sasaki et al., 2002; Suzuki et al., 2004; Ryu et al., 2003; Gaudineau et al., 2004; Sugiyama et al., 2004; Von Moltke et al., 2004; Monn et al., 2006). In this form, changes in metabolizing phase I and phase II enzymes by EGb can alter the balance between the activation of procarcinogens or the detoxification of potential carcinogens

There are few *in vivo* and *in vitro* studies on potential anti-carcinogenic effects of EGb. Crude EGb or their specific compounds induced cellular death or anti-proliferative activities against HepG2, Hep 3B, and SMMC -7721 human hepatocellular cancer cell lines (Chao & Chu, 2004; Chen et al., 2002), OVCA429, OVCA433, OVCA420 and HOSE-E6E7 human serous and epithelial ovarian cancer cells (Ye et al., 2006) and SCC 1483 human oral cavity cancer cell line (Kim et al., 2005). EGb orally given to female Swiss mice, before and during benzo(a)pyrene administration (BP), reduced the forestomach tumor multiplicity induced by BP (Agha et al., 2001). EGb and bilobalide orally given to male Fischer 344 rats, before, during and after azoxymethane administration (AOM), inhibited the development of aberrant crypt foci induced by AOM, probably associated to reduction of colonic cell proliferation activity and drug metabolizing enzymes activities (Suzuki et al., 2004).

Foci of altered hepatocytes (FAH) have been described as putative preneoplastic lesions detected in various experimental models of chemical hepatocarcinogenesis (Bannasch and Zerban, 1992). More recently, different types of FHA with similar morphological and biochemical changes of the hepatocellular phenotype were identified in chronic human liver diseases associated with, or predisposing to, development of hepatocellular carcinoma (Su et al., 1997; 2003). Glutathione S-transferase P-form (GST-P) expression is a useful marker for preneoplastic and neoplastic liver lesions (Tatematsu et al., 1988). Single hepatocytes and mini-FHA heavily positive for GST-P develop very early in carcinogen-treated rat liver, and are considered precursors large FHA and nodules (Moore et al., 1987; Satoh et al., 1989). The detection of GST-P positive single, mini-FHA or large FHA is an important tool for analyzing relevant carcinogenic or anti-carcinogenic

responses on initiation and promotion stages of rat liver carcinogenesis (Moore et al., 1999; Tsuda et al., 2003; Ito et al., 2003; Pinheiro et al., 2003).

The present study was designed to investigate the modifying influence of a *Ginkgo biloba* extract (Egb) on the initiation and post-initiation phases of rat liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine (DEN). The inhibitory potential of EGb on DEN-induced liver damage and the development of putative initiated hepatocytes and FHA expressing the enzyme marker GST-P were investigated.

Material and Methods

Animals and treatment

Four-week-old male Wistar rats were obtained from CEMIB (UNICAMP Campinas, SP, Brazil). The animals were kept in polypropylene cages (five animals/cage) covered with metallic grids in a room maintained at 22 ± 2 °C, $55 \pm 10\%$ humidity and with a 12-hr light-dark cycle. They were fed with commercial NUVILAB-CR-1 chow (NUVITAL, Curitiba, PR, Brazil) and water *ad libitum* for a 2-week acclimation period before beginning the experiment. Samples of lyophilized extract of *Ginkgo biloba* leaves (EGb) were obtained from hydroalcoholic extraction by spray dryer system and supplied generously by CentroFlora Group (Botucatu-SP, Brazil). The EGb used in our study contained known amounts of approximately 24% flavonol glycosides (i.e., those of quercetin, kaempferol and isorhamnetina) and 6% terpene trilactones (i.e., ginkgolide A, B and C, bilobalide) as determined by HPLC method. Based on food consumption, EGb was supplemented to basal diet at 500 and 1000ppm which correspond to 1 and 2 times the dose

commonly used for beneficial health effects estimated for a 70 kg individual (~180 mg/day) (Ernst, 2002).

The protocols used were consistent with Ethical Principles for Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Bioscience Institute/UNESP Ethical Committee for Animal Research (CEEA) (Protocol No. 22/05).

Experimental design

The animals were randomly allocated to two experimental protocols: a short and medium-term liver bioassay, respectively (Figure 1). In the short-term bioassay, the animals were randomly allocated into four experimental groups: Groups 1A to 3A were given single i.p. injection of 100 mg/Kg b.w. of diethylnitrosamine (DEN) and Group 4A (Control) was treated with 0.9% NaCl (DEN vehicle) at the beginning of the experiment. Two weeks before and 24 hours after initiation of liver carcinogenesis with DEN, the animals were fed with basal diet (groups 1A and 4A) or with supplemented diet with 500 or 1000ppm EGb (Group 2A and 3A), respectively. Twenty-four hours after DEN administration, groups G1A to G3A were fed with basal diet *ad libitum*. The animals were killed 24 hours and two weeks after DEN treatment (end of week 4)

In the medium-term bioassay, the animals were randomly allocated to five experimental groups. Groups 1B to 3B received single i.p. injection of 200 mg/kg b.w. of DEN and Groups 4B and 5B received 0.9% NaCl. Two weeks after DEN treatment the animals from G2B, G3B and G5B were allowed with 500 or 1000ppm EGb supplemented in the diet until the end of experiment at 8-week. The other animals from groups G1B and

G4B were maintained on the basal diet until the end of experiment at 8-week. All animals were submitted to 70% partial hepatectomy at week 3 and killed at week 8. In both experimental protocols, food and water consumption were measured twice a week and the animals were weighted once a week during all the experimental period.

