

HUSSEN MACHADO

**ATIVIDADE DOS FLAVONÓIDES RUTINA E NARINGINA SOBRE O
TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH “*IN VIVO*”.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

VIÇOSA
MINAS GERAIS–BRASIL
2006

HUSSEN MACHADO

**ATIVIDADE DOS FLAVONÓIDES RUTINA E NARINGINA SOBRE O
TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH “IN VIVO”.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

APROVADA: 02 maio de 2006

Prof. Marcelo José Vilela
(Co-orientador)

Prof. Tanus Jorge Nagem
(Co-orientador)

Prof^a. Marlene Isabel Vargas Vitoria

Prof^a. Vera Maria Peters

Prof^a. Tania Toledo de Oliveira
(Orientadora)

Dedico essa tese a meus pais, *Milton e Marion*, pela educação, dedicação e principalmente por compreenderem minha ausência. Pois, os filhos crescem e saem para o mundo, mas sem perder de vista o porto seguro, com o seu farol sempre aceso, atento a tudo e de portas abertas. É essa segurança, de saber que estou sempre protegido que me dá a força necessária para seguir em frente. **A vocês dedico não só a vitória, mas o fato de existir.** Amo e admiro muito vocês não apenas como filho, mas como Homem.

A minha irmã **Francely**, pela cumplicidade e torcida por minhas realizações.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e amiga Dra. Tânia Toledo de Oliveira, pela confiança, sinceridade e orientação tanto científica como de vida. “Pois, Umas são mulheres; algumas professoras; poucas são mestres. As primeiras escuta-se; as segundas respeita-se; as últimas segue-se”. Um obrigado de seu eterno amigo.

Ao professor Dr. Marcelo José Vilela, exemplo de sinceridade, amizade e seriedade profissional. Muito obrigado. Pois, “Os melhores professores são aqueles que se fazem de ponte e convidam seus alunos a atravessá-la depois, de facilitada a atravessia, eles se desfazem com prazer, incentivando seus alunos a construir suas próprias pontes”.

Ao professor Dr. Tanus Jorge Nagem pelo apoio, conselhos e tão calorosa acolhida, possibilitando meu crescimento profissional.

À professora Dra. Marlene Isabel Vargas Vitoria pela colaboração imprescindível durante a leitura das lâminas.

A Silvana Lages Ribeiro Garcia pelas análises estatísticas realizadas com carinho e dedicação. Obrigado.

Ao meu primo Salustiano, pela confiança, conselhos e orientação profissional. Muito obrigado pela ajuda e contribuição para a realização de meus sonhos.

A Cristiane pela amizade e enorme dedicação para a realização de nosso trabalho.

A Santuzza, pela dedicação, paciência e carinho diário. Obrigado por sempre acreditar em mim e em meu sucesso.

A Maria Aparecida Leão, pela grande amizade e ajuda para a conclusão desse trabalho.

Ao José Geraldo Pinto, pelo apoio indispensável nas análises sangüíneas.

A todos os estagiários do Laboratório de Biofármacos que muito contribuíram para a realização desta obra, durante o desenvolvimento dos experimentos. A todos muito obrigado!

Aos estagiários do laboratório do Câncer que não mediram esforços para me ajudar. A ajuda de vocês foi imprescindível.

Ao meu eterno amigo Dr. Rodrigo Vilela Rodrigues, pela amizade, lealdade ao longo de nossa carreira estudantil.

Ao futuro Dr. Eduardo Rodrigues de Castro pela amizade e confiança construída em tão pouco tempo de convivência.

Aos meus amigos de república Toninho, Vinícius, Renato e Felipe e todos que por aqui passaram.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade e à coordenação do Programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola que possibilitaram a realização deste curso.

A todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram na realização deste trabalho.

“A ciência pela ciência não tem valor, vale apenas como meio de ascensão de vida. A verdadeira ciência deve ter como finalidade tornar melhor os homens”.

(Pietro Ubaldi)

BIOGRAFIA

HUSSEN MACHADO, filho de Milton José Machado e Marion Pessoa Machado, nasceu em Boa Esperança, MG, em 01 de novembro de 1978.

Concluiu o curso de graduação em Farmácia na Universidade Federal de Juiz de Fora (Juiz de Fora, MG), em janeiro de 2004.

Em agosto de 2004 foi aceito no programa de Pós-Graduação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, onde deu início aos trabalhos do mestrado na área de Bioquímica Agrícola.

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS -----	ix
LISTA DE TABELAS-----	xi
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS-----	xiv
RESUMO -----	xvi
ABSTRACT -----	xvii
1. INTRODUÇÃO -----	1
2. OBJETIVOS -----	3
2.1 Objetivos Geral -----	3
2.2 Objetivos Específicos -----	3
3. REVISÃO DE LITERATURA -----	4
3.1. Câncer -----	4
3.1.1. Invasão e Metástase-----	8
3.2. Tumor de Ehrlich-----	12
3.3. Flavonóides e Câncer-----	14
3.3.1. Flavonóides-----	19
3.4. Mecanismo de ação dos flavonóides-----	25
3.4.1 Ação Antioxidante -----	25
3.4.2 Atividade inibitória da síntese de óxido nítrico -----	28
3.4.3 Ação Antiinflamatória -----	31
3.4.4 Interação de flavonóides com outros sistemas	

enzimáticos-----	36
3.3.5 Ação anti-estrogênicas dos flavonóides-----	38
3.3.6 Inibição do proteasoma-----	39
4. MATERIAL E MÉTODOS -----	41
4.1 Animais -----	41
4.2 Obtenção do Tumor Ascítico de Ehrlich -----	42
4.3 Preparação das células tumorais para inoculação -----	42
4.4 Inoculação dos animais-----	43
4.5 Grupos e protocolo de tratamento -----	43
4.5.1. Primeiro experimento - prevenção do tumor ascítico de ehrlich com flavonóides-----	43
4.5.2. Segundo experimento - tratamento de camundongos com TAE com flavonóides -----	45
4.5.3. Neotaxel-----	45
4.6 Eutanásia dos camundongos, coleta de sangue, coleta de líquido ascítico e coleta do fígado para histopatologia-----	46
4.7 Análise do tempo de vida-----	47
4.8 Análise estatística -----	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	49
5.1 Prevenção do Tumor Ascítico de Ehrlich em camundongos tratados com diferentes flavonóides por 18 dias -----	49
5.2 Tratamento de camundongos com Tumor Ascítico de Ehrlich com diferentes flavonóides por 18 dias -----	64
5.3 Morfologia Hepática-----	81
5.3 Modificações histopatológicas encontradas-----	82
6. CONCLUSÕES -----	86
7. PERSPECTIVAS FUTURAS-----	88
8. BIBLIOGRAFIA -----	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Os múltiplos passos da carcinogênese-----	5
Figura 2	Mecanismos pelo qual um oncogene pode promover o crescimento celular-----	6
Figura 3	Comparação entre tumor benigno do miotério (leiomioma) e tumor maligno de origem semelhante (leiomiouossarcoma)-----	9
Figura 4	Representação esquemática dos múltiplos eventos apoptóticos-----	18
Figura 5	Representação esquemática simplificada da biossíntese de flavonóides-----	21
Figura 6	Representação esquemática dos processos fisiológicos desempenhados pelo oxido nítrico-----	29
Figura 7	Representação simplificada do potencial de indução de COX em macrófagos ativados na indução da angiogênese em lesões pré-neoplásicas-----	33
Figura 8	Estrutura do proteasoma-----	40
Figura 9	Administração dos flavonóides por gavage-----	43
Figura 10	Inoculação das células tumorais intraperitoneal-----	44
Figura 11	Corte de tecido hepático de animal normal que recebeu ração, onde são observados hepatócitos e espaço sinusóide -----	84
Figura 12	Corte de tecido hepático de animal com TAE que recebeu ração, onde são observados hepatócitos, espaço sinusóide e adesão de células tumorais -----	84

Figura 13	Corte de tecido hepático de animal com TAE que recebeu o flavonóide naringina, onde são observados, espaço sinusóide e adesão de células tumorais-----	85
Figura 14	Corte de tecido hepático de animal com TAE que recebeu a associação dos flavonóide rutina + naringina, onde são observadas, hemácias e adesão de células tumorais-----	85
Figura 15	Corte de tecido hepático de animal com TAE que recebeu o medicamento Neotaxel [®] , onde são observados hepatócitos, espaço sinusóide e adesão de células tumorais-----	85
Figura 16	Corte de tecido hepático de animal com TAE que recebeu o medicamento rutina, onde são observadas hemácias e adesão de células tumorais-----	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estrutura química de certos flavonóides de ocorrência natural em plantas -----	24
Tabela 2	Distribuição de animais por grupo-----	44
Tabela 3	Distribuição dos animais em cada grupo e seus respectivos tratamentos -----	45
Tabela 4	Valores médios de proteínas totais no soro sangüíneo de camundongos tratados com flavonóides por 20 dias com posterior indução do tumor ascítico de Ehrlich ---	49
Tabela 5	Valores médios de aspartato aminotransferase no soro sangüíneo de camundongos tratados com flavonóides por 20 dias com posterior indução do tumor ascítico de Ehrlich-----	51
Tabela 6	Valores médios de alanina aminotransferase no soro sangüíneo de camundongos tratados com flavonóides por 20 dias com posterior indução do tumor ascítico de Ehrlich-----	52
Tabela 7	Valores médios de albumina no soro sangüíneo de camundongos tratados com flavonóides por 20 dias com posterior indução do tumor ascítico de Ehrlich ---	53
Tabela 8	Efeito dos flavonóides na prevenção do TAE. Número de células tumorais viáveis presentes no líquido ascítico dos camundongos -----	54
Tabela 9	Efeito dos flavonóides na prevenção do TAE. Número de células tumorais mortas presentes no líquido ascítico dos camundongos -----	55
Tabela 10	Efeito dos flavonóides na prevenção do TAE. Número de células tumorais totais presentes no líquido ascítico dos camundongos -----	57

Tabela 11	Efeito dos flavonóides na prevenção do TAE. Viabilidade celular presente no líquido ascítico dos camundongos -----	59
Tabela 12	Efeito dos flavonóides na prevenção do TAE. Volume do líquido ascítico dos camundongos -----	60
Tabela 13	Atividade preventiva de flavonóides sobre o tempo de vida de camundongos com TAE -----	63
Tabela 14	Valores médios de proteínas totais (g/dL) no soro sanguíneo de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich tratados com flavonóides por 18 dias -----	64
Tabela 15	Valores médios de Aspartato aminotransferase – AST - (U/mL) do soro sanguíneo de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich tratados com flavonóides por 18 dias-----	65
Tabela 16	Valores médios de Alanina aminotransferase – ALT - (U/mL) do soro sanguíneo de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich tratados com flavonóides por 18 dias -----	66
Tabela 17	Valores médios de albumina (g/dL) do soro sanguíneo de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich tratados com diferentes flavonóides por 18 dias -----	68
Tabela 18	Valores médios de proteínas totais (g/dL) do líquido ascítico de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich tratados com diferentes flavonóides por 18 dias -----	69
Tabela 19	Valores médios de aspartato aminotransferase (AST) do líquido ascítico de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich tratados com diferentes flavonóides por 18 dias -----	70
Tabela 20	Valores médios de Alanina aminotransferase – ALT do líquido ascítico de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich tratados com diferentes flavonóides por 18 dias -----	70
Tabela 21	Valores médios de albumina no líquido ascítico de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich tratados com diferentes flavonóides por 18 dias-----	71
Tabela 22	Efeito dos flavonóides no tratamento do TAE. Número de células tumorais viáveis presentes no líquido ascítico dos camundongos-----	72

Tabela 23	Efeito dos flavonóides no tratamento do TAE. Número de células tumorais mortas presentes no líquido ascítico dos camundongos-----	73
Tabela 24	Efeito dos flavonóides no tratamento do TAE. Número de células tumorais totais no líquido ascítico dos camundongos-----	74
Tabela 25	Efeito dos flavonóides no tratamento do TAE. Viabilidade celular no líquido ascítico dos camundongos-----	76
Tabela 26	Efeito dos flavonóides no tratamento do TAE. Volume do líquido ascítico dos camundongos -----	77
Tabela 27	Atividade dos flavonóides e tempo de vida de camundongos com TAE -----	80

LISTA DE ABREVIATURAS

- %ILS- Percentagem de aumento do tempo de sobrevivida
AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALT- Alanina aminotransferase
ANG- Angioprotéínas
AST- Aspartato aminotransferase
ATP- Adenosina trifosfato
CDK 1- Quinase dependente de ciclina 1
CDK 2- Quinase dependente de ciclina 2
CDK 5- Quinase dependente de ciclina 5
CDKs- Quinases dependentes de ciclinas
cNOS- Óxido nítrico sintetase constitutiva
COX 2- Cicloxigenase 2
COX- Ciclogenase
CYPs- Enzimas do citocromo p450
DMBA- 9,10 dimetil -1,2-benzantraceno
DNA- Ácido desoxirribonucléico
ECM- Matriz extracelular
EGCG- Epigalocatequina galato
ERs- Receptores de estrógenos
FAP- Fator ativador plaquetário
FGF- Fator de crescimento de fibroblasto
GADD 45- Growth arrest DNA damage inducible

GST- Glutationa transferase
iNOS- Óxido nítrico sintetase induzida
LDLs- lipoproteínas de baixa densidade
MDM 2- Mouse double minute 2
MDV- Densidade de microvasos
MECB – Extrato metanólico de *Cesalpinia bonducella*.
MHC- Complexo maior de histocompatibilidade
MMPs- Metaloproteína de matriz
MST- Tempo médio de sobrevivência dos animais
NADPH- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO- Óxido nítrico
NSAID- Antiinflamatório não esteroidal
PD-ECGF- Fator crescimento endotelial celular derivado de plaqueta
PDGF- Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE 2- Prostaglandina E2
PGs- Prostaglandinas
PI3 K- Fosfoinositol 3 quinase
PIGF- Fator de crescimento derivado da placenta
PKC- Proteína quinase C
RNS- Espécies reativas de nitrogênio
ROS- Espécies reativas de oxigênio
S1P- Esfingosina 1 fosfato
SGLT 1- Transportador de glicose sódio dependente
TAE- Tumor ascítico de Ehrlich
TGF - Fator de transformação de crescimento beta
TNF - Fator de necrose tumoral alfa
TXA 2- Tromboxano A2
TXs- Tromboxanos
UPF- Fator de permeabilidade vascular
VEGF- Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFr- Receptor de fator de crescimento endotelial vascular
VEGFRs- - Receptores de fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

MACHADO, Hussen, M.S., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2006. **Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Ehrlich “in vivo”**. Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Co-Orientadores: Marcelo José Vilela e Tanus Jorge Nagem.

