Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) como agente etiológico de neoplasia de língua

Yerba / erva mate (Ilex paraguariensis) *as an ethyological agent of lingual neoplasia*

RAFAEL JOSÉ VARGAS ALVES – Aluno do Curso de Medicina da ULBRA.
TIAGO HERMES MAESO MONTES – Aluno do Curso de Medicina da ULBRA.
ROBERTO CHACUR – Aluno do Curso de Medicina da ULBRA.
MARINA DIAS DE OLIVEIRA – Aluna do Curso de Medicina da ULBRA.
MARTA ISABEL HUBNER – Aluna do Curso de Medicina da ULBRA.
CAROLINE BUZZATTI – Médica formado pela ULBRA.
GERALDO PEREIRA JOTZ – Professor Adjunto Doutor da disciplina de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Curso de Medicina da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) e do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
HONÓRIO SAMPAIO MENEZES – Professor Adjunto Doutor de Bioética da ULBRA e Pesquisador da Fundação Universitária de Cardiologia (FUC).
CLÁUDIO ZETTLER – Professor Adjunto doutor da disciplina de Patologia do Curso de Medicina da ULBRA.

Trabalho realizado no Laboratório de Experimento Animal do Instituto de Cardiologia do RS, Porto Alegre, RS, Brasil, e do Serviço de Patologia da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

✉ Endereço para correspondência:
Prof. Dr. Geraldo Pereira Jotz
Rua Dom Pedro II, 891/604 – São João
90550-142 – Porto Alegre, RS, Brasil
☎ (51) 3219-2802 / 22, 23, 24
jotz.voz@terra.com.br

RESUMO

Introdução: A erva-mate tem sido implicada como possível fator de risco para o desenvolvimento do câncer de língua.
Objetivo: O objetivo do estudo é o de avaliar as alterações patológicas bem como a expressão imuno-histoquímica nas amostras de língua de ratos "bebedores de erva-mate".
Material e método: No estudo foram analisados 75 ratos Wistar adultos com 5 meses de vida (peso acima de 300 gramas cada um) que fizeram a ingestão de erva-mate diariamente por 9 semanas. Após, foram eutanasiados e a língua retirada para avaliação anatomopatológica e imuno-histoquímica.
Resultados: Não foram observadas alterações ao exame anatomopatológico e imuno-histoquímico compatível com processo neoplásico nas 75 peças analisadas.
Conclusão: Não foram observadas associações nas amostras de língua de ratos "bebedores de erva-mate" nos exames anatomopatológico e imuno-histoquímico.

UNITERMOS: Língua, Erva-Mate, Neoplasia, Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Introduction: *mate has been implicated as a possible risk factor for the development of cancer of the tongue.*
Aim: *The aim of the study is to evaluate the pathological alterations as well as the immunohistochemical expression in samples from the tongues of "mate drinking" rats.*
Material and Method: *In the study, 75 adult Wistar, aged 5 months (weighing over 300 grams each) that had ingested mate on a daily basis for 9 weeks were analyzed. Following sacrifice, the tongue was removed for anatomical-pathological and immunohistochemical evaluation.*
Results: *In the anatomical-pathological and immunohistochemical examination, no alterations compatible with neoplasic processes were observed in the 75 pieces analyzed.*
Conclusion: *No associations were found in the samples of tongue from "mate drinking" rats in the anatomical-pathological and immunohistochemical examinations.*

KEY WORDS: *Tongue, Yerba / Erva-Mate, Neoplasia, Immunohistochemistry.*

INTRODUÇÃO

O manejo dos tumores malignos de língua representa um dos maiores desafios para os oncologistas devido aos efeitos adversos do tratamento e do mau prognóstico, quando essa doença se encontra em um estágio mais avançado.

Carcinomas da base da língua são assintomáticos até que haja invasão na musculatura da língua e os mais comuns são os de células escamosas. Dor (envolvimento do nervo lingual), perda de peso, disfagia, odinofagia, otalgia, hemoptise e rouquidão são os principais achados nesse tipo de câncer.