Tissue processing, histology and immunohistochemical proceedings

Immediately before necropsy, whole blood was collected and serum enzyme analyses for alanine amino transferase (ALT) and aspartate amino transferase (AST) were carried out spectrometrically (Ortho-Clinical Diagnostics, Johanson & Johanson Co., SP, Brazil) to monitor hepatocellular injury.

At sacrifice, the liver was removed, weighted and samples of liver lobules were fixed in 10% phosphate-buffered formalin solution, embedded in paraffin and sectioned (5 μm thickness) for hematoxylin and eosin (H&E) staining and immunohistochemical demonstration of placental form of glutathione S-transferase (GST-P), transforming growth factor alpha (TGF- α), p53 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression. Briefly, deparaffinated 5- μm -thick serial liver sections on poly-L-lysine coated slides were treated with 3% H_2O_2 in phosphate-buffered saline for 15 min, nonfat milk for 60 min, polyclonal anti-rabbit GST-P (Medical and Biological Laboratories Co., Tokyo, Japan, clone 311, 1:1000 dilution), monoclonal anti-mouse TGF- α (Oncogene Science Inc., New York, USA, clone Ab-2, 1:200 dilution), monoclonal anti-mouse PCNA (Dako Corporation, Carpinterie, CA, USA, clone PC10, 1:200 dilution), polyclonal anti-sheep p53 (Roche, Mannheim, Germany, clone BGM-1B1) antibodies, biotinylated anti-rabbit, anti-mouse or anti-sheep IgG antibodies (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA,

1:200 dilution) for 60 min, and streptavidin-biotin-peroxidase solution (TissuGnost Kit was from Merck, Darmstadt, Germany, 1:1:50 dilution). Antigen retrieval with 0.25% trypsin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis Mo, USA) for 15 minutes and 0.05% saponin (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) solution for 30 minutes or 0.01M citrate buffer (pH 6.0) heated in a microwave oven two times for 5 min each were done in slides submitted to TGF- α and p53 immunoreactivity, respectively. Chromogen color development was accomplished with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich Co., St. Louis Mo, USA) as the substrate to demonstrate the sites of peroxidase binding. The slides were counterstained with Harris's hematoxylin.

Analysis of GST-P, TGF- α and p53 immunoreactivity.

Single hepatocyte and mini-foci positive for GST-P (short-term bioassay) and GST-P positive FHA larger than 0.15 mm in diameter (medium-term bioassay) were measured using a Nikon photomicroscope (Microphot-FXA) connected to a KS-300 apparatus (Kontron Elektronik, Germany). The liver areas were analyzed in a special Macro-Stand device (support with Canon TV zoom lens V6x16/16-100 mm plus a Canon 58 mm close-up 240 lens connected to a CCD black-and-white video camera module with a Sony DC-777 camera unit) connected to a KS-300. Data were expressed as number (single hepatocytes, minifoci or FHA per cm^2) and mean size (mm^2) and aggregated area (mm^2/cm^2) for GST-P positive FHA.

Immunoreactivity for TGF- α was semiquantitatively analyzed in the hepatocytes from zone 3 (-/+ or +) or zone 2 (++) of the liver acinus. The positivity of hepatocytes for PCNA S-phase (PCNA LI%) and p53 (p53 LI%) labeling indices were determined as the

percentage of labeled hepatocyte nuclei by the total number of cells scored (~ 2000 hepatocytes). The apoptosis index (AI%) was considered as the number of hepatocytes in apoptosis by the total number of cells scored (~ 2000 hepatocytes). AI% criteria for identification and quantification of hepatocytes in apoptosis and of apoptotic bodies in liver sections stained by HE were taken from the literature (Goldsworth et al., 1996; Levin et al., 1999).

Statistical Analysis

The statistical analysis was done using the Jandel Sigma Stat software (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Body-weight and body-weight gain, absolute and relative liver weights, food consumption, number of putative hepatocytes and FHA positive for GST-P, mean size and aggregated area of FHA and serum biochemistry data were analyzed by the ANOVA or Kruskal-Wallis tests. PCNA labeling and apoptosis data were analyzed by the ANOVA or Kruskal-Wallis tests (short-term study) or Student T or Mann-Whitney tests (medium-term study). Significant differences were assumed when $p < 0.05$.