O presente trabalho avaliou a atividade dos flavonóides rutina e naringina na prevenção e tratamento do tumor ascítico de Ehrlich, com intuito de esclarecer alguns aspectos relacionados à viabilidade celular tumoral, parâmetros sanguíneos e tempo de vida dos animais. Para avaliar o efeito preventivo dos flavonóides sobre o tumor ascítico de Ehrlich, os animais foram tratados, por via oral, com 10mg/kg dos flavonóides por 20 dias. No 21^o dia os animais foram inoculados com $1,66 \times 10^4$ cel/100 μ L em PBS pH 7,4 por via intraperitoneal. Neste mesmo dia foi suspenso o tratamento com o flavonóide. Após 18 dias da inoculação das células tumorais, os animais sofreram eutanásia e os devidos fluídos corporais foram coletados para análises. Para avaliar o efeito de tratamento dos flavonóides sobre o tumor ascítico de Ehrlich, no 1^o dia do experimento os animais foram inoculados com $1,66 \times 10^4$ cel/100 μ L em PBS pH 7,4 por via intraperitoneal. Após 24 horas de inoculação, iniciou-se o tratamento com os flavonóides na dosagem de 10mg/kg; Após 18 dias de tratamento com os flavonóides, os animais sofreram eutanásia e os devidos fluídos foram coletados para análises. Utilizou-se o medicamento Neotaxel[®] como controle positivo. O tempo médio de vida dos animais (MST) e a porcentagem de aumento do tempo de vida (%ILS) foram avaliados durante 40 dias.

ABSTRACT

MACHADO, Hussen, M.S., Universidade Federal de Viçosa, May, 2006. **Effect the flavonoids rutin and naringin on the Ehrlich ascitic tumor “in vivo”**. Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Co-advisers: Marcelo José Vilela and Tanus Jorge Nagem.

The present research is evaluating the flavonoids rutin and naringin effect in the prevention and treatment on the Ehrlich ascitic tumor; with the intention of having a better understanding of the viability of tumor cells, sanguine parameters and animals life. To evaluate the preventive effect of flavonoid on the the Ehrlich ascitic tumor, the animals were medicated, through an oral way, with 10mg/kg of flavonoid for 20 days. In the 21st day the animals were inoculated with $1,66 \times 10^4$ cel/100 μ L in PBS pH 7,4 in an intraperitoneal way. The treatment with flavonoids was interrupted in the same day. After 18 days of the tumor cell inoculation, the animals were submitted to euthanasia and respective corporal fluid was collected for analyze. To evaluate the effect of flavonoid treatment on the the Ehrlich ascitic tumor, in the 1st experimental day the animals were inoculated with $1,66 \times 10^4$ cel/100 μ L in PBS pH 7,4, in a intraperitoneal way. Twenty-four hours after the inoculation the treatment started with the flavonoids in a proportiur of 10mg/kg; Then, 18 days after the use of flavonoids, the animals were submitted to euthanasia and respective corporal fluid was collected for analyze. To have a positive control, Neotaxel[®] was used as a medication. The median survival time of the animals (MST) and the increased percentage of this survival (%ILS) was evaluated a during 30 day period.

1. INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (INCA, 2004)

O câncer está entre as doenças que mais causam mortes no mundo. Segundo dados do INCA (2004), as neoplasias constituem a segunda maior causa de morte no Brasil, precedida somente por doenças cardiovasculares.

Os grandes avanços na área da oncologia experimental e o conhecimento do comportamento da célula tumoral e seus mecanismos de disseminação foram em grande parte resultado do uso de modelos tumorais em animais. Nos estudos da biologia do câncer, questões específicas como viabilidade celular tumoral, volume de líquido ascítico e tempo médio de vida dos animais, somente podem ser respondidas por um modelo experimental adequado. Obviamente que os diversos modelos experimentais não respondem todas as perguntas para os inúmeros sistemas animais e o extenso número de enfermidades do homem. Mesmo assim, os modelos animais são inestimáveis para a elucidação de possíveis respostas do hospedeiro frente ao tumor, além de permitir o estudo das características referentes ao crescimento neoplásico e os possíveis mecanismos de disseminação favorecendo, dessa forma nosso conhecimento a respeito da biologia e terapia da enfermidade neoplásica (RIZZO, 2000).

O tumor de Ehrlich tem a capacidade de crescimento em suspensão no líquido ascítico após sua inoculação na cavidade peritoneal em camundongos. Dos tumores

experimentais utilizados para estudos *in vivo* o tumor de Ehrlich na forma ascítica tem sido um recurso útil principalmente por permitir uma padronização do número de células a serem inoculadas, quantificação do crescimento e regressão da massa tumoral (DAGLI, 1989).

A literatura indica que muitos produtos naturais são estudados como agentes quimioprotetores contra cânceres de ocorrência mundial (REDDY, 2003). Estudos epidemiológicos sugerem a relação inversa entre risco de câncer e consumo de vegetais, frutas, cereais e grãos de uma maneira geral, fibras dietética, certos micronutrientes, certos tipos de gordura (ácidos graxos ω -3) e também hábitos de vida, como prática de atividade física (GREENWALD, 2001).

Um grande número de flavonóides e isoflavonóides (BIRT, 2001) têm sido pesquisados por suprimir a carcinogênese em vários modelos animais (RASHMI, 2003). Existe um considerável interesse nesses compostos que exercem efeitos benéficos em mecanismos que envolvem a patogênese do câncer. Em recentes anos, uma considerável atenção tem sido dada a habilidade desses compostos em inibir o ciclo celular, a proliferação celular, o estresse oxidativo e na indução da detoxificação de enzimas, apoptose e no sistema imune (BIRT, 2001).

No presente trabalho avaliou-se o efeito dos flavonóides rutina, naringina e do quimioterápico Neotaxel® na prevenção e no tratamento do tumor ascítico de Ehrlich *in vivo*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito dos flavonóides rutina, naringina na prevenção e no tratamento de camundongos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade preventiva dos flavonóides rutina e naringina no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos.
- Avaliar a atividade dos flavonóides rutina e naringina no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos.
- Verificar alterações histológicas no fígado dos camundongos com TAE tratados com os flavonóides rutina e naringina.
- Comparar o efeito do quimioterápico Neotaxel[®] com os flavonóides rutina e naringina no tratamento de camundongos com TAE.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. CÂNCER

A palavra câncer é derivada do latim e significa caranguejo. Este nome foi dado a essa doença devido à semelhança com que este crustáceo se adere firmemente a sua presa, assim como o tumor se adere ao local do corpo onde se desenvolve (BOLD et al., 1997).

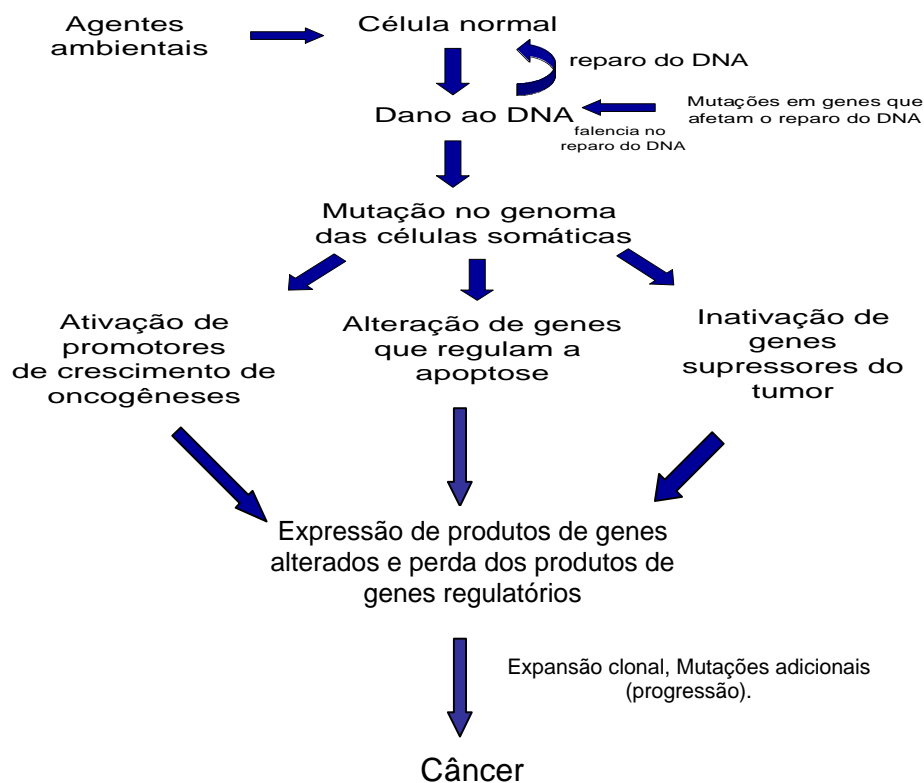
Provavelmente, o mais antigo reconhecimento da ocorrência de câncer em seres humanos refere-se à descrição encontrada em papiros do antigo Egito, datados de 1500 a.C, referentes a úlceras cutâneas resistentes a tratamentos. Ao longo dos anos, marcos importantes no estudo do câncer puderam ser registrados, como a classificação de Galeno, no ano de 150 de nossa era, que incluía os hoje conhecidos tumores benignos e malignos como fenômenos “contrários à natureza” (DAGLI, 1989).

O câncer pode ser genericamente definido como *tumor* ou *neoplasma*. *Neoplasma* (do grego *neos*: novo, e *plasma*: algo formado) significa "novo crescimento" (HARNDEN & MCGEE, 1992). Segundo Ruppert Willis, citado por (BAAK, 2003), neoplasia é “uma massa anormal de tecido cujo crescimento excede e não está coordenada ao crescimento dos tecidos normais e que persiste mesmo cessada a causa que a provocou”.

As neoplasias são classificadas de acordo com a origem embrionária dos tecidos dos quais são derivados: os *carcinomas* são originários de células epiteliais, derivadas de qualquer uma das três camadas germinativas (ectodérmica, mesodérmica e endodérmica). Logo, os carcinomas com padrão microscópico de crescimento glandular são definidos como *adenocarcinomas*. Os sarcomas são derivados de tecido mesenquimatoso como osso, cartilagem e gordura. Os *linfomas* são neoplasias originárias de tecido linfóide, enquanto que as leucemias são de células hematopoéticas de origem medular (COTRAN et al., 2000).

A carcinogênese pode ser compreendida como um processo complexo no qual se encontram envolvidos muitos genes, particularmente os que regulam a estabilidade e o reparo do DNA, crescimento celular, imunidade e quimio-resistência às drogas (JÚNIOR, 2002). A vida da célula normalmente necessita da expressão equilibrada dos genes *proliferativos* que favorecem o desencadeamento da divisão celular e da diferenciação celular; e dos genes *antiproliferativos* (supressores de tumores) os quais, inibem o ciclo celular ou induzem a morte celular programada (apoptose). Sendo assim, o câncer é decorrente das transformações celulares que promovem a ruptura do equilíbrio fisiológico (MADELAINÉ, 2005). A figura 1 demonstra alguns dos passos da indução carcinogênica:

Figura 1 – Os múltiplos passos da carcinogênese.

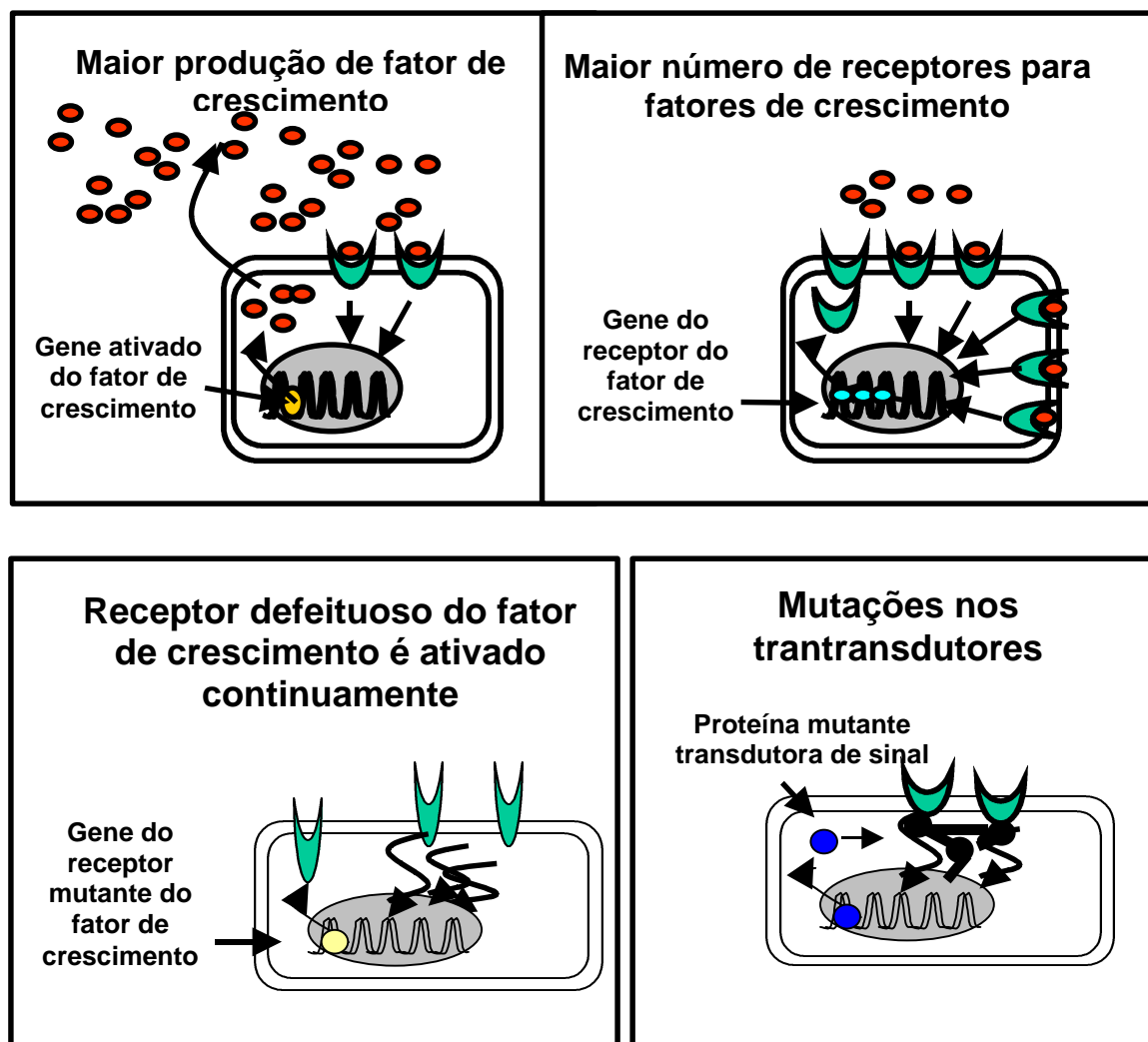


Fonte: Robbins, 2005.

Uma das causas relacionadas ao desenvolvimento neoplásico é o funcionamento inadequado de genes reguladores da proliferação celular. Em condições normais, o crescimento celular é controlado por duas classes de genes os proto-oncogenes e os genes supressores que codificam proteínas capazes de regular o crescimento celular, evitando o comportamento maligno das células (ALBERTS et al., 1997).

Os proto-oncogenes são genes celulares que promovem o crescimento e diferenciação normal da célula. Estes genes quando mutados tomam-se amplificados no número de cópias e funcionam como promotores da expansão clonal da célula tumoral, passando a ser denominados de oncogenes. Nestas condições, as onco-proteínas codificadas por estes genes são responsáveis pela proliferação anormal das células que uma vez desreguladas, superam a parada do ciclo celular no ponto R, onde seria feita a checagem do DNA. Assim, se houver dano ao genoma, não haverá tempo suficiente para sua reparação, tampouco haverá tempo para a célula danificada entrar no processo de apoptose. Deste modo, as alterações do genoma serão herdadas pelo clone celular após a divisão, perpetuando os danos no DNA (NERY, 2004). A figura 2 representa alguns dos mecanismos utilizados pelos oncogenes para promover o crescimento celular.