A leucoplasia é uma lesão pré-cancerosa, devido à irritação crônica da mucosa, indicativo essencial para se fazer o diagnóstico precoce de neoplasias de língua. Banoczy (1) acompanhou 670 pacientes com leucoplasia durante trinta anos. Trinta desses pacientes vieram a desenvolver neoplasia de língua.

O estudo do genoma dessas neoplasias demonstraram altas taxas de aneuplodias (50-70%), mostrando associação com mau prognóstico (2,3). A transição de epitélio normal para hiperplasia e posteriormente displasia está associada com a proliferação anormal das células, além da membrana basal, mostrando correlação com a expressão do gene Ki 67 (3). Mutações no gene p53

Recebido: 13/3/2006 – Aprovado: 20/12/2006

05-1716-erva mate.p65 7 12/6/2007, 08:20

estão presentes em áreas pré-malignas, carcinoma *in situ* e displasia severa (4). Além disso, o tabaco e o álcool estão associados à alta freqüência de mutações no gene p53 (5).

O gene supressor tumoral p53 está localizado no braço curto do cromossomo 17 e é um regulador negativo da proliferação celular. Em células normais a quantidade da proteína p53 é baixa devido a sua rápida metabolização. Mutações no gene p53 alteram sua conformação, aumentando sua vida média, resultando em aumento dos seus níveis, permitindo, assim, sua detecção por métodos imuno-histoquímicos (6).

O tabaco e o álcool são considerados os principais fatores etiológicos para câncer de língua. Em um estudo de caso-controle realizado em Beijing (China) para investigar os fatores de risco para o câncer de língua mostrou que o risco de câncer de língua é significativamente elevado nos fumantes e ex-fumantes (7). Além disso, o risco de câncer aumenta conforme o consumo de tabaco durante a vida. Entretanto, neste estudo, não foi encontrada uma correlação significativa entre o álcool e o desenvolvimento de neoplasia de língua. Há evidências de que a exposição progressiva ao tabaco proporcione modificações na histologia da mucosa da língua.

Aproximadamente 75% a 80% dos pacientes com câncer de boca são etilistas. Como nos fumantes, a incidência é cerca de 6 vezes maior nos etilistas do que nos não-etilistas (8).

Além do tabaco e do álcool, o hábito de tomar mate, ou chimarrão, como também é conhecida esta bebida, uma infusão quente, feita com as folhas secas e picadas de *Ilex paraguariensis*, tem sido implicada como possível causa de câncer de língua. Oreggia et al. (9) conduziram um estudo caso-controle no Uruguai e observaram que o álcool e o tabaco são fatores de risco para o câncer de língua e que a ingestão diminuída de vegetais e o consumo de mate pode contribuir também como fator de risco.

O conhecimento dos casos de câncer, formas de manifestação, evolução e mortalidade são imprescindíveis para o conhecimento e aperfeiçoamento do tratamento bem como para sua prevenção.

O presente estudo experimental tem por objetivo comparar as possíveis alterações da língua de ratos submetidos ao consumo de erva-mate *(Ilex paraguariensis)*, ingerida em temperatura ambiente através do exame anatomo-patológico e da expressão imuno-histoquímica, com um grupo que recebeu somente água durante o período de estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi experimental, utilizando uma população de 75 ratos Wistar adultos (250-300g), mantidos no laboratório de esperimento animal do Instituto de Cardiologia, divididos em 3 (três) grupos de 20 (vinte) ratos cada, que consumiram um preparado de erva-mate com água ambiente durante 5 meses, e um grupo de 15 (quinze) ratos consumindo água sem erva-mate, como grupo-controle, sendo analisadas suas línguas através do exame anatomopatológico e da expressão imuno-histoquímica (p53 e Ki 67), no 8º (oitavo) mês de vida do rato.