Results

Short-term bioassay (anti-initiating screening)

No significant alterations in body weight, body-weight gain or food consumption associated to EGb treatments were observed on weeks 1 and 2, before DEN-treatment (Table 1). In contrast, body weight and food consumption were significantly reduced after DEN initiation (100 mg/kg b.w.) when compared to the non-initiated group (G1A to G3A

vs. G4A, $P < 0.001$) (data not shown). At the end of week 4, body weight and food consumption of DEN-initiated groups returned to normal levels (data not shown).

In animals killed 24 hour after DEN-initiation, serum transaminases (AST and ALT) levels, cell proliferation and apoptosis rates and TGF- α expression were significantly increased when compared to the non-initiated group (G1A to G3A vs. G4A, $P < 0.001$) (data not shown). Hepatocytes with p53 and TGF- α immunoreactivity were observed in zone 3 and 2 of liver acinus in DEN-initiated animals (Figure 2) while no staining for wild-type p53 protein and a few centrilobular hepatocytes TGF- α positive were observed in liver parenchyma of the non-initiated group (data not shown). A lower extension of TGF- α expression, mean number of PCNA S phase-positive ($P = 0.003$) and p53-positive ($P = 0.049$) hepatocytes and of hepatocytes in apoptosis ($P = 0.001$) were observed in liver parenchyma of 1000ppm EGb DEN-treated animals than in the liver from the only DEN-treated animals (Figure 3, Table 1). Serum ALT and AST levels were lower in the 1000ppm EGb DEN-treated group than in the group only treated with DEN ($P = 0.065$ and $P = 0.075$, respectively) (Table 1).

In the animals killed 2 weeks after DEN-initiation, single hepatocytes and mini-foci positive for GST-P were mainly located in the zones 3 and 2 and to a lesser extent in zone 1 of liver acinus in all DEN-initiated groups (Figure 3 A and B). At the end of week 4, the 1000 ppm EGb treatment, administered before and during DEN-initiation, significantly decreased ($P < 0.001$) the mean number of GST-P positive single hepatocytes and minifoci per liver area when compared to only DEN-treated group (Table 1). This reduction was observed mainly at induction of initiated hepatocytes located at zones 3 and 2 of liver

acinus ($P= 0.009$ and $P= 0.003$, respectively) and to a lesser degree at zone 1 of liver acinus ($P= 0.075$).

Medium- term bioassay (anti-promoting screening)

The 6-week post-initiation treatment with EGb did not cause any significant alterations in body weight, body-weight gain or food consumption in both non-initiated and DEN-initiated groups. At the end of experiment, neither liver weights (absolute and relative) nor serum ALT and AST levels, cell proliferation and apoptosis and the development of DEN-induced GST-P positive liver foci (Figure 3 C) were modified by EGb treatment (Table 2). Non-initiated animals (groups G and G) did not develop any GST-P positive liver foci.

To analyze a possible modifying effect of EGb treatment *per se*, cell proliferation and apoptosis were evaluated only in groups 4B and 5B. Dietary 1000ppm EGB dose level did not change these non-DEN-treated control groups (G4B and G5B) PCNA labeling and apoptotic indexes in the liver parenchyma.

Discussion

The results described here indicate that the dietary administration with EGb inhibited the initiation but not the post-initiation stage of rat liver hepatocarcinogenesis induced by DEN and therefore, EGb acted as a blocking agent but did not present any suppressing effect on promotion step of chemically-induced rat hepatocarcinogenesis (Watenberg, 1992). Importantly, rats fed 1000ppm EGb showed no adverse effects after 6-week exposure period, as indicated by unaltered body and liver weights, liver morphology

and growth (cell proliferation and apoptosis rates) and transaminases levels. This absence of toxicity should be taken into consideration if safety measures for public health are to be implemented in response to incremented ingestion of this herbal drug by human populations since that EGb has been clinically indicated to various diseases (Ahlemeyer et al., 2001; Luo, 2001).

The hepatoprotective effect of dietary administration with EGb against early phase of rat liver carcinogenesis could be due to a modifying influence on biotransformation/detoxification of DEN, thus, reducing its liver toxicity, mutagenicity, and carcinogenicity. Changes in phase I or II enzyme can result in either bioactivation or detoxification, depending on the toxicity of the metabolites (Sturgell and Lambert, 1997). CYP2E1 is mainly known to be associated with the biotransformation of a range of compounds, including the DEN in liver, but other P450 isozymes have been found to be bioactivating as well (Swenberg et al., 1991). It has been reported that their biotransformation produces the promutagenic adducts O⁶-ethyldeoxyguanosine, O⁴ and O⁶-ethyldeoxythymidine and 8-hydroxyguanine (8-OHG) formation that play a role in the initiation step of rat liver carcinogenesis (Swenberg et al., 1991; Dragan et al., 1994; Verna et al., 1996; Nakae et al., 1997).