Figura 2 - Mecanismos pelo qual um oncogene pode promover o crescimento celular



Fonte: Robbins,2005

A mais importante contribuição para o aparecimento do câncer é o dano ao DNA. As mutações ocorrem em proto-oncogênes, que são normalmente expressos durante o desenvolvimento embrionário e também em células maduras, e em genes supressores tumorais, geralmente por perda de função e inativação de alelos (ALBERTS et al., 1997; BROOKS et al, 2000; JORD et al, 2000). Sabe-se que para ocorrer a transformação maligna de células em cultura requerem-se duas ou mais alterações de oncogenes e freqüentemente são necessárias quatro a seis diferentes genes alterados para o crescimento tumoral (ZORNIG et al., 2001).

Células do corpo que se dividem rapidamente são mais susceptíveis a carcinogênese devido a menor oportunidade do DNA ser reparado antes da divisão celular (REDDY, 2003). Uma célula anormal que não prolifere mais do que suas vizinhas normais não provoca danos significativos, mas se sua proliferação está fora de controle irá originar um tumor ou neoplasma, ou seja, um crescimento incansável de uma massa de células anormais (ALBERTS, 1997). A resistência à apoptose fisiológica é uma das características fundamentais da célula cancerosa (MEDELAINÉ, 2005).

Vários outros fatores favorecem o aparecimento do câncer: influências ambientais, como agentes físicos (raio ultravioleta, radiação ionizante), químicos (aflatoxinas) e biológicos (vírus); e também as influências culturais (alimentação, estresse, tabagismo), raciais (possivelmente genéticos), e principalmente fatores como a idade e a hereditariedade que podem culminar em sucessivas mutações contribuindo para o aparecimento de diversas neoplasias (COTRAN et al., 2000; MADELAINE, 2005).

A dieta possui uma grande contribuição na etiologia e prevenção do câncer (GREENWALD, 2001). A literatura reconhece que os fatores dietéticos representam cerca de 30% das causas de câncer (PADILHA, 2004) e no caso de câncer de cólon, essa porcentagem sobe para 80%. Quando se adiciona consumo de álcool e cigarro à dieta, ocorre um aumento para 60%. Predisposição genética ao câncer está associada a 20% dos casos. Os carcinógenos ambientais incluem poluição do ar e água, radiação e medicamentos (REDDY, 2003).

Segundo Kroeff (2004) em 35 anos de trabalho experimental sobre câncer em animais de laboratório, a humanidade aprendeu muito mais do que em todos os séculos de empirismo, transcorridos.

3.1.1. INVASÃO E METÁSTASE

Segundo Alberts (1997) a capacidade de invasão geralmente implica na habilidade das células tumorais em escapar, entrar na corrente sanguínea e/ou vasos linfáticos e formar tumores secundários ou metástases em outros locais do corpo. Quanto mais metástases um câncer for capaz de produzir, mais difícil a sua erradicação.

A medida que células neoplásicas permanecem agrupadas numa massa única, o tumor é dito benigno e a cura completa pode ser obtida pela remoção da massa cirurgicamente. Um tumor é considerado como câncer somente se for maligno, se as células tiverem o poder de invadir tecidos vizinhos. Geralmente, o sufixo -oma é empregado para designar os tumores benignos, assim fibroma é um tumor benigno que surge de células fibroblásticas, condroma um tumor cartilaginoso e osteoma, um tumor de osteoblastos (ALBERTS, 1997).

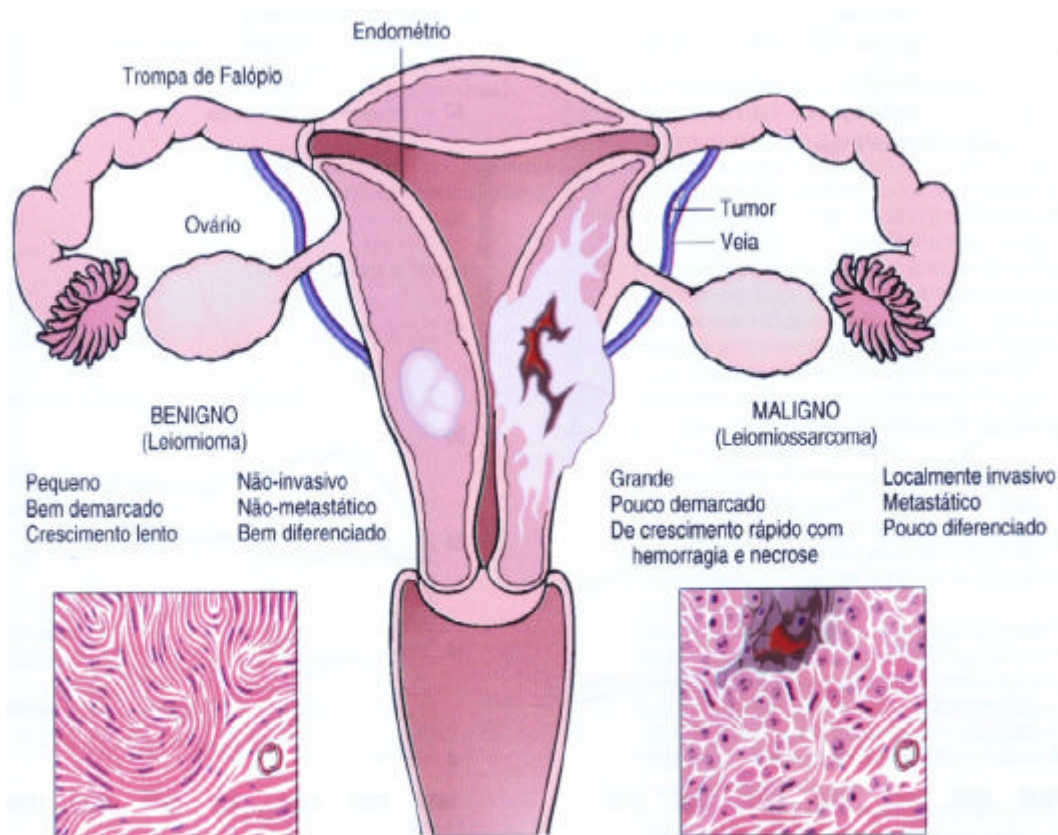
As características que diferenciam neoplasias benignas e malignas podem convenientemente ser discutidas sob quatro aspectos: (a) diferenciação e anaplasia; (b) taxa de crescimento; (c) invasão local; (d) metástase.

Diferenciação e anaplasia: Diferenciação refere-se ao grau de semelhança entre as células neoplásicas e as células normais comparáveis tanto morfológica quanto funcionalmente. Em geral, os tumores benignos são bem diferenciados. Os neoplasmas malignos compostos de células indiferenciadas são ditos anaplásicos, pois, literalmente no sentido da palavra, “regridem”, indicando uma reversão de um alto nível de diferenciação para um nível inferior. A falta de diferenciação ou anaplasia é marcada por várias alterações morfológicas e funcionais como pleomorfismo (variação de tamanho e forma tanto das células como dos núcleos), os núcleos apresentam uma abundância de DNA e são normalmente escuros (hipercromáticos). A forma nuclear é geralmente muito variável, e a cromatina freqüentemente está aglomerada e distribuída ao longo da membrana nuclear. Grandes nucléolos geralmente estão presentes nestes núcleos. Os tumores indiferenciados em geral possuem um grande número de mitoses, refletindo a maior atividade proliferativa das células parenquimatosas.

Taxa de crescimento: Em geral a maioria dos tumores benignos cresce lentamente durante um período de anos, enquanto a maioria dos cânceres cresce rapidamente, às vezes a uma velocidade errática, eventualmente se espalhando e matando seus hospedeiros.

Invasão local: A maioria dos tumores benignos cresce como massas coesivas em expansão, permanecendo situadas em seu local de origem, sem a capacidade de se infiltrarem, invadirem ou metastatizarem para locais distantes, como ocorre nos tumores malignos, nos quais o crescimento é acompanhado de infiltração progressiva, invasão e destruição do tecido vizinho (Figura 3).

Figura 3 – Comparação entre tumor benigno do miotério (leiomioma) e tumor maligno de origem semelhante (leiomiossarcoma).



Fonte: COTRAN, 2000.

Metástase: O termo "metástase" vem do Grego (meta = além; stasis = parar) sendo originalmente empregado no contexto da Teoria Fisiológica Humoral vigente 400-500 anos a.C., segundo a qual, o equilíbrio da homeostase corporal era dado pelo perfeito balanceamento entre os quatro humores orgânicos: sangue, bile amarela, bile negra e fleuma. Esta teoria fisiopatológica foi criada em analogia à Teoria dos "Quatro Elementos", sendo documentada por Hipócrates e posteriormente traduzida por Galeno

no século II d.C., passando então à Escola Escolástica de Medicina da Idade Média (MEOHAS, 2005)

Segundo a “Teoria Fisiológica Humoral”, o organismo cozinhava o excesso ou o eliminava através dos dejetos orgânicos. Caso o material não fosse completamente cozido ou eliminado, era depositado ("apostasis") ou mandado para outra parte do corpo ("metástases"). Acreditava-se que o acúmulo de bile negra era responsável pelo surgimento dos tumores e que as metástases eram depósitos desta bile transportados para outra parte do organismo. Estes conceitos influenciaram o meio científico até o século XIX, quando importantes descobertas delinearam um novo panorama no campo da oncologia (MEOHAS, 2005)

O termo "metástase" foi introduzido por Récamier. Entretanto, coube a Thiersch (1822-1895) e Waldeyer (1865-1921) a estrutura das bases da Teoria Mecanicista que ganhou espaço a partir do século XIX através da comprovação morfológica de êmbolos metastáticos de células epiteliais em vasos linfáticos e linfonodos. De acordo com esta teoria, plenamente aceita no final do século XIX, as células tumorais seriam distribuídas via vasos sanguíneos e linfáticos, formando colônias tumorais no local onde fossem depositadas (BROWN, 2001).

Dentre um dos primeiros estudos experimentais sobre metástases Takahashi (1915), citado por Dagli (1989), descreveu a existência das vias linfática e hematogena de disseminação das neoplasias, aceitando a hipótese do transporte de êmbolos tumorais. O mesmo autor afirmou constituir-se de duas fases o processo metastático, seja de tumor espontâneo ou transplantável: uma fase inicial, na qual as células tumorais penetram pelo endotélio vascular, e uma segunda fase, na qual os êmbolos, após transporte vascular mecânico, estabelecem união com a parede vascular dos órgãos-alvo e penetram pelo endotélio. É importante ressaltar, que o processo de entrada da célula tumoral no componente vascular pode ocorrer de forma passiva, pelos vasos neoformados que irrigam a massa tumoral, ou de forma ativa, atravessando o endotélio e a membrana basal (BRENTANI et al, 1988).

Sabe-se, atualmente, que as células tumorais passam por várias fases antes de estabelecerem focos metastáticos. Após o crescimento e a vascularização do tumor original elas devem, inicialmente, separar-se da massa tumoral, invadir localmente a matriz tecidual adjacente, adentrar a parede de vasos sanguíneos ou linfáticos, sobreviver na circulação sanguínea ou linfática, ligar-se ao endotélio capilar do tecido em que se estabelecerão, iniciar agregação plaquetária, atravessar a parede capilar,

invadir o tecido local, e então proliferar. A metástase é, portanto, o resultado final de várias etapas interdependentes, um processo multifacetado que inclui uma complexa interação entre o tumor e organismo hospedeiro, uma seqüência de eventos que ainda hoje não está completamente esclarecida (BROWN, 2001).

Em geral, as localizações anatômicas de tumores primários diferem do sitio inicial de metástase. As células neoplásicas que sobrevivem, multiplicam-se e extravasam para o parênquima dos órgãos formando novos focos tumorais (RIZZO, 2000). Alterações genéticas influenciam a adesividade celular, favorecendo o desprendimento das células do tumor primário, além da neovascularização, que não só serve para manter as necessidades metabólicas inerentes ao desenvolvimento do tumor, como também para prover uma rota de "fuga" pela qual as células neoplásicas podem deixar o tumor primário (TANAKA et al., 2002) e adentrar o sistema linfático ou circulatório, caracterizando a disseminação linfática e hematogênica, respectivamente (CNAMBERS et al., 2002).

Aventa-se a possibilidade de que a pressão exercida pelo tumor seja um mecanismo passivo de que se valem as células tumorais para invadirem tecidos adjacentes. Isso pode ocorrer devido a mecanismos enzimáticos, alterações no citoesqueleto celular, diminuição do número de junções intercelulares ou a um decréscimo na biossíntese de componentes da matriz extra-celular (DAGLI, 1989). Outro fator importante para a circulação de células neoplásicas dentro do organismo é a atividade do citoesqueleto, particularmente a formação, desintegração, contração e relaxamento de feixes de filamentos de actina; associados a eles, existem diferentes proteínas que na maioria das vezes são reguladas diretamente por concentrações de Ca^{+2} ou indiretamente via calmodulina (ROOS, 1984).

Iwasaki (1915) citado por Dagle (1989), considerou que as células tumorais, apesar de serem originárias do próprio organismo, são tratadas como corpos estranhos na corrente sanguínea. Este autor realizou estudo histológico de neoplasias em seres humanos e, experimentalmente, inoculou células tumorais em ratos e camundongos pela veia femoral. Observando histologicamente a presença de êmbolos tumorais em vasos, e em muitos casos a ausência de formações metastáticas, Iwasaki concluiu haver destruição de células tumorais na corrente sanguínea.

Sabe-se, por exemplo, que após injeção intravenosa experimental de células tumorais, apenas 0,01% destas irão conseguir formar um foco tumoral. Essa baixa percentagem deve-se às várias etapas interdependentes que compõem a complexa

cascata de eventos necessários ao estabelecimento do implante secundário (BROWN, 2001). Tumores histologicamente comparáveis podem ter potencial metastático extremamente divergente, dependendo do genótipo e influências ambientais locais. O potencial metastático é influenciado pelo micro-ambiente local, angiogênese, interações tumor-estroma, elaboração de citocinas pelo tecido local, e mais significativamente por seu genótipo molecular (LIOTTA & KOHW, 2000).

As metástases são os aspectos mais insidiosos e ameaçadores do câncer, sendo a principal causa de morbidade, mortalidade e de falhas em tratamento de pacientes com neoplasias, uma vez que a cada dez mortes pela doença nove são resultados de metástases (GIBBS, 2003). Cerca de 30% dos pacientes com diagnóstico de tumores malignos sólidos (com exceção do câncer de pele não-melanoma) desenvolve metástases, fato que reduz acentuadamente a possibilidade de cura (COTRAN et al., 2000).

3.2. TUMOR DE EHRLICH

Dos inúmeros tumores experimentais utilizados para estudo *in vivo* em animais, o uso de tumores transplantáveis na forma ascítica tem sido um recurso útil pelas seguintes razões: facilidade na padronização do número de células a serem inoculadas; quantificação do crescimento e regressão da massa tumoral e também porque permitem o estudo comparativo com os mesmos métodos desenvolvidos para a pesquisa de células na corrente sanguínea e demais fluidos corporais (DAGLI et al., 1989; SAAD-HOSSNE et al., 2004).