Os grupos ingeriram a bebida em temperatura-ambiente, porém preparada com água quente no modelo padrão do chimarrão tradicional (folhas de erva-mate moídas). Cada grupo de estudo consumiu um tipo de erva-mate (erva A, erva B e erva C). Dentre os tipos de erva-mate escolhidos, foram selecionados 2 tipos comercialmente "famosos" (ervas tipo A e B) em nosso meio e uma marca comercialmente não conhecida mas de plantio conhecido, na qualidade de grupo-controle (erva tipo C) das ervas-mates.

Ratos com 3 meses de idade são considerados adultos, e com 8 meses são considerados idosos. Sendo assim, foi escolhido o período de 5 meses para melhor simular o consumo humano. Os ratos, além do preparado da erva-mate, consumiram "Nuvilab", ração especial para sua espécie.

Após a eutanásia dos ratos, realizou-se a análise microscópica dos tecidos da língua do rato Wistar.

O material obtido foi processado em histotécnico com confecção de bloco de parafina, cortado em micrótomo, corado pelo método de hematoxilina e eosina. Após, as lâminas foram estudadas em microscópio óptico.

Para o estudo imuno-histoquímico foram utilizados cortes, de seis micrômetros, sinalizados pela técnica da Avidina-Biotina peroxidase. A antigenicidade do tecido foi restaurada pela fervura dos cortes histológicos em forno de microondas utilizando soluções denaturantes. Peróxido de hidrogênio (1,5%) foi utilizado para bloquear a peroxidase endógena presente nos tecidos. Foi utilizado o anticorpo anti-proteína p53 e Ki 67 (*mouse*) produzido pela Dako Corporation na diluição de 1:50. Utilizou-se o anticorpo secundário, ou seja, a imunoglobulina anti-imunoglubulina de coelho biotinizada do Kit Avidina-Biotina (ABC) (Vector Laboratories) para anticorpo policlonais produzidas em coelho e a imunoglobulina antiimunoglobulina de camundongo (Vector Laboratories) biotinizadas para anticorpo monoclonais produzidas em camundongos. Os cortes foram incubados com uma gota de anticorpo primário, deixando em geladeira (4º) durante 14 a 16h (*overnight*). A incubação com anticorpo secundário foi feita em câmara úmida a temperatura-ambiente. Os cortes foram corados pelo método imuno-histoquímico e foram examinados ao microscópio óptico convencional, sendo a leitura das lâminas realizada pela observação da positividade da reação ou não (considerou-se positivo o achado de 5% de células reagentes coradas no núcleo e na membrana, respectivamente).

Os animais foram tratados de acordo com a Lei 6.638, de 8 de maio de 1979, e com o manual para técnicos de biotério, que regulamenta e indica cuidados mínimos e dignos para animais de experimentação, bem como com orientações preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Instituto de Cardiologia também onde os ratos foram tratados.

05-1716-erva mate.p65 8 12/6/2007, 08:20

RESULTADOS

Não foi encontrada nenhuma alteração no exame anatomopatológico (Figura 1 – corte histológico da língua) e imuno-histoquímico (Figura 2-p53 e Figura 3-Ki-67) compatível com processo neoplásico ou qualquer outro tipo de alteração, nas 75 peças de língua analisadas.

Não realizamos análise estatística, pois em nenhum caso houve alterações que pudessem sugerir alguma significância.

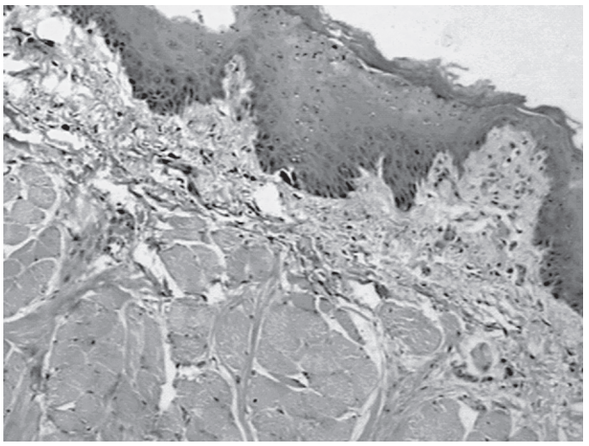


Figura 1 – Língua normal (HE – 100x).