Various works indicate that EGb increase liver rat but not human CYP2E1 activity (Gurley et al., 2002, 2005; Yang et al., 2003; Suzuki et al., 2004; Sugiyama et al., 2004, Gaudineau et al., 2004) while the treatment with EGb or their specific compounds have shown also cause a elevation in glutathione S-transferase, DT-diaphorase and quinone reductase activities and in glutathione contents in liver mice and rat (Sasaki et al., 2002, Yang et al., 2003; Suzuki et al., 2004). Contrarily to CYP2E1 induction, the increase of phase II enzymes could implicate in elimination of electrophilic metabolites of DEN which

would be capable of covalently binding to DNA (DNA alkylation) and generating mutations (Sturgell and Lambert, 1997). Additionally, EGb containing various antioxidants agents with free radicals scavenger proprieties, like flavone glycosides and terpene lactones (DeFeudis et al., 2003), that could explain the protective action this herbal drug on the consequences of oxidative DNA damage induced by DEN biotransformation and, therefore, reducing the deleterious effects induced in liver by this hepatocarcinogen. Therefore, an association between the phase II enzyme induction and their antioxidant properties rather than CYP2E1 induction by EGb treatment could be responsible by reduction of liver response and induction of GST-P positive hepatocytes induced by DEN.

The beneficial influence of EGb in tissue repair due to hepatocytic loss by DEN exposure was characterized by reduced PCNA, TGF- α and p53 down regulation. After DEN exposure, a liver response to DNA damage and centrilobular cytotoxicity/necrosis is characterized by regenerative cell proliferation (Kato et al., 1993; Willians et al., 1996). A response to hepatocytic damage in both non-initiated and initiated hepatocytes is associated to expressing of oncogenes/suppressor tumor genes and growth factors, including TGF- α and p53 (Lennartsson et al., 1998, 1999, Finberg et al., 2000). Hepatocytes with p53 and TGF- α immunoreactivity were observed in zone 3 and 2 of liver acinus in DEN-initiated animals while no staining for wild-type p53 protein and a few centrilobular hepatocytes TGF- α positive were observed in liver parenchyma of the non-initiated group, as previously described (Burr et al., 1996; Lennartsson et al., 1998). The p53 positivity in rats treated with DEN may be attributed to the toxic environment induced by this hepatocarcinogen dosage, resulting in delayed entrance into critical phases of the cell cycle such as early S or M in presence of DNA lesions (Kaufmann et al., 1991, Dragan et al.,

1994; Lennartsson et al., 1998). TGF- α is a growth factor that activates the protein tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor and plays an important role in the liver regeneration and progression of rat liver carcinogenesis (Mead and Fausto, 1989; Pitot et al., 1996). The increased TGF- α expression in DEN-treated animals could be associated the increase of cell proliferation as seen after tissue deficit created by partial hepatectomy (Mead and Fausto, 1989). Thus, the inhibitory effect of EGb may be in part due to its modulation on DEN-induced cell proliferation/death in response to DNA damage.

The treatment with 1000ppm EGb reduced the induction of putative GST-P positive single cells and mini-foci in liver of DEN-initiated rats. As the initiation is a rare event affecting only few hepatocytes, the number of initiated hepatocytes is a major determinant of the risk of liver cancer development and could be used to prevention strategies. GST-P expression is a useful marker for most (pre)neoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis (Tatematsu et al., 1988). Single hepatocytes and mini-foci positive for GST-P develop very early in carcinogen-treated rats by both epigenetic and genetic events (Grasl-Kraupp et al., 2000, Satoh et al., 2002; Higashi et al., 2004) and were mainly located in the zones 3 and 2 and of liver acinus after single DEN dosage (Moore et al., 1987; Satoh et al., 1989). However, not all GST-P-positive single hepatocytes are considered to give rise to putative preneoplastic foci and liver tumors and supposing that individual cells are essentially heterogeneous, only subgroup of such cells having altered regulation of growth control step up to development of preneoplastic and neoplastic liver lesions (Higashi et al., 2004). Thus, an effective influence of EGb on initiating step of liver carcinogenesis should continue to be investigated mainly in long-term treatments.

There is any report on protective effects of EGb treatment during the promotion step of chemical carcinogenesis in rodents. Our data suggest that EGb meal did not modify the development GST-P positive foci used as end-points in our medium-term bioassay. Perhaps, higher doses of EGb could be more efficient to reduce the clonal expansion of initiated hepatocytes induced by DEN or the possibility exists that the anti-promoting potential of EGb may be manifested in target organs other than liver. As the oxidant stress is potentially deleterious to cells and to associated to progression of many diseases, including cancer (Hwang and Kim, 2007; Halliwell, 2007), the antioxidant effects derived of crude EGb or their specific constituents would be a potential mechanism of chemoprevention of chemical carcinogenesis.