Historicamente, os primeiros relatos de transplante de neoplasias datam de 1773 quando PEYRILHE inoculou material extraído de neoplasias mamárias humanas sob a pele de cães. De modo geral, quer para os estudos básicos de biologia tumoral, quer para a investigação de novas modalidades terapêuticas (cirúrgica, medicamentosa, radioterápica) dispõem-se hoje de uma variedade de tumores experimentais, já catalogados (SAAD-HOSSNE, 2002).

O tumor de Ehrlich foi introduzido por Paul Ehrlich em 1886 e descrito em 1906 como um carcinoma mamário de camundongos fêmeas (DAGLI, 1989; RIZZO, 2000). Devido a suas características e facilidade de manuseio experimental, o tumor de Ehrlich

tem sido extensamente aplicado para a chamada Oncologia Experimental (DAWE, 1982).

Inicialmente, o tumor de Ehrlich foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. Somente em 1932, com Loewenthal & Jahn, é que surgiu a forma ascítica, ou seja, aquela desenvolvida no peritônio de animais inoculados com células tumorais (DAGLI, 1989).

O termo ascite (do grego *askites*, que significa bexiga, barriga ou bolsa) é definido como sendo o acúmulo de líquido na cavidade peritoneal. Esta patologia ocorre devido a um aumento da pressão venosa, a qual se estende aos capilares do peritônio causando a transudação de líquido para o abdômen ou quando aumenta a pressão nos sinusóides hepáticos (de 5 a 10 mm de Hg) podendo haver a transudação pela própria superfície do fígado. Uma terceira causa de ascite pode ser a diminuição da pressão coloidosmótica do plasma. Muitas vezes as três causas podem estar envolvidas (HAUSBERGER et al., 2001).

O tumor de Ehrlich tem a capacidade de crescimento em suspensão no líquido ascítico e em tecido celular subcutâneo e após a sua implantação na cavidade peritoneal em camundongos saudáveis tem como resultado a formação de líquido ascítico tumoral (DAGLI, 1989; SAAD-HOSSNE, 2004). Estima-se que 10% de todos os casos de ascite em humanos, são de origem neoplásica, sendo a maioria destas provenientes de tumores gastrointestinais e ovarianos (SAAD-HOSSNE et al., 2004). Várias doenças estão associadas à ascite, dentre elas a carcinomatose peritoneal que é responsável por causar uma exsudação de fluido proteináceo das células tumorais, fazendo com que o líquido extracelular entre na cavidade peritoneal para restabelecer o balanço osmótico. Em metástases maciças no fígado e no carcinoma hepatocelular, ocorre hipertensão portal secundária, desencadeando um mecanismo semelhante ao da cirrose, que ocasiona aumento dos níveis de óxido nítrico, causando uma vasodilatação que simula um decréscimo no volume arterial efetivo e possivelmente, leva ao aumento do hormônio retentor de sódio, diminuindo a filtração renal. A ascite quilosa, secundária ao linfoma maligno, aparece como consequência da obstrução dos linfonodos pelo tumor e pela ruptura dos vasos linfáticos (HAUSBERGER et al., 2001).

Histologicamente, o tumor sólido de Ehrlich apresenta extensas áreas de necrose, oriundas da morte das células neoplásicas, a qual é bastante intensa já na primeira semana pós-inoculação. Intensa atipia e células extremamente anaplásicas são também comumente vistas no tumor. O tumor possui poucas células inflamatórias e

estroma escasso. Alto índice mitótico e de invasividade caracterizam essa neoplasia (GABAI et al., 1995; DAGLI, 1989). Quando observado em maior aumento ao microscópio de luz, é evidente a presença de células epiteliais neoplásicas arranjadas concentricamente a um foco de necrose do tipo coagulativa. Essas células exibem intenso pleomorfismo, hipercromatismo nuclear e alteração da relação núcleo citoplasma. Observaram-se também células multinucleadas com núcleos, muitas vezes, gigantes, evidenciando ainda mais intensa atipia nuclear, com citoplasma bastante amplo. O estroma é bastante escasso, com pouca vascularização (OLIVEIRA et al., 2003).

Segundo Dagli (2002), o exame histoquímico de uma gota de líquido ascítico do tumor de Ehrlich revela células pleomórficas, com diâmetros 2 a 3 vezes superiores as das hemácias do camundongo, que contêm numerosas gotículas de tamanho variável com material birrefringente em seu interior. Essas gotículas são lipídeos, os quais estão presentes devido a um processo degenerativo que leva ao acúmulo lipídico no interior da célula ou a uma desregulação genômica que provoca a intensificação da produção de lipídios pelas células.

O tumor ascítico de Ehrlich pode ser transplantado para qualquer linhagem de camundongo, provavelmente devido à perda da expressão do MHC. Esta característica exclui o principal papel do linfócito T citotóxico durante o desenvolvimento do tumor, indicando que talvez a imunidade celular não seja o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra o tumor ascítico de Ehrlich (BERGAMI-SANTOS et al., 2004). Segundo Sugiura (1965), citado por Gentile (2001), não há ocorrência de metástases no coração, rins, adrenais, fígado ou baço. Além disso, é sabido que as células do tumor de Ehrlich podem ser inoculadas por via intravenosa sendo de grande utilidade nos estudos sobre migração de células e desenvolvimento de metástases, visto que, na forma sólida, não há ocorrência de crescimento secundário (RIZZO, 2000). Dentre outros modelos, o tumor ascítico de Ehrlich é utilizado para auxiliar na investigação de novas modalidades terapêuticas em biologia tumoral (SAAD-HOSSNE, 2002), e principalmente na fisiopatologia do câncer e das metástases.

3.3. FLAVONÓIDES E CÂNCER

O câncer é um dos mais antigos males da humanidade Djuric e colaboradores (2001) estimaram, para o ano de 2000, que o número de novos casos de câncer no mundo seria mais de 10 milhões, dentre os quais, 53% dos casos ocorreriam nos países em desenvolvimento. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (2004), no Brasil, as estimativas para o ano de 2005 apontavam para a ocorrência de mais de 467.440 novos casos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção de pele não melanoma, serão os de próstata e pulmão no sexo masculino e mama e colo do útero para o sexo feminino, acompanhando a mesma magnitude observada no mundo.

Das 520 drogas aprovadas entre 1983 e 1994, 39% eram derivadas de produtos naturais das quais, 60% eram antibióticos e anticarcinogênicos (CRAGG, 1997). Entre esses produtos naturais encontram-se os “alimentos funcionais”, que nas últimas décadas tornaram-se apreciados por profissionais da área de saúde e pelo público em geral devido a seus benefícios à saúde. Segundo Lander (2001) a sociedade não deveria negligenciar o poder dos compostos naturais no tratamento das doenças humanas.

Segundo Yang et al., (2001) vários flavonóides têm demonstrado suprimir a carcinogênese em modelos animais. Há relatos interessantes considerando que os flavonóides exercem um efeito benéfico em vários mecanismos que envolvem a patogenia do câncer.

Os flavonóides representam um grande grupo de fitoquímicos que são conhecidos por exercerem uma atividade anti-tumoral. Assim, estudos investigativos têm demonstrado que os possíveis mecanismos de inibição da carcinogênese por polifenóis estejam relacionados com o aumento da expressão de superóxido dismutase (MANSON, 2003), inibição da cicloxigenase e lipoxigenase (HONG, 2001; SAKATA, 2003), indução de apoptose e repressão do ciclo celular, como demonstrado em células carcinogênicas humanas *in vitro* (MANSON, 2003).

Os flavonóides vêm sendo extensivamente pesquisados como protetores das células contra danos de raios-X, bloqueando a progressão do ciclo celular e a síntese de prostaglandinas e inibindo mutações em experimentos animais (REDDY, 2003). Quercetina, luteolina e genistéina têm mostrado capacidade de inibir o dano oxidativo do DNA induzido por irradiação ultravioleta (WEISS, 2003). Reddy (2003) relata que a propriedade antioxidante dos flavonóides faz com que eles tenham a propriedade de inibir vários tipos de câncer.

Existem diferentes “mecanismos de ação” desempenhados pelos flavonóides como agentes anti-mutagênicos. Certos flavonóides podem influenciar diretamente a atividade enzimática envolvida no reparo do DNA e/ou modular expressão de genes (FERGUSON, 2001). De acordo com Marchand (2002), os flavonóides afetam a progressão do ciclo celular. O flavonóide quercetina bloqueou o ciclo celular na fase G1/S de células cancerosas de cólon e gástrica. Já em linhagens de células de mama e laringe esse flavonóide mostrou bloquear a fase G2/M do ciclo celular (FORMICA, 1995). O metabolismo rápido da quercetina forma o metabólito metilado isorhamnetina, que possui efeito no retardamento das fases G0-G1 do ciclo celular em baixas concentrações em linhagens de células HepG2 (hepatocarcinoma).

A isorhamnetina e o flavonóide miricetina, em diferentes concentrações, afetaram diferentes enzimas envolvidas na transdução de sinais, dessa forma interromperam o ciclo celular em estágios específicos (RUSAK, 2005). Alguns flavonóides como apigenina, luteolina e quercetina induzem a apoptose por mecanismos dependentes do gene p-53. A proteína p-53 funcional apresenta meia vida curta (10 a 20 minutos) e atua na regulação do ciclo celular, reparo de DNA e, dependendo da extensão da lesão, indução da apoptose das células geneticamente instáveis, mantendo desta forma a integridade do genoma (JUNIOR, 2002; SCHUTZ, 2003).

Evidências *in vitro* mostraram que a quercetina pode inibir a proliferação celular através do bloqueio da atividade da ornitina carboxilase e da incorporação da timidina ao DNA além de, modular a apoptose em cultura de células. Resultados mostraram ainda que a quercetina inibiu tanto a mitose quanto a apoptose em cultura de células glomerulares. O mecanismo molecular envolvido no efeito anti-mitótico e anti-apoptótico da quercetina são largamente obscuros, mas investigações sugerem que os flavonóides inibem a tirosina quinase e MAP quinase podendo ser estes os possíveis alvos farmacológicos (MARCHAND, 2002).

As proteínas quinases regulam e controlam muitas atividades fisiológicas, conseqüentemente interferem nas enzimas que estão associadas ao crescimento tumoral. Flavonóides podem inibir a promoção do tumor através de efeitos inibitórios na fosforilase C e proteína quinase. A atividade da proteína tirosina quinase foi inibida pelo flavonóide quercetina em tumores mamários de ratos induzidos pelo (DMBA) 9,10 dimetil -1,2-benzantraceno (FORMICA, 1995). Segundo Williams (2004), diversos flavonóides como epicatequina, epicatequina galato, epigallocatequina galato (EGCG) e quercetina vêm sendo pesquisados como citoprotetores nas rotas de sinalização do ciclo

celular. Uma ação citoprotetora importante desses compostos está envolvida na inibição da caspase-3 e ativação de proteínas MAP quinases que são pró-apoptóticas.

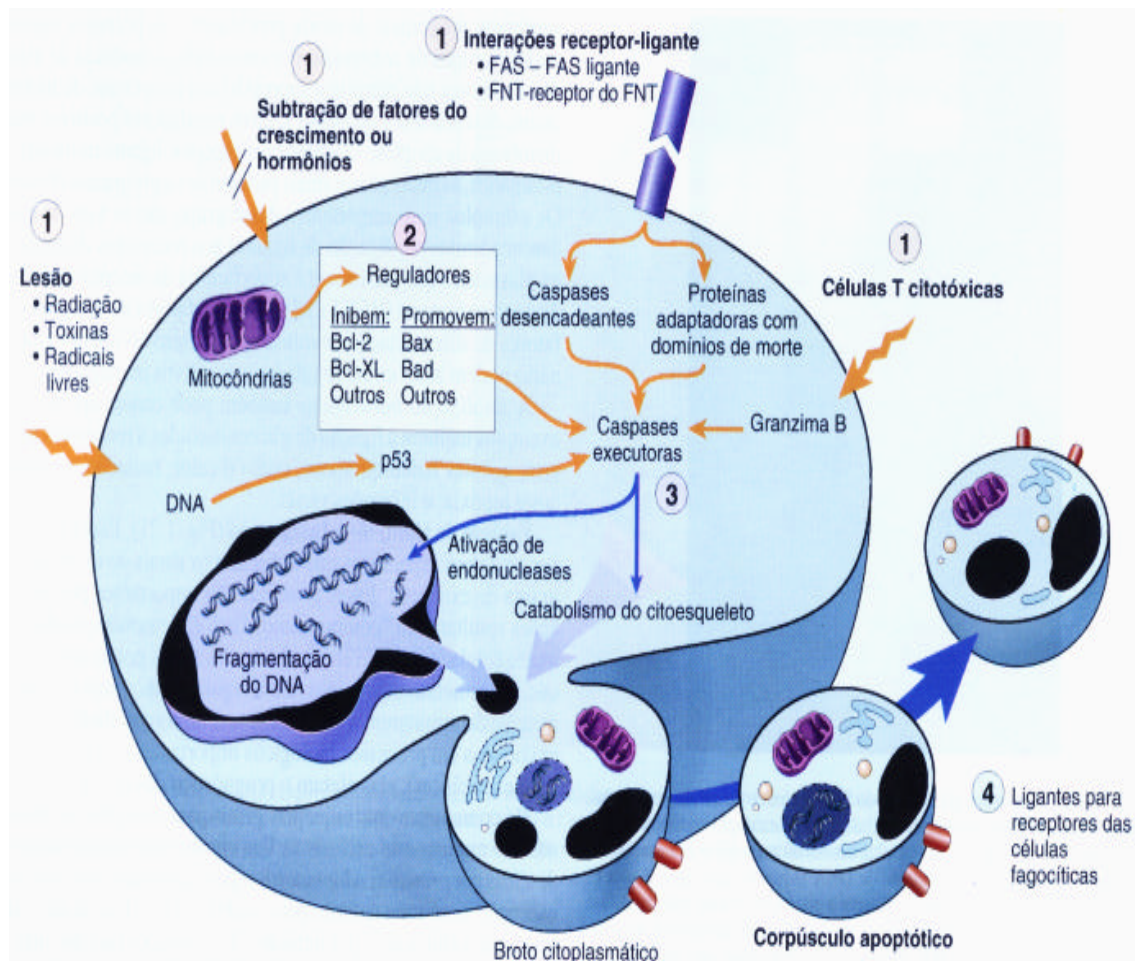
Os efeitos celulares dos flavonóides são dependentes da associação deles com as células, pela interação com a membrana ou pela entrada deles no citosol. Flavonóides possuem a capacidade de se ligar aos sítios de ligação do ATP de um grande número de proteínas, incluindo ATPase mitocondrial, cálcio plasma membrana ATPase, proteína quinase A, proteína quinase C e topoisomerase. Os flavonóides hesperidina e naringenina têm sido pesquisados por possuírem a atividade inibitória de numerosas proteínas quinases. Essa inibição é mediada via ligação dos flavonóides ao sítio de ligação do ATP, presumivelmente por causar trocas na estrutura tridimensional das quinases levando à sua inatividade. Flavonóides também podem interagir com a mitocôndria, interferindo em passos do metabolismo intermediário e/ou baixa regulação da expressão de adesão de moléculas. Quercetina, um flavonol, expressa efeitos antiproliferativos e induz a morte celular de células tumorais predominantemente por mecanismos apoptóticos em diversas linhagens de células cancerosas. Os flavonóides induzem a ativação da caspase-3, caspase-9 em linhagens de células malignas (WILLIAMS, 2004).