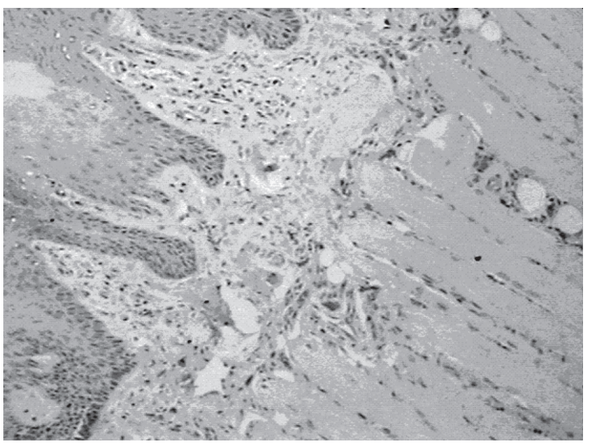


Figura 2 – Língua normal. Ausência de expressão de Ki 67 (imuno-histoquímica – 100x).

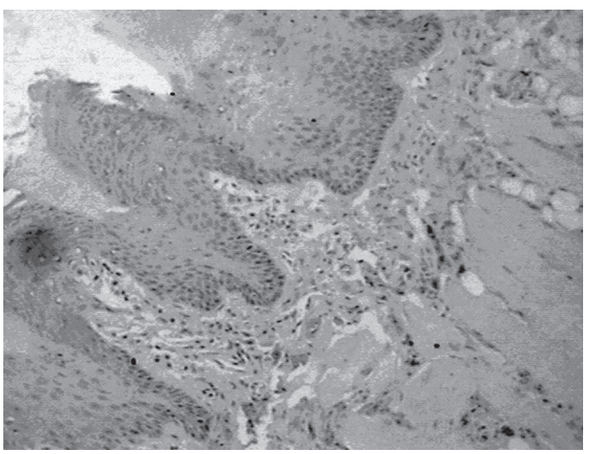


Figura 3 – Língua normal. Ausência de expressão do p53 (imuno-histoquímica – 100x).

DISCUSSÃO

O presente estudo experimental analisou a histologia da língua de ratos submetidos ao consumo de erva-mate *Ilex paraguariensis*, ingerida em temperatura-ambiente, assim eliminando a variável temperatura alta da água, uma vez que este fato é relatado como fator de risco para o desenvolvimento de câncer nos bebedores de mate (10).

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasia maligna de língua, a erva-mate (hábito de tomar chimarrão) tem sido referenciada na literatura como um fator importante. Um fator em que ainda não se observou um consenso na literatura é a quantidade de mate consumido, assim como a já referida temperatura da infusão. Entretanto, como nós não infundimos líquidos quentes, o fator temperatura foi descartado.

Pintos et al. (11) observaram que os bebedores de mate tinham mais chances de desenvolver neoplasia de orofaringe (RR = 1,9, 95% IC = 1,1-3,3), mas não encontrou nenhuma evidência de que a temperatura da água poderia influenciar no processo carcinogênico.

Franco et al. (12) investigaram os fatores de risco para o câncer de língua comparando bebedores de mate a alta e baixa temperatura. Nesse estudo foi observado que não havia diferença significativa entre a temperatura da infusão de erva-mate.

Apesar de os estudos citados acima (11,12) mostrarem que a temperatura da água não é um fator determinante para neoplasias de língua e nada evidenciarem a respeito do poder etiopatogênico da erva-mate em si, neste estudo não foi encontrado nenhum achado sugestivo de lesão pré-cancerosa que possa ter como fator de risco o consumo de erva-mate. Possivelmente, para esse tipo de câncer, a temperatura da água não é muito significativa.