In conclusion, the data suggest that the previous and simultaneous treatment with EGb can reduces liver toxicity and initiation by DEN but not the post-initiation stage of rat liver hepatocarcinogenesis. The underlying mechanism(s) of chemoprevention of DEN-induced hepatocarcinogenesis need to be explored.

References*

- Agha AM, El-Fattah AA, Al-Zuhair HH, Al-Rikabi AC. Chemopreventive effect of Ginkgo biloba extract against benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice: amelioration of doxorubicin cardiotoxicity. *J Exp Clin Cancer Res.* 2001; 20: 39-50.
- Ahlemeyer B, Selke D, Schaper C, Klumpp S, Krieglstein J. Ginkgolic acids induce neuronal death and activate protein phosphatase type-2C. *Eur J Pharmacol.* 2001; 26: 1-7.

- Ahlemeyer B, Krieglstein J. Pharmacological studies supporting the therapeutic use of *Ginkgo biloba* extract for Alzheimer's disease. *Pharmacopsychiatry* 2003; 36: 8-14.
- Ahlemeyer B, Krieglstein J. Neuroprotective effects of *Ginkgo biloba* extract. *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60: 1779-92.
- Bannasch P, Zerban H. Predictive value of hepatic preneoplastic lesions as indicators of carcinogenic response. In: Vainio H, Magee PN, McGregor DB, McMichael AJ, editors. *Mechanism of Carcinogenesis in Risk Identification*. IARC Sci Publ. 1992; 116: 389-427.
- Boonkaew T, Camper ND. Biological activities of *Ginkgo* extracts. *Phytomedicine* 2004; 12: 318-23.
- Burr AW, Hillan KJ, McLaughlin KE, Ferrier R, Chapman C, Mathew J, Burt AD. Hepatocyte growth factor levels in liver and serum increase during chemical hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 1996; 24: 1282-7.
- Chao JC, Chu CC. Effects of *Ginkgo biloba* extract on cell proliferation and cytotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol.* 2004; 10: 37-41.
- Chen Q, Yang GW, An LG. Apoptosis of hepatoma cells SMMC-7721 induced by *Ginkgo biloba* seed polysaccharide. *World J Gastroenterol.* 2002; 8: 832-6.
- DeFeudis FV, Papadopoulos V, Drieu K. *Ginkgo biloba* extracts and cancer: a research area in its infancy. *Blackwell Publishing Fundamental & Clinical Pharmacology* 2003; 17: 405-17.
- Ding J, Yu J, Wang C, Hu W, Li D, Luo Y, Luo H, Yu H. *Ginkgo biloba* extract alleviates liver fibrosis induced by CCl in rats. *Liver Int.* 2005; 25: 1224-32.
- Dragan YP, Hully JR, Nakamura J, Mass MJ, Swenberg JA, Pitot HC. Biochemical events during initiation of rat epatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1994; 15: 1451-8.

- Finberg N, Silins I, Stenius U, Hogberg J. Characterizing the role of MDM2 in diethylnitrosamine induced acute liver damage and development of pre-neoplastic lesions. *Carcinogenesis* 2004; 25: 113-22.
- Gaudineau C, Beckerman R, Welbourn S, Auclair K. Inhibition of human P450 enzymes by multiple constituents of the Ginkgo biloba extract. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 318: 1072-8.
- Grasl-Kraupp B, Luebeck G, Wagner A, Low-Baselli A, de Gunst M, Waldhor T, Moolgavkar S, Schulte-Hermann R. Quantitative analysis of tumor initiation in rat liver: role of cell replication and cell death (apoptosis). *Carcinogenesis* 2000; 21: 1411-21.
- Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, Williams DK, Gentry WB, Cui Y, Ang CY. Cytochrome P450 phenotypic ratios for predicting herb-drug interactions in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2002; 72: 276-87.
- Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, Williams DK, Gentry WB, Cui Y, Ang CY. Clinical assessment of effects of botanical supplementation on cytochrome P450 phenotypes in the elderly: St John's wort, garlic oil, Panax ginseng and Ginkgo biloba. *Drugs Aging.* 2005; 22: 525-39.
- He SX, Luo JY, Wang YP, Wang YL, Fu H, Xu JL, Zhao G, Liu EQ. Effects of extract from Ginkgo biloba on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *World J Gastroenterol.* 2006; 12: 3924-8.
- Higashi K, Hiai H, Higashi T, Muramatsu M. Regulatory mechanism of glutathione S-transferase P-form during chemical hepatocarcinogenesis: old wine in a new bottle. *Cancer Lett.* 2004; 209: 155-63.