Flavonóides possuem atividade anti-tumoral, causando inativação do carcinógeno, paralisação do ciclo celular, indução da apoptose e inibição da angiogênese. A figura 4 representa esquematicamente os eventos apoptóticos, onde 1 assinala os múltiplos estímulos da apoptose. Estes incluem ligantes de morte específicos (fator de necrose tumoral – FNT), subtração de fatores de crescimento ou hormônios e agentes nocivos (radiação). Alguns estímulos (como células citotóxicas) ativam diretamente as caspases executoras. O controle e regulação são influenciados por membros da família Bcl-2 de proteínas, que podem inibir ou promover a morte celular. As caspases executoras ativam endonucleases citoplasmáticas latentes e proteases que degradam proteínas do citoesqueleto e núcleo. Isso resulta em uma cascata de degradação intracelular, incluindo fragmentação da cromatina nuclear e ruptura do citoesqueleto. Resultado final é a formação de corpúsculos apoptóticos que contêm várias organelas intracelulares e outros componentes do citosol; esses corpúsculos também expressam novos ligantes para ligação e captação por células fagocíticas (CHEVET, 2001).

A naringenina (flavonóide) causa citotoxicidade e apoptose via indução da atividade de caspase-3/CPP32, mas não da atividade da caspase-1, em linhagens de

células humanas promielo leucêmicas (HL-60). Esses achados sugerem que a naringenina pode inibir o crescimento tumoral. Agentes com habilidade de induzir apoptose em tumores têm sido usados na terapia anti-tumoral. Flavonóides produzem diferentes efeitos biológicos e a atividade deles em induzir apoptose tem sido identificada em muitos estudos. Estudos *in vivo*, mostram o efeito da naringenina em inibir o crescimento do tumor em camundongos induzidos com sarcoma S-180. A ação sobre as caspases é importante porque a morte celular por apoptose é seguida pela ativação de proteínas efetivas chamadas caspases, que participam de cascatas enzimáticas que terminarão na desmontagem celular (SCHULTZ, 2003).

Figura 4 – Representação esquemática dos múltiplos eventos apoptóticos.



Fonte: COTRAN, 2000

Porém, ainda, muitas questões precisam ser esclarecidas, incluindo exatamente como específicos fatores dietéticos estão relacionados na prevenção do câncer. Estudos epidemiológicos, embasados em dados *in vivo* e *in vitro* têm contribuído imensamente para ajudar elucidar a ligação existente entre dieta e prevenção de câncer

(GREENWALD, 2001). Razões tiveram Ewing e Greenough em dizer: "O diagnóstico e o tratamento do câncer já deixou de ser trabalho de um só homem – *no longer one man job*". Enunciaram uma verdade (KROEFF, 2004).

3.3.1. FLAVONÓIDES

Em 1930 uma nova substância química foi isolada de laranjas e acreditava-se tratar de mais um novo membro da família das vitaminas e essa substância foi designada como vitamina P. Quando estudos demonstraram tratar-se de um flavonóide, a Rutina, uma agitação na pesquisa formou-se na tentativa do isolamento deste e de vários outros flavonóides (NIJVELDT et al., 2001). Sendo assim, desde que foi identificada, a natureza química dos flavonóides vem sendo estudada extensivamente (WOO, 2005).

Polifenóis, especialmente os flavonóides, são metabólitos secundários de plantas biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides (SIMÕES et al., 2000) e definidos quimicamente como substâncias compostas por um núcleo comum de fenilcromanona ($C_6-C_3-C_6$) com substituição em uma ou mais hidroxilas, incluindo derivados ligados a açúcares (BIRT, 2001).

A estrutura dos flavonóides está baseada no núcleo flavilium, o qual consiste de três anéis fenólicos. O benzeno do primeiro anel é condensado com o sexto carbono do terceiro anel, que na posição 2 carrega um grupo fenila como substituinte. O terceiro anel pode ser um pirano heterocíclico, gerando as estruturas básicas das leucoantocianinas (ou pró-antocianinas ou catequinas) e as antocianidinas, denominado de núcleo flavana. Devido ao fato do terceiro anel apresentar-se como uma pirona, ocorre a formação das flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalconas e auronas, recebendo a denominação de núcleo 4-oxo-flavonóide (AHERNE & O'BRIEN, 2002).

As atividades bioquímicas dos flavonóides e de seus metabólitos dependem de sua estrutura química, que podem variar com substituições incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações. Flavonóides e Isoflavonóides ocorrem comumente como ésteres, éteres ou derivados glicosídicos ou ainda uma mistura deles (BIRT, 2001). Exceto o grupo das leucoantocianinas, os demais flavonóides ocorrem em plantas sempre acompanhados por glicídios recebendo assim, a denominação de glico-flavonóide ou flavonóides glicosilados (DEGÁSPARI, 2004). As substituições glicídicas incluem D-glicose, L-rhamnose, glicorhamnose,

galactose, lignina e arabinose (BIRT, 2001). Quando se apresentam isentos de glicídios, a estrutura recebe o nome de aglicona (DEGÁSPARI, 2004).

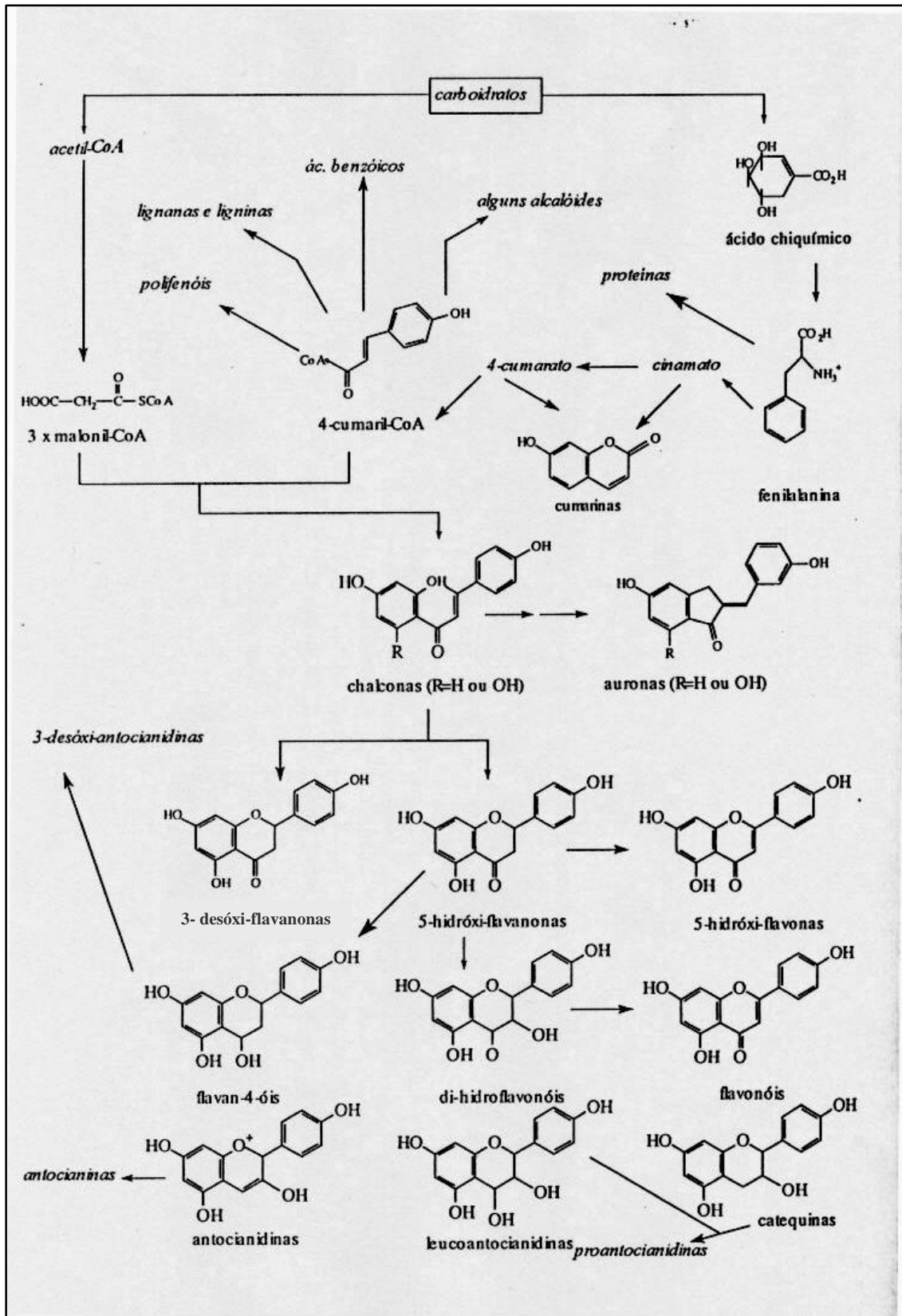
O termo "fenólico" ou "polifenol" pode ser definido como sendo uma substância que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilas e/ou seus derivados funcionais como ésteres, metoxilas, glicosídeos e outros. Essa definição também engloba a classe dos flavonóides. Entretanto, uma definição levando em conta somente a estrutura química não é apropriada, uma vez que existem compostos contendo hidroxilas fenólicas, fazendo parte de outras classes de metabólitos diferentes dos flavonóides. Dessa forma, é mais conveniente empregar-se uma definição que leva em conta também a origem biogenética (SIMÕES et al., 2000). Uma representação esquemática da biossíntese de flavonóides está representada na figura 5.

Os flavonóides representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal e natural. Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal. Com poucos relatos em algas, alguns representantes foram identificados em briófitas, existindo apenas um relato de ocorrência em fungos. Em pteridófitas também foram encontrados, mas sua variabilidade estrutural é pequena. Todavia estão presentes em abundância nas angiospermas, apresentando nesse grupo enorme diversidade estrutural (SIMÕES et al., 2000).

A distribuição dos flavonóides nos vegetais depende de diversos fatores de acordo com a fila/ordem/família do vegetal, bem como da variação das espécies. Geralmente, flavonóides encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, nos galhos, raízes e frutos. O mesmo composto ainda pode apresentar diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal em que se encontra (SIMÕES, 2000). É importante ressaltar que fatores abióticos naturais como a radiação solar, raios UV, períodos de seca ou chuva, nutrientes e estações do ano influenciam no metabolismo e na produção destes compostos e ainda, fatores artificiais, como poluentes, podem interferir também nesse mecanismo (CATHERINE, 2003; DEGÁSPARI, 2004). Em períodos de chuva os compostos mais polares são eliminados das plantas por lixiviação. Também em regiões poluídas a planta pode produzir maior quantidade de metabólitos secundários, incluindo flavonóides, como mecanismo de defesa contra patógenos como vírus, bactérias, fungos, insetos.

A maioria dos flavonóides presentes nos alimentos ocorre principalmente na forma glicosilada de 3-O-glicosídeo e polímeros (HEIM, 2002).

Figura 5 - Representação esquemática simplificada da biossíntese de flavonóides.



Fonte: SIMÕES et al., 2000.

Não surpreendentemente, a **b**-ligação destes açúcares ao anel fenólico é resistente a hidrólises por enzimas pancreáticas. Assim sendo, acreditou-se que a microbiota intestinal era responsável pela **b**-hidrólise de muitos açúcares dessas moléculas. Porém, duas **b**-endoglicosidases foram caracterizadas no intestino delgado humano como capazes de hidrolisar flavonóides glicosilados incluindo lactase phlorizina hidrolase e uma enzima citosólica não específica capaz de desglicosilação de flavonóides, permitindo assim, sua conjugação com outros grupos (HEIM, 2002). Spencer et al., citado por Heim (2002), demonstraram que os flavonóides 7-glicosil luteolina, 3-glicosil Kaemferol e 3-glicosil quercetina são hidrolisados e absorvidos pelo intestino delgado pela ação da enzima glicosidase.

As cinéticas de absorção variem consideravelmente entre alimentos devido à heterogeneidade de açúcares e outros grupos funcionais ligados ao núcleo de flavonas. Além do mais, a absorção também é dependente da dosagem, veículo de administração, antecedentes da dieta, diferenças sexuais, população microbiana do cólon e de flavonóides que são absorvidos ligados a proteínas (WALLE, 2004).

O preparo dos alimentos para consumo pode, algumas vezes, resultar em perdas destes compostos, em maior ou menor grau, variando de acordo com o tipo de alimento e o tipo de preparo empregado. Todavia, os flavonóides são compostos relativamente estáveis, pois resistem à oxidação, altas temperaturas e moderadas variações de acidez (PETERSON & DWYER, 1998). Flavonóides e isoflavonóides compreendem uma classe de fitoquímicos que não podem ser sintetizados por humanos, ocorrendo somente através da ingestão dietética (PETERSON & DWYER 1998; BIRT, 2001).

Em 1995, Hollman et al., citado por Walle (2004), baseado em evidências indiretas, propôs que os flavonóides glicosilados poderiam ser absorvidos intactos pelo intestino delgado usando um transportador de glicose sódio dependente (SGLT 1). Mais tarde, este postulado foi confirmado através da pesquisa de que os flavonóides são usualmente absorvidos por difusão passiva pelos enterócitos, após serem glicosilados e/ou convertidos em agliconas (MARCHAND, 2002) por glicosidases presentes em alimentos, mucosa gastrointestinal ou na microflora do cólon (YANG, 2001). Segundo Heim (2002), agliconas apresentam um maior poder antioxidante que seus correspondentes glicosilados.

Após sua absorção, os flavonóides são conjugados no intestino delgado e no fígado pela glicuronidação, sulfatação ou metilação ou metabolizados a pequenos compostos fenólicos (MARCHAND, 2002; YANG, 2001; HEIM, 2002). Ao sofrerem

essas modificações, os flavonóides podem tornar-se metabólitos mais ativos ou serem eliminados do organismo mais facilmente por tornarem-se mais polares; dessa forma, muitos desses produtos metabólicos podem ser detectados na urina e fezes humanas (WALLE, 2004).

O metabolismo bacteriano de flavonóides, principalmente no cólon, tem sido bem reportado em estudos com animais e pode ser um passo limitante na biodisponibilidade de muitos flavonóides em humanos e animais. Bactérias da microflora do cólon são responsáveis pela hidrólise de flavonóides glicosilados e conjugados, gerando numerosos compostos fenólicos menores, ácido carboxílico assim como a produção de dióxido de carbono (WALLE, 2004).

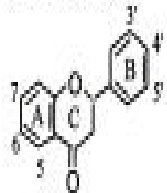
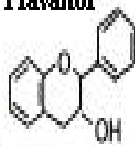
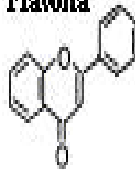
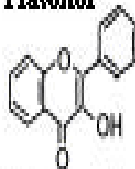
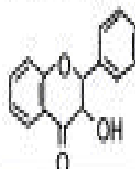
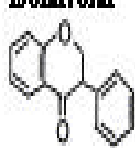
Recentes avanços em pesquisas com biologia molecular no genoma e proteoma definiram o papel dos flavonóides no desenvolvimento de plantas e sua aplicação potencial na agricultura e farmacoterapia (WOO, 2005). Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas. Entre elas, pode-se citar a proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra microrganismos patogênicos, ação antioxidante, agentes alelopáticos e inibição enzimática (SIMÕES, 2000; HARBORNE, 2000; HEIM, 2002). Segundo Heim (2002) e Degáspari (2004), os pigmentos derivados de antocianinas em flores atraem insetos polinizadores e são responsáveis pela característica cor vermelha e azul de bagas, vinhos e certos vegetais que são as maiores fontes de flavonóides na dieta humana.