Entretanto, há outros estudos que mostram que a quantidade de infusão

05-1716-erva mate.p65 9 12/6/2007, 08:20

de erva-mate ingerida por dia é um fator determinante para o desenvolvimento de neoplasias de língua (9,13). Entretanto, este fator não foi avaliado no nosso estudo, pois a quantidade de infusão foi a mesma para todos os animais e não com infusão progressivamente maior, tendo variado apenas o nome comercial ® e a região onde ela era produzida no Estado do Rio Grande do Sul.

Rolon et al. (14), Castellsague et al. (15) estudaram a relação de câncer de esôfago com tomadores de mate quente, não relacionando com o hábito de tomar mate frio, indicando a água muito quente como fator desencadeador do risco de câncer esofágico, fato não confirmado por outros pesquisadores (11, 13).

A ração utilizada para a alimentação dos animais ("Nuvilab®") é rica em vitaminas (Vit. A 12,0 UI; Vit. D_3 1,80 UI; Vit. E 30mg; Vit. B_1 5mg; Vit. B_2 6mg; Vit. B_6 7mg; Vit. B_{12} 20mcg– conteúdo por kg dieta, segundo o fabricante). Esse dado pode ter contribuído como um fator de proteção para o não desenvolvimento de qualquer processo neoplásico na cavidade oral dos ratos estudados, em virtude, que vários trabalhos na literatura comprovam a atividade antioxidante das vitaminas A, C e E, elementos existentes na ração utilizada pelos ratos Wistar.

McLaughlin et al. (16) evidenciaram que a vitamina A e beta-carotenos são fatores de proteção para neoplasias de cavidade oral.

Zheng et al. (17), em estudo de caso-controle, observou que os níveis séricos de carotenos, particularmente os beta-carotenos, estavam diminuídos em pacientes que vieram a desenvolver câncer de orofaringe. Além disso, o risco de desenvolver câncer diminuía conforme o aumento dos níveis de beta-carotenos.

Kune et al. (18) conduziram um estudo de caso-controle em Melbourne (Austrália) com 41 homens com diagnóstico histológico de câncer de orofaringe de células escamosas e 398 homens da comunidade (controle). Esse estudo constatou que o aumento da ingestão de vitamina C, beta-carotenos, frutas e dietas ricas em fibras diminuía o risco de desenvolvimento de câncer de orofaringe. Os níveis médios de vitamina A e beta-carotenos, no grupo com diagnóstico de câncer, eram menores em comparação com o controle, diferença essa estatisticamente significativa.

Beta-carotenos e vitamina A em doses altas induzem à remissão de leucoplasia oral em 25-30% dos casos (19).

Winn et al. (20) conduziram um estudo caso-controle na Carolina do Norte (EUA) com 227 mulheres com diagnóstico de câncer de orofaringe e 405 mulheres hígidas (controle). Nesse estudo foi observado o grande efeito protetor da ingestão de frutas e verduras, ricas em vitaminas e sais minerais, contra o desenvolvimento de neoplasias de orofaringe. Os indivíduos que faziam um consumo moderado de frutas e verduras tinham um risco relativo de 0,65 de desenvolver algum câncer de orofaringe em comparação aos grandes consumidores desse tipo de dieta (risco relativo de 0,52).

Possivelmente, a alimentação rica em vitamina A e B e a pouca ingestão de erva-mate contribuíram para o não desenvolvimento de neoplasia na língua. Sendo assim, é necessário um número maior de estudos experimentais para elucidar a hipótese levantada acima.