- Ito N, Tamano S, Shirai T. A medium-term rat liver bioassay for rapid in vivo detection of carcinogenic potential of chemicals. *Cancer Sci.* 2003; 94: 3-8.
- Jacobs BP, Browner WS. *Ginkgo biloba*: a living fossil. *Am J Med.* 2000; 108: 341-342.
- Kato M, Popp JA, Conolly RB, Cattley RC. Relationship between hepatocyte necrosis, proliferation, and initiation induced by diethylnitrosamine in the male F344 rat. *Fundam Appl Toxicol.* 1993; 20: 155-62.
- Kim KS, Rhee KH, Yoon JH, Lee JG, Lee JH, Yoo JB. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) induces apoptosis by the activation of caspase-3 in oral cavity cancer cells. *Oral Oncol.* 2005; 41: 383-9.
- Lennartsson P, Hogberg J, Stenius U. Wild-type p53 expression in liver tissue and in enzyme-altered foci: an in vivo investigation on diethylnitrosamine-treated rats. *Carcinogenesis.* 1998; 19: 1231-7.
- Lennartsson P, Stenius U, Hogberg J. p53 expression and TGF-alpha-induced replication of hepatocytes isolated from rats exposed to the carcinogen diethylnitrosamine. *Cell Biol Toxicol.* 1999; 15: 31-9.
- Levin S, Bucci TJ, Cohen SM, Fix AS, Hardisty JF, LeGrand EK, Maronpot RR, Trump BF. The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicol Pathol.* 1999; 27: 484-90.
- Luo Y. *Ginkgo biloba* neuroprotection: Therapeutic implications in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2001; 3: 401-407.
- Mead JE, Fausto N. Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1558-62.

Moore MA, Nakagawa K, Satoh K, Ishikawa T, Sato K. Single GST-P positive liver cells--putative initiated hepatocytes. *Carcinogenesis* 1987; 8: 483-6.

Moore MA, Tsuda H, Tamano S, Hagiwara A, Imaida K, Shirai T, Ito N. Marriage of a medium-term liver model to surrogate markers--a practical approach for risk and benefit assessment. *Toxicol Pathol.* 1999; 27: 237-42.

Nakae D, Kobayashi Y, Akai H, Andoh N, Satoh H, Ohashi K, Tsutsumi M, Konishi Y.

Involvement of 8-hydroxyguanine formation in the initiation of rat liver carcinogenesis by low dose levels of N-nitrosodiethylamine. *Cancer Res.* 1997; 57: 1281-7.

Pinheiro F, Faria RR, de Camargo JL, Spinardi-Barbisan AL, da Eira EF, Barbisan LF.

Chemoprevention of preneoplastic liver foci development by dietary mushroom *Agaricus blazei* Murrill in the rat. *Food Chem Toxicol.* 2003; 41: 1543-50.

Pitot HC, Dragan YP, Teegarden J, Hsia S, Campbell H. Quantitation of multistage carcinogenesis in rat liver. *Toxicol Pathol.* 1996; 24: 119-28.

Ryu SD, Chung WG. Induction of the procarcinogen-activating CYP1A2 by a herbal dietary supplement in rats and humans. *Food Chem Toxicol.* 2003; 41: 861-6.

Sasaki K, Hatta S, Wada K, Ueda N, Yoshimura T, Endo T, Sakata M, Tanaka T, Haga M.

Effects of extract of *Ginkgo biloba* leaves and its constituents on carcinogen-metabolizing enzyme activities and glutathione levels in mouse liver. *Life Sci.* 2002; 70: 1657-67.

Satoh K, Hatayama I, Tateoka N, Tamai K, Shimizu T, Tatematsu M, Ito N, Sato K.

Transient induction of single GST-P positive hepatocytes by DEN. *Carcinogenesis* 1989; 10: 2107-11.

- Satoh K, Hatayama I. Anomalous elevation of glutathione S-transferase P-form (GST-P) in the elementary process of epigenetic initiation of chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1193-8.
- Sener G, Omurtag GZ, Sehirli O, Tozan A, Yuksel M, Ercan F, Gedik N. Protective effects of ginkgo biloba against acetaminophen-induced toxicity in mice. *Mol Cell Biochem.* 2006; 283: 39-45.
- Sturgill MG, Lambert GH. Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clin Chem.* 1997; 43: 1512-26.
- Su Q, Benner A, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Human hepatic preneoplasia: phenotypes and proliferation kinetics of foci and nodules of altered hepatocytes and their relationship to liver cell dysplasia. *Virchows Arch.* 1997; 431: 391-406.
- Su Q, Bannasch P. Relevance of hepatic preneoplasia for human hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol.* 2003; 31: 126-33.
- Sugiyama T, Kubota Y, Shinozuka K, Yamada S, Yamada K, Umegaki K. Induction and recovery of hepatic drug metabolizing enzymes in rats treated with Ginkgo biloba extract. *Food Chem Toxicol.* 2004; 42: 953-7.
- Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Sasaki K, Yoshimura T, Wada K, Tanaka T. Preventive effects of extract of leaves of ginkgo (*Ginkgo biloba*) and its component bilobalide on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Cancer Lett.* 2004; 210: 159-69.
- Swenberg JA, Hoel DG, Magee PN. Mechanistic and statistical insight into the large carcinogenesis bioassays on N-nitrosodiethylamine and N-nitrosodimethylamine. *Cancer Res.* 1991; 51: 6409-14.