Atualmente mais de 6000 diferentes flavonóides têm sido descritos (MARCHAND, 2002; YANG, 2001), sendo suas maiores classes os flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas, diidroflavonóis e chalconas (COOK & SAMMAN, 1996). Na tabela 1 observa-se as estruturas dos flavonóides das principais classes já estudadas

O interesse econômico dos flavonóides é decorrente de suas diferentes propriedades. Ensaio biológicos usando combinações isoladas revelam que os flavonóides exibem uma grande ação sobre os sistemas biológicos demonstrando efeitos antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, citotóxico, antineoplásico, antioxidante, antihepatotóxico, antihipertensivo, hipolipidêmico, antiinflamatório, antiplaquetário. Também demonstraram aumento na permeabilidade capilar, inibição da exudação protéica e migração de leucócitos (PELZER, 1998). Estes efeitos podem estar relacionados às propriedades inibitórias que os flavonóides desempenham nos vários sistemas enzimáticos incluindo hidrolases, isomerases, oxigenases, oxidoredutases,

polimerases, fosfatases, proteínas fosfoquinases e amino ácido oxidases (FERGUSON, 2001).

Tabela 1- Estrutura química de alguns flavonóides de ocorrência natural em plantas.

Fórmula estrutural	Flavonóides	substituições					
		5	6	7	3'	4'	5'
Flavanona 	Eriodictiol Hesperitina Naringenina	OH	H	OH	OH	OH	H
Flavanol 	Catequina Gallocatequina	OH	H	OH	OH	OH	H
Flavona 	Apigenina Crisina Luteolina	OH	H	OH	H	OH	H
Flavonol 	Kamferol Miricetina Quercetina	OH	H	OH	H	OH	H
Flavononol 	Taxifolina	OH	H	OH	OH	OH	H
Isodlavona 	Daidazina Genisteína Gliciteína formononetina	H	H	OH	H	OH	H

Fonte: BIRT, 2001.

3.4. MECANISMOS DE AÇÃO DOS FLAVONÓIDES.

3.4.1. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Antioxidantes são compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações de oxidação em cadeia (DEGÁSPARI, 2004). O oxigênio, indispensável para a vida, pode resultar em danos reversíveis ou até irreversíveis, quando os seres vivos são expostos a ele em concentrações superiores à encontrada na atmosfera, podendo inclusive, levar à morte celular (MANSON, 2003).

O oxigênio atua em organismos aeróbicos comoceptor final de elétrons e, dessa forma, o oxigênio envolvido no processo respiratório é estável, mas em certas condições pode ser transformado nas seguintes espécies: ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que são responsáveis por danos celulares (CODY et al., 1986).

Os radicais livres então, podem ser definidos como qualquer espécie química capaz de existência independente, que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, sendo portanto, altamente reativos e capazes de atacar qualquer biomolécula. A formação desses compostos é determinada pela perda ou ganho de um elétron ficando com um elétron desemparelhado (MARRONI, 2002). A formação destas espécies reativas de oxigênio (ROS) ocorre durante os processos oxidativos biológicos, sendo assim, formados fisiologicamente nos sistemas biológicos a partir de compostos endógenos (MARRONI, 2002) ou em circunstâncias patológicas incluindo envelhecimento, reações inflamatórias, câncer, desordens cardiovasculares, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, catarata e diabetes (CODY et al., 1986).

Células corporais e tecidos são constantemente ameaçados por danos causados por radicais livres e espécies de oxigênio (GRACE, 1994; WALLE, 2004). O mecanismo e seqüência de eventos pelos quais os radicais livres interferem na função celular ainda não são completamente entendidos, mas um dos mais importantes eventos parece ser a peroxidação lipídica que resulta em danos à membrana celular. Esses danos celulares causam uma troca na carga líquida da membrana provocando mudanças de pressão osmótica que resultam em lise celular. Radicais livres podem agir sobre vários mediadores inflamatórios contribuindo para uma inflamação geral responsável por

danos aos tecidos (NIJVELDT, 2001), além de estarem ligados com processos de envelhecimento corporal (DEGÁSPARI, 2004).

Com a evolução dos seres vivos no planeta, surgiram mecanismos para combater esses efeitos deletérios causados por espécies reativas de oxigênio. Contra os radicais livres, os organismos viventes desenvolveram vários mecanismos efetivos. São os mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (MANSON, 2003).

Os mecanismos de defesa contra radicais livres no corpo incluem enzimas como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase; e cofatores enzimáticos como glutathione, ácido ascórbico e α -tocoferol (CODY et al., 1986). É difícil fazer uma medição direta da oxidação nos componentes celulares devido a sua alta reatividade, porém é possível uma determinação indireta pelos efeitos por eles causados, através da oxidação dos lipídios, dos grupamentos sulfidrila das proteínas, das bases púricas e pirimídicas, o que leva a uma alteração no DNA e no balanço tiol/dissulfeto (BASU, 1999). Foi descoberto que uma série de doenças entre as quais câncer, aterosclerose, diabetes, artrite, malária, AIDS, doenças do coração, podem estar ligadas aos danos causados por formas de oxigênio extremamente reativas denominadas de ROS ou “substâncias reativas oxigenadas” (DEGASPARI, 2004).

Diversos estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra estes processos oxidativos que ocorrem no organismo (DEGASPARI, 2004). A proteção antioxidante dos flavonóides foi o primeiro mecanismo de ação estudado, em particular, com relação a seus efeitos protetores em doenças cardiovasculares (BRAVO, 1998). A atividade antioxidante de compostos fenólicos é principalmente devida às suas propriedades de oxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, quelando o oxigênio triplete e singleto ou decompondo peróxidos (DEGÁSPARI, 2004). Dessa forma, eles demonstram grande eficiência no combate de vários tipos de moléculas oxidantes, incluindo oxigênios reativos e vários radicais livres (BRAVO, 1998) que estão envolvidos em danos no DNA e promoção de tumores (MARCHAND, 2002).

A atividade antioxidante dos flavonóides tem sido bem estudada *in vitro*, mas a atividade antioxidante na prevenção do câncer *in vivo* ainda esta sendo pesquisada. Quimicamente, os flavonóides e isoflavonóides são doadores de elétrons. Eles servem como derivados de estruturas conjugadas em anel e grupos hidroxila que tem potencial de ação como antioxidantes em cultura de células ou em sistemas de células livres por

reagirem e inativarem ânions superóxido, oxigênio singleto, radicais peróxido de lipídios e/ou estabilizando radicais livres envolvidos no processo oxidativo através da hidrogenação ou complexação com espécies oxidantes (BIRT, 2001).

Das & Pereira, (1990) citado por Harborne (2000), demonstraram que o grupo carbonila em C-4 e a dupla ligação entre C-2 e C-3 desempenham um importante papel na ação antioxidante dos flavonóides. Além disso, a configuração das hidroxilas no anel **b** é determinante no processo de eliminação de ROS e RNS. Em outras palavras, os flavonóides estabilizam espécies reativas de oxigênio porque apresentam grupos hidroxila altamente reativos, os quais estabilizam os radicais (KORKINA, 1997).

A atividade antioxidante e a relação estrutura-atividade dos flavonóides têm sido intensamente investigadas por Djuric, (2001) e Loo, (2003). Este último relata que a ação antioxidante deve-se ao número e à posição dos grupos hidroxilas, que são capazes de doar os átomos de hidrogênio na “varredura” dos ROS. Essa idéia tem sido desenvolvida principalmente porque H₂O₂ ou produtos da reação com OH⁻, são essenciais para a transdução do sinal e a ativação de genes específicos que promovam a proliferação de células carcinogênicas. Assim, a varredura desses ROS com substâncias fenólicas inibiu esse processo celular e conseqüentemente, a proliferação de células cancerosas.

A ação antioxidante dos flavonóides é desempenhada de acordo com as equações abaixo:



As diferenças na atividade antioxidante de flavonóides por polihidroxilação ou polimetoxilação ocorrem, provavelmente, devido a diferenças em hidrofobicidade e configurações estruturais dos radicais livres. Após a doação de grupos hidroxila e metila pelos flavonóides esses radicais livres perdem sua reatividade, dessa forma não são capazes de atacar biomoléculas do organismo (HEIM, 2002).

3.4.2. ATIVIDADE INIBITÓRIA DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO

A inibição de RNS através de flavonóides envolve o mesmo mecanismo básico de eliminação de ROS. Os flavonóides são conhecidos por sua ação antioxidante por reagirem diretamente com peroxinitritos e seu progenitor superóxidos (HEIM, 2002). Quando flavonóides são usados como antioxidantes ocorre uma eliminação na reatividade dos radicais livres corporais; dessa forma, uma menor quantidade de radicais livres reagirá com óxido nítrico, causando menores danos à célula (SHUTENKO et al., 1999). O óxido nítrico pode ser considerado um radical livre e foi demonstrado que é diretamente eliminado por flavonóides (VAN ACKER et al. 1995).

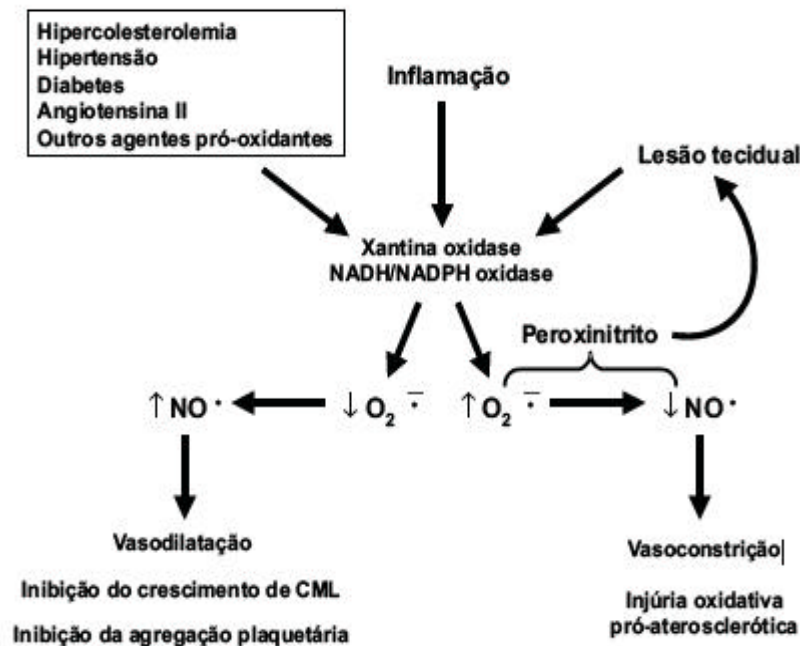
Vários flavonóides, incluindo a quercetina, provocaram a redução de danos causados por radicais livres através da interferência na atividade da óxido nítrico sintase (SHOSKES, 1998). Existem também muitas evidências que os flavonóides podem modular a produção de óxido nítrico pelo endotélio vascular; sendo assim, os flavonóides podem agir como agentes anti-inflamatórios em inflamações agudas (HUANG et al., 2004).

Na década de 80, a descoberta do óxido nítrico (NO) como um mensageiro molecular para os vários sistemas do organismo de mamíferos revolucionou as pesquisas acerca da extensão de sua atividade biológica. Desde então, um crescente número de pesquisas acerca da molécula NO, na fisiopatologia humana e animal, são desenvolvidas (COSTA et al., 2003).

O NO é um gás extremamente reativo, que participa de muitos processos fisiológicos relacionados aos sistemas nervoso central e periférico. Na figura 6 estão representados alguns desses processos fisiológicos desempenhados pelo óxido nítrico.

Na verdade, os compostos reativos intermediários do nitrogênio incluem o nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), e óxidos altamente reativos como o óxido nítrico (NO) e dióxido de nitrogênio (NO_2). Dentre estes compostos, o NO é o composto intermediário de vida curta, com potente atividade biológica, sendo sintetizado por uma família de enzimas (óxido nítrico sintases), expressas em uma grande variedade de células de mamíferos (miócitos cardíacos, células pancreáticas, células renais e neurônios), através da catálise enzimática do aminoácido essencial L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase, cuja ação é dependente de NADPH (MONCADA et al., 1991; COSTA et al., 2003; DUDA et al., 2004).

Figura 6 - Representação esquemática dos processos fisiológicos desempenhados pelo óxido nítrico.



Fonte: LACCHINI, 2004.

A catálise enzimática da reação do aminoácido L-arginina e oxigênio, que resulta na formação de L-citrulina e óxido nítrico (NO), é feita por enzimas que são designadas de constitutivas (cNOS) ou induzidas (iNOS). As cNOS são enzimas que estão presentes em muitas células; sua liberação depende da concentração intracelular de cálcio/calmodulina e, uma vez liberadas, sintetizam NO por curtos períodos com o propósito básico de sinalização celular. O NO formado por esta via participa de muitos processos homeostáticos. Por outro lado, as iNOS independem da concentração intracelular de cálcio, e são liberadas por macrófagos (incluindo células de Kupffer), neutrófilos e outros tipos celulares como células endoteliais, hepatócitos, neurônios e fibroblastos (MONCADA et al., 1991; COSTA et al., 2003; DUDA et al., 2004).

O óxido nítrico desempenha um importante papel no controle de muitas infecções, apresentando atividade antibacteriana, antiparasitária e antiviral, entretanto em excesso pode ser tóxico. Sendo assim, o descontrole na síntese de NO está implicado na patogênese de doenças cardiovasculares, autoimunes, rejeição de transplantes, sépsis, doenças cerebrais, indução de câncer, genotoxicidade e na inflamação (COSTA et al., 2003). A ativação de macrófagos durante as respostas imunes *in vivo* ou pela exposição a certas citocinas *in vitro*, mostra uma marcada elevação dos níveis de (NO_2^-) e (NO_3^-) .

Portanto, a citotoxicidade de macrófagos ativados contra organismos estranhos é também dependente da via L-arginina – óxido nítrico (RIZZO, 2000).

O óxido nítrico também apresenta ação anti-tumoral. Entretanto, a atividade anti-tumoral do NO depende de sua quantidade gerada e da interação das células do hospedeiro com as do tumor. Esta interação pode gerar efeitos ora estimulantes, ora inibitórios na imunidade anti-tumoral. A diversidade de efeitos do óxido nítrico parece estar relacionada às concentrações de NO gerados, a sensibilidade individual das células e à duração do fenômeno (COSTA et al., 2003). Segundo hipótese de Wang et al., (2000), citado por Costa et al., (2003), a microvasculatura hepática regula a apreensão e o destino de células metastáticas de câncer através da liberação de NO. Estes autores concluíram que existe um mecanismo de defesa natural contra metástases de câncer por meio do qual a apreensão de células tumorais no fígado induz uma grande liberação de NO endógeno, levando à morte das células tumorais no sinusóides e reduzindo a formação de metástase hepática.

Macrófagos ativados têm a capacidade de selecionar e eliminar de forma eficiente um grande número de células neoplásicas por processos não fagocíticos (contato-dependente). Durante esta interação, macrófagos ativados induzem alterações metabólicas características nas células tumorais, incluindo a inibição na síntese de DNA, respiração mitocondrial (inibição do complexo I e II do sistema de transporte de elétrons) e da enzima aconitase presente no ciclo dos ácidos cítricos, enquanto que outras vias metabólicas, como a glicólise, mantêm-se funcionais. Além disso, a inibição das várias atividades enzimáticas são acompanhadas pela liberação intracelular de ferro das células alvo, causando injúria ou morte celular (RIZZO, 2000).