CONCLUSÃO

Não houve associação da ingesta da erva-mate, na temperatura ambiente, com alterações teciduais ao exame anátomo-patológico e na expressão imuno-histoquímica (p53 e Ki 67) da língua das espécimes examinadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BANOCZY J. Follow-up studies in oral leukoplakia. J Am Dent Assoc. 1978; 96(4):615-20.
2. ENSLEY JF, MACIOROWSKI Z, PIETRASZKIEWICZ H, et al. Clinical applications of cellular DNA content parameters determined by flow cytometry in squamous cell cancers of the head and neck. In Adjuvant Therapy of Cancer VI. Edited by SE Jones and SE Salmon. Orlando, FL: Grune and Stratton, 1990, pp 101.
3. COLTRERA MD, ZARBO RJ, GOWN AM, et al. Comparison of two putative markers of premalignant change in the oral cavity: suprabasal expression of CK-19 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). In Proceedings of the Third International Head and Neck. Oncology Research Conference, Las Vegas, 1990.
4. BOYLE JO, HAKIN J, KOCH WM, *et al.* The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 4477.
5. BRENNAN JA, BOYLE JO, KOCH WM, *et al.* Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332.
6. BARBARESCHI M, LEONARDI E, et al. P53 and c-erbB-2 protein expression in breast câncer. Am J Clin Pathol 1992; 98: 408-18.
7. ZHENG T, HOLFORD T, CHEN Y, JIANG P, ZHANG B, BOYLE P. Risk of tongue cancer associated with tobacco smoking and alcohol consumption: a case-control study. Oral Oncol 1997; 33(2): 82-5.
8. MINCIS M. Gastroenterologia & Hepatologia : diagnóstico e tratamento. São Paulo: Editora Lemos, 2002.
9. OREGGIA F, DE STEFANI E, CORREA P, FIERRO L. Risk factors for cancer of the tongue in Uruguay. Cancer 1991; 67(1): 180-3.
10. GOLDENBERG D, GOTZ A, JOACHIMS HZ. The beverage mate: a risk factor for cancer of the head and neck. Head & Neck 2003; 25(7):595-601.
11. PINTOS J, FRANCO EL, OLIVEIRA BV, KOWALSKI LP, CURADO MP, DEWAR R. Mate, coffee, and tea consumption and risk of cancers of the upper aerodigestive tract in southern Brazil. Epidemiology 1994; 5(6): 583-90.
12. FRANCO EL, KOWALSKI LP, OLIVEIRA BV, CURADO MP, PEREIRA RN, SILVA ME, FAVA AS, TORLONI H. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. Int J Cancer 1989; 43(6): 992-1000.
13. DE STEFANI E, CORREA P, OREGGIA F, et al. Black tobacco, wine and mate in oropharyngeal cancer. A case-control study from Uruguay. Rev Epidemiol Sante Publique 1988; 36:389-394.
14. ROLON PA, CATELLSAGUE X, BENZ M, MUNOZ N. Hot and cold mate drinking and esophageal cancer in Paraguay. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1995; 4:595-605.
15. CASTELLSAGUE X, MUNOZ N, DE STEFANI E, VICTORA CG, CASTE-

05-1716-erva mate.p65 10 12/6/2007, 08:20

LLETTO R, ROLON PA. Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. Int J Cancer 2000; 88:658-664.

16. J.K. MCLAUGHLIN, G. Gridley, and G. Block, *et al.* Dietary factors in oral and pharyngeal cancer. *J Natl Cancer Inst* 1988 Oct 5; 80(15): 1237-43.
17. ZHENG W, BLOT WJ, DIAMOND EL, NORKUS EP, SPATE V, MORRIS JS, COMSTOCK GW. Serum micronutrients and the subsequent risk of oral and pharyngeal cancer. Cancer Res. 1993 Feb 15; 53(4):795-8.
18. KUNE GA, KUNE S, FIELD B, WATSON LF, CLELAND H, MERENSTEIN D, VITETTA L. Oral and pharyngeal cancer, diet, smoking, alcohol, and serum vitamin A and beta-carotene levels: a case-control study in men. Nutr Cancer 1993; 20(1):61-70.
19. SANKARANARAYANAN R, NAIR MK, MATHEW B, BALARAM P, SEBASTIAN P, DUTT SC. Recent results of oral cancer research in Kerala, India. Head Neck 1992; 14(2):107-12.
20. WINN DM, ZIEGLER RG, PICKLE LW, GRIDLEY G, BLOT WJ, HOOVER RN. Diet in the etiology of oral and pharyngeal cancer among women from the southern United States. Cancer Res 1984; 44(3):1216-22.

05-1716-erva mate.p65 11 12/6/2007, 08:20