- Tatematsu M, Aoki T, Kagawa M, Mera Y, Ito N. Reciprocal relationship between development of glutathione S-transferase positive liver foci and proliferation of surrounding hepatocytes in rats. *Carcinogenesis* 1988; 9: 221-5.
- Tozan A, Sehirli O, Omurtag GZ, Cetinel S, Gedik N, Sener G. Ginkgo biloba extract reduces naphthalene-induced oxidative damage in mice. *Phytother Res.* 2007; 21: 72-7.
- Tsuda H, Fukushima S, Wanibuchi H, Morimura K, Nakae D, Imaida K, Tatematsu M, Hirose M, Wakabayashi K, Moore MA. Value of GST-P positive preneoplastic hepatic foci in dose-response studies of hepatocarcinogenesis: evidence for practical thresholds with both genotoxic and nongenotoxic carcinogens. A review of recent work. *Toxicol Pathol.* 2003; 31: 80-6.
- Verna L, Whysner J, Williams GM. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther.* 1996; 71: 57-81.
- Wattenberg LW. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Res.* 1992; 52: 2085-91.
- Williams GM, Iatropoulos MJ, Wang CX, Ali N, Rivenson A, Peterson LA, Schulz C, Gebhardt R. Diethylnitrosamine exposure-responses for DNA damage, centrilobular cytotoxicity, cell proliferation and carcinogenesis in rat liver exhibit some non-linearities. *Carcinogenesis* 1996; 17: 2253-8.
- Yang XF, Wang NP, Lu WH, Zeng FD. Effects of Ginkgo biloba extract and tanshinone on cytochrome P-450 isozymes and glutathione transferase in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2003; 24: 1033-8.

Ye B, Aponte M, Dai Y, Li L, Ho M-C.D, Vitonis A, Edwards D Huang, T-N, Cramer DW.

Ginkgo biloba and ovarian cancer prevention: Epidemiological and biological evidence.

Cancer Let. 2006; Epub ahead of print.

Yuan G, Gong Z, Li J, Li X. Ginkgo biloba extract protects against alcohol-induced liver

injury in rats. Phytother Res. 2006; Epub ahead of print.

Zhang WR, Hayashi T, Kitagawa H, Sasaki C, Sakai K, Warita H, Wang JM, Shiro Y,

Uchida M, Abe K. Protective effect of ginkgo extract on rat brain with transient middle

cerebral artery occlusion. Neurol Res. 2000; 22: 517-21.

Table 1 – General, liver, biochemical and GST-P positive hepatocytes data for 24 hours and 2 weeks, respectively, after DEN initiation in short-term bioassay¹.

Parameters	Groups ²	DEN	DEN+500ppm	DEN+1000 EGb	Control
		(G1A, n=10)	(G2A, n=10)	(G3A, n=05)	(G4A, n=05)
General data					
Final body weight (g)		255.8 ± 23.91	265.0 ± 30.13	270.00 ± 22.44	280.40 ± 22.44
Body weight gain (g)		88.60 ± 18.89	97.60 ± 10.74	104.20 ± 12.73	113.60 ± 7.70
Food consumption (g/rat/day)		24.3 ± 2.05	23.70 ± 2.32	23.91 ± 2.18	24.30 ± 2.65
EGb consumption (mg/rat/day)		0	11.85 ± 1.16	23.91 ± 2.18	0
Liver and biochemical data					
Liver absolute weight (g)		10.05 ± 1.36	10.57 ± 1.78	10.79 ± 0.79	12.62 ± 0.93
Relative liver weight (%)		3.93 ± 0.24	3.98 ± 0.39	4.00 ± 0.40	4.50 ± 0.40
PCNA LI%		6.88 ± 1.45*	6.70 ± 1.85*	2.59 ± 0.95*,**	1.48 ± 0.24
AI%		2.36 ± 0.95*	1.74 ± 0.32*	0.63 ± 0.28*,**	0.04 ± 0.05
p53		4.80 ± 2.54	4.34 ± 2.73	1.72 ± 0.70**	0
TGF-alpha ³		++	++	+	-/+
AST		215.60 ± 43.26*	196.40 ± 31.66*	155.0 ± 38.39*,§	91.80 ± 20.91
ALT		123.80 ± 8.87*	124.60 ± 14.55*	106.4 ± 9.02*,§	81.60 ± 8.20
GST-P positive hepatocytes data					
Zone 1/ cm ²		17.32 ± 4.40	13.74 ± 6.68	10.42 ± 3.38 [§]	ND
Zone 2/ cm ²		23.23 ± 4.38	19.21 ± 5.49	11.51 ± 2.22**	ND
Zone 3/ cm ²		6.33 ± 0.78	8.31 ± 3.77	2.79 ± 1.18**	ND
All zones/ cm ²		46.84 ± 7.38	41.24 ± 8.36	24.76 ± 5.24**	ND

¹Values are means ± SD; ²DEN= diethylnitrosamine (100 mg/kg b.w., i.p.), EGb= *Ginkgo biloba* extract at 500 and 1000ppm in basal diet during six weeks; ³Semiquantitative analyses. * Different from Group G4A, 0.05 < P < 0.001; ** Different from G1A, 0.05 < P < 0.03; [§] Trend from G1A, 0.05 < P < 0.08; ND = Not determined.