O papel do NO como agente promotor de câncer possivelmente se deve à geração de espécies reativas de óxido de nitrogênio (RNOS), geradas a partir das sintases de NO. As reações seguintes à formação das RNOS dão origem ao estresse oxidativo e nitrosativo e apresentam efeitos potencialmente genotóxicos (HEIM, 2002).

Experimentos com óxido nítrico demonstraram que ele apresenta um papel fundamental dentro da regulação da “cadeia transportadora de elétrons” devido à sua habilidade em inibir reversivelmente o citocromo C oxidase (complexo IV), acceptor final de elétrons (CLEETER et al., 1994). Porém, uma superprodução de óxido nítrico está associada a uma inibição prolongada do transporte de elétrons, que resulta em um extravasamento de elétrons da matriz, aumentando a geração de oxigênio reativo, os quais conduzem a um rompimento celular. Além do mais, o NO pode afetar a expressão

e a atividade de proteínas críticas no ciclo celular e, por sua vez, também ser alvo das mutações do DNA celular (GHAFOURIFAR et al., 2001; HEIM, 2002).

Na regulação da apoptose, o NO parece apresentar efeitos contraditórios. Aparentemente, a morte celular mediada por NO ocorre tanto por necrose como por apoptose. Os efeitos pré-apoptóticos parecem estar mais relacionados a condições patofisiológicas, onde grandes quantidades de NO são produzidas por síntese induzida de NO (COSTA et al., 2003). Nestas circunstâncias, a grande atividade de macrófagos aumenta simultaneamente, a produção de óxido nítrico e superóxido de amônia. O óxido nítrico reage com os radicais livres e produz assim, peroxinitritos altamente prejudiciais, os quais são responsáveis pela oxidação direta de LDL's resultando em danos irreversíveis à membrana da célula (HEIM, 2002).

Vale lembrar, que a função do NO na biologia tumoral ainda não é bem compreendida, porém existem dados recentes demonstrando que o NO produzido por células tumorais seria responsável pelas características de invasividade e angiogênese. Sendo a angiogênese um marcador patológico de carcinogênese, doenças inflamatórias e de várias isquemias (CARMELIET, 2000), o desenvolvimento do tumor, sua vascularização e seu potencial invasivo estão relacionados à reduzidas concentrações de NO produzidas pelas células tumorais (COSTA et al., 2003) incluindo os carcinomas ovarianos, uterinos, tumores do sistema nervoso central, câncer de mama, carcinoma gástrico, prostático e pulmonar (RIZZO 2000).

Neste mesmo contexto, Maeda & Akaike (1998), sugeriram que o NO gerado em tumores sólidos experimentais, poderia facilitar a permeabilidade vascular e conseqüentemente, o suprimento nutricional do tecido e o rápido crescimento do tumor.

3.4.3. ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA.

Em 1930 dois ginecologistas americanos, Kurzrok & Lieb, observaram que fatias do útero humano se relaxavam ou se contraíam quando expostas ao sêmen humano. Von Euler descreveu a substância ativa como um ácido lipossolúvel, que ele denominou "prostaglandina". Anos mais tarde, a compreensão de que as prostaglandinas "conhecidas classicamente" constituíam apenas uma fração dos produtos fisiologicamente ativos do metabolismo do araquidonato, resultou nas descobertas do

tromboxano A₂ (TXA₂), da prostaciclina, dos leucotrienos e dos fosfolipídios modificados, hoje em dia representados pelo fator ativador plaquetário (FAP) (GOODMAN & GILMAN, 2003).

As famílias das prostaglandinas, leucotrienos e compostos relacionados são conhecidas como eicosanóides, pois são derivadas dos ácidos graxos essenciais de 20 carbonos, que contêm três, quatro ou cinco ligações duplas: ácido 8,11,14-eicosatrienóico (ácido diomo- γ -linolênico), ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico (ácido araquidônico) e ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenóico. O araquidonato é então esterificado em fosfolipídios das membranas celulares ou outros lipídios complexos (SHARMA, 2001). Em outras palavras, os eicosanóides formam uma família complexa de derivados de ácidos graxos poliinsaturados (principalmente do araquidônico), sintetizados por quase todas as células dos mamíferos (FONSECA, 2002).

O aumento da biossíntese dos eicosanóides é regulado e ocorre em resposta a estímulos físicos, químicos e hormonais diversos. Essas alterações levam as células agredidas a adquirir comportamentos diferentes: movimentos novos, alterações de forma e liberação de enzimas e substâncias farmacológicas que possuem efeitos intracelulares importantes nos líquidos teciduais, tanto em condições fisiológicas como patológicas. Toda essa transformação morfológica e funcional do tecido, característica dos processos inflamatórios, visa destruir, diluir ou isolar o agente lesivo, sendo, portanto, uma reação de defesa e de reparação do dano tecidual (NOVELLI, 2000).

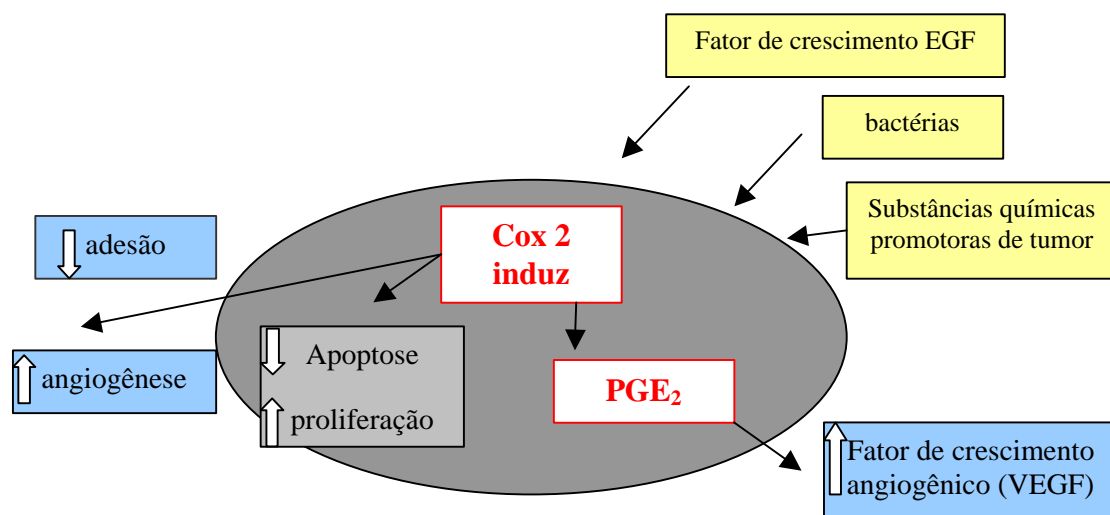
Como a concentração do araquidonato livre na célula é muito pequena, a biossíntese dos eicosanóides depende principalmente da sua disponibilidade para as enzimas que os sintetizam; essa disponibilidade depende de sua liberação a partir das reservas adiposas pelas hidrolases acíclicas, principalmente a fosfolipase A₂ e a lipase do diacilglicerol. O primeiro passo na síntese das PGs e dos tromboxano (TXs) é mediado pela enzima Ciclooxigenase (COX), a qual catalisa a incorporação de oxigênio ao ácido araquidônico, com subsequente formação de endoperóxidos cíclicos (FONSECA, 2002). Esses endoperóxidos contribuem para alguns processos fisiológicos e patológicos, incluindo inflamação, tônus da musculatura lisa, hemostasia, trombose, parto e secreções gastrintestinais (FUKUDA, 2003).

A ciclooxigenase-2 (COX-2) catalisa a formação de prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico. A COX-2 e sua isoenzima, COX-1 estão envolvidas também na indução da angiogênese. A super expressão de COX-2 tem sido implicada na tumorigênese de cânceres de cólon, reto, estômago, pulmão, mama, cabeça

e pescoço. A redução da atividade de COX está relacionada com o aumento da apoptose, diminuição da proliferação celular, redução da adesão célula-célula, redução da aderência de células a matrix extracelular e a indução da angiogênese (figura 7).

Estudos mostram que enzimas como COX-2 e/ou óxido nítrico sintase (iNOS), em associação com resposta inflamatória podem ter um papel central na carcinogênese (SURH, 2003). Em alguns tumores humanos, como no esôfago de Barrett, foram identificados elevados níveis de mRNA para iNOS e para COX-2. Para os pesquisadores, estes resultados sugerem que tanto a iNOS como a COX-2 estejam envolvidas na progressão neoplásica associada ao esôfago de Barrett (COSTA et al., 2003). Além disso, estudo de Etherton (2002) sugere que COX-2, mediada por sinalização parácrina de macrófagos, pode ser o pivô central na progressão de tumores do cólon.

Figura 7 – Representação simplificada do potencial de indução de COX em macrófagos ativados na indução da angiogênese em lesões pré-neoplásicas.



Fonte: SHARMA, 2001.

A formação de prostaglandina E₂, catalisada por COX-2, induz a síntese do principal fator de crescimento angiogênico, o VEGF. Estudos de formação do VEGF foram obtidos em culturas de linhagens de células normais, sinoviais, de osteoblastos e de células malignas. COX-2 também modula a atividade de peptídeos regulatórios de crescimento, como TGF- β (SHARMA, 2001). A promoção do crescimento e os efeitos pró-angiogênicos do TGF- β têm sido vistos quando células epiteliais são expostas a outras citocinas, que induzem a expressão da COX-2, como de fatores de crescimento epidérmico. Tem-se observado ainda, nos processos inflamatórios, a migração de

macrófagos ativados para a região da inflamação, estando estes associados à indução da angiogênese.

A inflamação crônica é um passo importante na etiologia do câncer e inibidores de COX-2 têm sido estudados como agentes quimioprotetores contra câncer coloretal (MARCHAND, 2002). A quimioprevenção é considerada um dos propósitos mais promissores na prevenção de cânceres humanos (SAKATA, 2003). Pai et al., (2003) demonstraram que (PGE₂) além de atuar no seu próprio receptor, estimula a produção de fatores de crescimento epidermal, potencializando o crescimento tumoral. Segundo Fukuda (2003), prostaglandina (PGE₂) pode induzir a angiogênese e aumentar a resistência das células à apoptose, o que enfatiza a promoção da carcinogênese pela COX-2.

Estudos de Takahashi (1999), citado em Shan (2004), demonstraram que a superprodução de COX-2 induz a produção de uma metaloproteína de matriz (MMPs) envolvida na invasão da matriz extracelular. Dessa forma, COX-2 é uma enzima essencial na manutenção da migração de células tumorais (DORMOND, 2001). Além disso, COX-2 estimula diretamente a produção de fatores angiogênicos (VEGF, PDGF, bFGF e TGF- β); esses mediadores angiogênicos e seus receptores aumentam a permeabilidade vascular, induzindo a proliferação e migração celular (FOSSLIEN, 2001).

Em 1995, Tsujii e Dubois criaram, através da engenharia genética, uma linhagem de ratos que expressavam uma superprodução de COX-2 em células do epitélio intestinal. Essas células demonstraram um aumento na resistência a apoptose (Butirato induzida), que foi confirmada pelo aumento da expressão de fatores anti-apoptóticos como BCL₂ e TGF- β . Segundo Narko (1997) e Sheng (1998), a superprodução de COX-1 ou a adição de PGE₂ em culturas celulares poderiam também aumentar a resistência a apoptose.

Certos flavonóides podem afetar (usualmente inibindo) processos biosintéticos de eicosanóides. Eles também são responsável pela inibição de processos mitogênicos, interações célula-célula, incluindo possíveis efeitos na adesão molecular (WILLIAMS, 2004). O mecanismo de inibição exercido pelos flavonóides sobre as enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase está sendo extensivamente pesquisado (NIJVELTD, 2001). Flavonóides como a quercetina e a apigenina têm demonstrado possuir ação antiinflamatória por causar inibição de COX-2 e de óxido nítrico sintase. (MUTOH et al., 2000; RASO et al., 2001). Segundo Friesenecker et al., (1995), flavonóides como a

quercetina e a luteolina podem reduzir a ativação do sistema complemento, diminuindo a adesão de células inflamatórias ao endotélio, resultando em uma redução da resposta inflamatória.

A hesperidina é um flavonóide de ocorrência natural encontrado em frutas e vegetais. Quando sozinha ou combinada com diosmina, exerce ação anticarcinogênica em modelos animais para câncer de língua, intestino, esôfago e bexiga (WILLIAMS, 2004). Etherton (2002) relatou que flavonóides possuem efeito antitrombótico, como resultado da menor agregação plaquetária, redução da síntese de mediadores pró-trombóticos e pró-inflamatórios e diminuição da expressão de adesão molecular. Flavonóides podem ainda, inibir a atividade de ciclooxigenase, reduzindo a agregação plaquetária e tendência à trombose (ETHERTON, 2002). Ferguson (2001) observou que quercetina inibe a agregação plaquetária *in vitro* e reduz síntese de tromboxano *in vivo*.

Vários grupos de medicamentos, em especial as drogas antiinflamatórias não-esteróides, têm seus efeitos terapêuticos atribuíveis ao bloqueio da produção dos eicosanóides. Eles atuam no processo de redução da reação inflamatória por inibirem a liberação de prostaglandinas, atuando em etapas pré-estabelecidas na via do ácido araquidônico. Seus maiores efeitos farmacológicos são redução do edema, eritema e dano tecidual resultante de processos inflamatórios cíclicos (FONSECA, 2002).

Estudos indicam que alguns tipos de flavonóides incluindo a hesperidina e naringina possuem atividade antiinflamatória (SURH, 2003). Atualmente, o Daflon[®] 500mg, um flavonóide purificado (vendido comercialmente) contém 90% de diosmina e 10% de hesperidina, possuindo uma atividade antiinflamatória e atua na insuficiência venosa; e existe uma possível correlação entre efeito antiinflamatório e atividade quimioprotetora de hesperidina (SAKATA, 2003).

Estudos epidemiológicos indicaram que, o uso de antiinflamatórios a longo prazo, está associado a uma redução de 30% a 50% no risco de mortes causadas por câncer (RODRIGUEZ, 2000). Além disso, pesquisas sugerem que a duração e a consistência no tratamento com antiinflamatórios são mais importantes que as dosagens utilizadas. Outros estudos epidemiológicos observaram uma associação entre o uso de antiinflamatórios e uma menor incidência de mortes causadas por câncer de esôfago, estômago, mama, pulmão, próstata, bexiga e ovário (MORAN, 2002; THUN et al., 2002). Tentativas clínicas utilizando NSAID em populações de risco demonstraram uma redução no número e tamanho de adenomas (CALALUCE, 2000; HULS, 2003).

Seed et al. (1997), citado por Shan (2004), demonstraram que um inibidor de ciclooxigenase não específico (diclofenaco), suprime o aumento de COX-2 em modelos animais, bloqueando a angiogênese tumoral. Similarmente, os flavonóides desempenham um efeito interessante em sistemas enzimáticos, inibindo ambas as enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase (FERRANDIZ, 1991; PELZER, 1998) e reduzindo, dessa forma, o metabolismo do ácido araquidônico (RASO et al., 2001). Isso confere aos flavonóides uma característica antiinflamatória, antitrombótica (ETHERTON, 2002) e antilipoperoxidante (CODY, 1987).