Table 2 – General, liver and biochemical and GST-P positive foci data 8 weeks after DEN initiation in medium-term bioassay¹.

Parameters	Groups ²	DEN	DEN+500 EGb	DEN+1000 EGb	1000 EGb	Control
		(G1B, n=10)	(G2B, n=10)	(G3B, n=10)	(G4B, n=05)	(G5B, n=05)
General data						
Final body weight (g)		358.98 ± 30.82	357.89 ± 33.12	367.22 ± 29.71	380.68 ± 17.00	371.88 ± 18.42
Body weight gain (g)		105.06 ± 21.75	102.48 ± 25.29	110.30 ± 22.29	126.68 ± 21.58	122.10 ± 14.39
Food consumption (g/rat/day)		27.01 ± 2.58	26.70 ± 2.84	27.27 ± 2.52	27.20 ± 3.30	27.46 ± 3.10
EGb consumption (mg/rat/day)		0	13.35 ± 1.42	27.27 ± 2.52	27.20 ± 3.30	0
Liver and biochemical data						
Liver absolute weight (g)		9.33 ± 1.33	9.55 ± 1.07	9.37 ± 0.83	10.12 ± 0.90	9.08 ± 1.09
Relative liver weight (%)		2.59 ± 0.22	2.66 ± 0.11	2.55 ± 0.11	2.66 ± 0.18	2.48 ± 0.25
PCNA LI%		ND	ND	ND	0.33 ± 0.05	0.42 ± 0.15
AI%		ND	ND	ND	0.07 ± 0.08	0.08 ± 0.08
AST		85.33 ± 14.6	91.92 ± 22.2	83.58 ± 16.30	83.00 ± 7.71	82.57 ± 9.54
ALT		66.75 ± 16.1	69.00 ± 14.1	61.17 ± 8.89	55.80 ± 10.18	58.43 ± 11.84
GST-P positive foci data						
Number (foci/cm ²)		9.21 ± 4.44	12.1 ± 4.53	11.65 ± 2.96	0	0
Mean size (mm ²)		0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0	0
Area (mm ² /cm ²)		0.23 ± 0.14	0.27 ± 0.15	0.33 ± 0.17	0	0

¹Values are means ± SD; ²DEN= diethylnitrosamine (200 mg/kg b.w., i.p.), EGb= *Ginkgo biloba* extract at 500 and 1000ppm in basal diet during six weeks; n= number of rats/group; ND= Not determined.

Legend for figures

Figure 1- Schematic representation of the design of short-term and medium-term liver bioassays. ▼ = 100 or ▼ 200 mg/kg body weight of diethylnitrosamine (DEN); ▽ = 0.9% NaCl; ⚭ = 70% partial hepatectomy, □ = Diet containing 500ppm of EGb; ■ = Diet containing 1000ppm of EGb; n = number of animals/group; s_{1 to 3} = sacrifice 24 hours, 2 and 8 weeks after DEN-treated, respectively.

Figure 2- Rat liver of control only DEN-initiated group: A, C, E and G; and 1000ppm EGb plus DEN-initiated ginkgo treated group: B, D, F and H; showing the apoptosis indices (A *versus* B), PCNA indices (C *versus* D), p53 nuclear expression (E *versus* F) and TGF- α expression (G *versus* H) used as end-points for short-term bioassay. Arrows= apoptotic hepatocytes, TV= Terminal venule.

Figure 3- Immunohistochemistry for GST-P putative single cell (A), hepatocyte minifoci (B) and foci of altered hepatocytes (FAH) (C) used as end-points for short-term and medium-term bioassays.

Conclusões

- 1) O tratamento por seis semanas com o extrato de *Ginkgo biloba* (EGb), administrado por via oral, não induziu toxicidade geral ou hepática aos animais.
- 2) O EGb na concentração 1000ppm, quando administrado antes e concomitantemente ao agente químico iniciador, foi eficaz em reduzir os efeitos deletérios (toxicidade e carcinogenicidade) da administração da dietilnitrosamina (DEN). Entretanto, quando administrado após a etapa iniciação pela DEN, o extrato não foi capaz de suprimir a expansão clonal de hepatócitos iniciados.
- 3) Concentrações maiores de EGb na alimentação dos animais poderiam resultar em inibição da promoção da carcinogênese hepática (inibição do crescimento de FHAs GST-P positivos) ou efetivamente, a atividade anti-promotora do EGb poderia ser caracterizada em outro órgão-alvo.