3.4.4. INTERAÇÃO DE FLAVONÓIDES COM OUTROS SISTEMAS ENZIMÁTICOS.

Outro possível mecanismo de ação dos flavonóides é a interação com vários outros sistemas enzimáticos. Em analogia com o metabolismo de drogas e outros compostos exógenos, imaginava-se que flavonóides eram metabolizados por enzimas do citocromo P-450 (CYPs). Assim, estudos focados em interações entre flavonóides e (CYPs) demonstraram uma potente inibição da atividade enzimática das CYPs, em particular CYP1A1 e CYP1A2 pelos flavonóides (HEIM, 2002; WALLE, 2004). Essas enzimas apresentam um importante papel na ativação de um grande número de suspeitos carcinógenos humanos, como hidrocarbonetos policíclicos e aminas heterocíclicas.

Muitos carcinógenos químicos requerem uma transformação metabólica para sua maior reatividade com o DNA assim, se as mutações não forem reparadas pelo sistema de triagem celular isso possivelmente, promoverá a carcinogênese (MARCHAND, 2002). As principais enzimas envolvidas nessas transformações metabólicas sofridas pelo carcinógenos químicos são as enzimas CYPs. Os flavonóis Quercetina e Kaempferol, Galangina e a flavona Apigenina demonstraram possuir efeitos inibitórios a nível de Citocromo P-450 e de enzimas da família CYP1A, dessa forma, os flavonóides impedem as transformações metabólicas desses carcinógenos químicos impedindo assim a maior reatividade desses compostos com o DNA (LAUTRAITE, 2002). Além disso, alguns efeitos dos flavonóides podem ser resultados da combinação da eliminação de radicais livres e de interações com enzimas do sistema hepático responsáveis pela detoxificação de drogas e medicamentos (NIJVELDT, 2001).

Outros mecanismos de ação de flavonóides são realizados na rota metabólica de síntese de ácido úrico. Essa síntese é bem conhecida causar danos oxidativos aos tecidos e as enzimas Xantina oxidase e Xantina desidrogenase estão envolvidas no metabolismo de Xantina em ácido úrico. A Xantina desidrogenase é uma forma da enzima presente em baixas concentrações em condições fisiológicas, mas sua configuração é mudada para Xantina oxidase em condições de isquemia (SANHUEZA, 1992). Sendo assim, a Xantina oxidase é uma fonte produtora de oxigênio reativo, pois na fase de reoxigenação a Xantina oxidase reage com moléculas de oxigênio dessa forma, resultando em radicais superóxidos reativos. Há pelo menos dois flavonóides, Quercetina e Silibina que inibem a atividade da Xantina oxidase resultando em decréscimos de danos oxidativos (CHANG, 1993; SHOSKES, 1998). Segundo COS et al (1998) Luteolina (3, 4, 5, 7 tetrahidroxiflavona) provocou uma inibição mais potente na Xantina oxidase.

Valerio (2001) descreve em seu trabalho que os flavonóides aumentam a atividade de vários detoxificantes e enzimas antioxidantes como catalase, quinona redutase, glutathione peroxidase, redutase, S-redutase. Certos flavonóides podem induzir enzimas como a glutathione transferase (GST), aumentar a excreção de espécies oxidantes ou induzir enzimas antioxidantes como as metalotioneínas (metal ligado à proteína com atividade antioxidante) (FERGUSON, 2001).

A habilidade de certos flavonóides de se ligarem a minerais pode ser benéfica em muitos casos (WILLIAMS, 2004). Quando oxigênios reativos estão na presença de FE^{+2} , isso resulta em peroxidação lipídica (NELSON, 1992). Flavonóides específicos são conhecidos por serem quelantes de ferro e cobre prevenindo a participação deles em reações tipo Fenton e na geração de radicais hidroxila altamente reativos (FERRALI, 1997; YANG 2001). Dessa forma, os flavonóides removem fatores que auxiliam na peroxidação lipídica. Por exemplo, o ácido tânico (polifenol) inibiu a formação de radicais hidroxila devido a sua capacidade de complexar com íons ferro. Muitos polifenóis com função antioxidante eliminaram os radicais livres e também podem quelar íons metálicos que são capazes de catalisar a peroxidação de lipídios (WILLIAMS, 2004).

3.4.5. AÇÃO ANTI-ESTROGÊNICA DOS FLAVONÓIDES

Vários flavonóides têm sido pesquisados e seus mecanismos de ação demonstrados como estrogênicos e anti-estrogênicos. Muitos estudos *in vitro* indicam que vários fitoestrógenos agem similarmente aos estrógenos esteroidais. Eles ligam aos receptores de estrógenos, induzem genes, estimulam o crescimento de células cancerosas e suas ações podem ser bloqueadas pelos antiestrógenos (SHIRAI, 2002).

Fitoestrógenos são geralmente mais fracos que estrógenos esteroidais endógenos, e sugere-se que eles ajam como antiestrógenos pela competição com estrógenos endógenos mais potentes por ligarem aos receptores estrogênicos (ERs). Um estudo relata que fitoestrógenos como genisteína são bons ligantes aos ERs (FRITZ, 2002). Fitoestrógenos possuem uma afinidade maior de ligação a um subtipo do receptor - ER . (SHEIKE, 2003).

Os estrógenos não esteroidais ligam-se preferencialmente aos receptores do tipo , principalmente os distribuídos nos tecidos ósseo, cérebro e endotélio vascular. Os flavonóides (estrógenos esteroidais) exercem atividade antioxidante, antiproliferativa e anti-angiogênica. Eles reduzem a formação de fatores de crescimento, afetam a atividade de tirosina quinase e tem potencial anti-carcinogênico. Os flavonóides possuem diferentes afinidades aos receptores de estrógeno do subtipo e . A genisteína possui uma afinidade 20 vezes maior pelo receptor do que pelo receptor (FRITZ, 2002). Numerosos estudos *in vitro*, relatam que muitos, mas não todos os fitoestrógenos, inibem muitas enzimas chave na biossíntese de estrógenos e andrógenos. Essas incluem 17- -hidroxiesteróide oxidorreductase tipo 1 e 2, aromatase e 5- -redutase (STRAUSS, 1998).

Muitos fitoestrógenos têm sido relatados em exercer várias ações (efeitos) que não estejam relacionados ao ERs. Esses efeitos incluem atividade antiproliferativa, inibição da tirosina quinase, proteína quinase C, DNA topoisomerase II, atividade antioxidante, inibição da angiogênese (STRAUSS, 1998). Segundo Tapiero (2002), os compostos com ação estrogênica, como os flavonóides, podem produzir:

- resposta hormonal normal;
- resposta anormal bloqueando os sítios dos receptores de estrógenos, impedindo que esses hormônios liguem-se aos receptores (ação anticarcinogênica);
- ligam-se aos receptores e criam uma nova reação ou interferem indiretamente na ação hormonal normal;

- alteram a produção e degradam os receptores hormonais como também modificam a resposta endócrina de hormônios naturais;
- ligam-se a receptores de estrógeno interferindo na síntese de proteínas;
- a atividade estrogênica também está relacionada com a reprodução dos animais, afetando-a seriamente.

3.4.6. INIBIÇÃO DO PROTEASSOMA

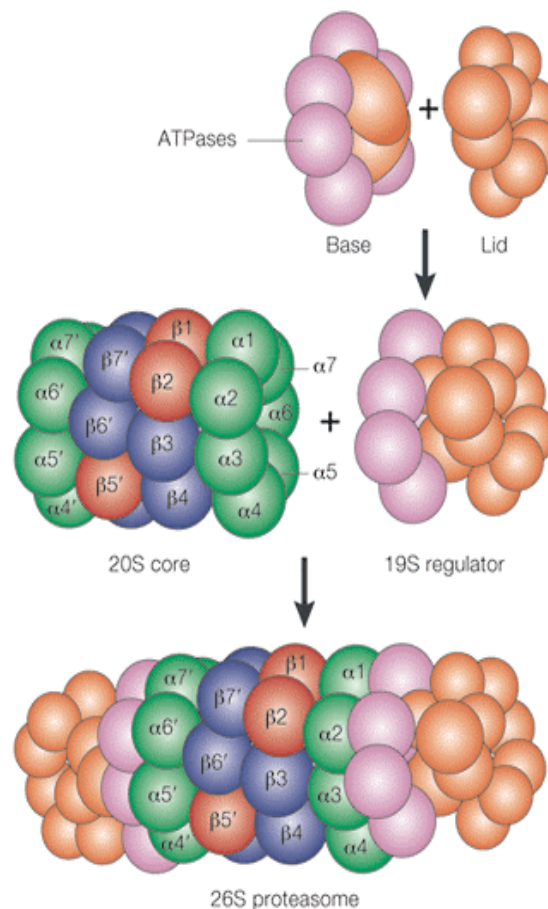
Outra forma de atuação dos flavonóides é a inibição do proteassoma. Os passos do processo de ubiquitina-proteassoma são importantes na regulação tanto do ciclo celular quanto apoptose (CHEN, 2005). Para remover danos e proteínas não necessárias, a proteólise mediada por proteassoma tem sido um mecanismo importante na regulação protéica dentro da célula. A rapidez e a irreversibilidade do proteassoma eliminam proteínas, sendo o pivô da modulação da ativação e repressão de passos da transdução de sinais, incluindo proliferação e morte celular (WÓJCIK, 2003).

O proteassoma 26S é composto por subunidades protéicas múltiplas, um núcleo proteolítico complexo de 20S e duas subunidades regulatórias de 19S presente no citoplasma e núcleo de todas as células eucarióticas. O proteassoma 20S consiste em 28 subunidades (14 diferentes), 21-31kDa de massa molecular, organizada em 4 anéis heptaméricos (Figura 8). Os 2 anéis exteriores contêm subunidades (1-7, verde) e aminoterminal que está na abertura central do cilindro. Os 2 anéis internos contêm duas cópias da subunidade (1-7, azul e vermelho) três das quais (1,2,5, vermelhas) ocupam seis locais ativos. A subunidade 19S inclui e subestruturas. A base que prende aos dois anéis está composta de seis ATPase (roxo) e duas subunidades não-ATPase (laranja). A tampa que contém até 10 subunidades não-ATPase (laranja) é responsável pela ligação ao substrato (Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001).

Proteínas marcadas para degradação pelos proteassomas são covalentemente modificadas para a cadeia protéica poli-ubiquitina que é reconhecida pela subunidade 19S. Uma vez reconhecida pelo complexo regulatório, as cadeias de ubiquitina são removidas e a proteína é desnaturada e levada para o centro do complexo 20S. A proteólise pelo proteassoma 26S é um processo metabólico essencial. Porém, os mecanismos envolvidos não estão totalmente claros, células cancerosas e células

normas parecem responder diferentemente aos efeitos da inibição do proteasoma. Quando tratados com inibidor de proteasoma, o ciclo celular usualmente é detido em células normais, já em células cancerosas é mais provável que sejam submetidos a apoptose. Taxa de proliferação parece não ser importante na sensibilização de células com câncer porque células malignas com baixa taxa de proliferação são também sensíveis à inibição do proteasoma (ADAMS, 2003; WÓJCIK, 2003).

Figura 8 - Composição do proteasoma.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Fonte: Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001

Os flavonóides inibem a atividade proteasômica ligada a quimiotripsina em dose e tempo dependente em estudos realizados “*in vitro*” em cultura de células leucêmicas. A ordem de potência de quatro flavonóides em inibir a atividade de proteasoma e induzir a apoptose em células tumorais é: apigenina > quercetina > kaempferol > miricetina (CHEN, 2005).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo dos efeitos de flavonóides e do medicamento Neotaxel[®] (controle positivo) em modelos animais com tumor ascítico de Ehrlich foram realizados dois experimentos:

- 1^o experimento: foram estudados os flavonóides rutina, naringina, rutina + naringina como possíveis agentes preventivos da multiplicação celular tumoral, *in vivo*.

- 2^o experimento: foram estudados os flavonóides rutina, naringina, rutina + naringina como possíveis agentes medicamentosos no tratamento do tumor ascítico de Ehrlich e o quimioterápico Neotaxel[®].

4.1. ANIMAIS

Para a realização do presente estudo, utilizaram-se 202 camundongos albinos Swiss, não isogênicos, machos, com 6-8 semanas de idade, pesando de 20 a 25 g, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Durante o período de realização do estudo, os animais permaneceram em sala experimental do Laboratório de Biofármacos da UFV, alojados em caixas de policarbonato, com período de 12 horas claro-escuro, temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade de 45-65%. Os animais permaneceram durante cinco dias, no referido laboratório, em período de adaptação antes de iniciar os tratamentos. No período de experimentação os animais receberam água e ração comercial balanceada (Labina[®]) *ad libitum*.

4.2. OBTENÇÃO DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH

As células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) encontravam-se congeladas em nitrogênio líquido e foram cedidas pelo Laboratório de Biologia do Câncer do Departamento de Biologia Animal da UFV, coordenado pelo Professor Dr. Marcelo José Vilela. Para manutenção do TAE em laboratório, descongelou-se a temperatura ambiente uma alíquota de 500µL de células tumorais que foram inoculadas intraperitonealmente, com auxílio de seringas de insulina em camundongos receptores. Para a manutenção do tumor foram colhidos de animais portadores cerca de 0,3 mL do fluido ascítico contendo aproximadamente 10^8 células tumorais e inoculados por via intraperitoneal em camundongos receptores (normais). Esse procedimento foi repetido a cada 10 dias durante 30 dias.

4.3. PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS PARA INOCULAÇÃO

Para obtenção das células tumorais para serem inoculadas, os camundongos foram eutanasiados com uma superdosagem de éter etílico por inalação e em seguida imersos em álcool 70° por 5 minutos. A seguir, sob condições estéreis, em capela de fluxo laminar, foram retirados 5 mL do líquido ascítico da cavidade abdominal e misturados com o mesmo volume de PBS (tampão fosfato salino), pH 7,4 e centrifugados a $7100 \times g$ por 5 minutos para lavagem das células. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em tubos de centrífuga com PBS, sendo este procedimento repetido por 3 vezes.

Foram feitas contagens das células pelo método de exclusão com azul de tripano (responsável pela coloração de todas as células mortas presentes na amostra) a 0,4%, utilizados na proporção 1:1. Para contagem das células utilizou-se Hemocítômetro de Neubauer, contando as células dos quatro quadrados externos e no quadrado central. As células que apresentaram coloração azul eram consideradas inviáveis levando em consideração a viabilidade maior que 90%.

4.4. INOCULAÇÃO DOS ANIMAIS

Após a contagem das células, preparou-se uma suspensão de $1,66 \times 10^4$ cel/100 μ L em PBS pH 7,4, sendo inoculada por via intraperitoneal nos camundongos.

4.5. GRUPOS E PROTOCOLOS DE TRATAMENTO

O trabalho foi dividido em duas etapas distintas, onde na primeira etapa foi feito um estudo de prevenção com os flavonóides, na segunda etapa, um estudo de tratamento com os flavonóides sobre o TAE .

4.5.1. PRIMEIRO EXPERIMENTO - PREVENÇÃO DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH COM FLAVONÓIDES

Nessa primeira etapa, os camundongos foram tratados com uma emulsão (água e óleo mineral, 1:1) de flavonóides que foram administrados por gavagem (figura 9) na concentração de 10 mg/Kg (para os flavonóides rutina, naringina) e 5 mg/Kg de cada na associação de, rutina + naringina durante um período de 20 dias como descrito na tabela 2.

Os flavonóides foram obtidos da SIGMA[®].



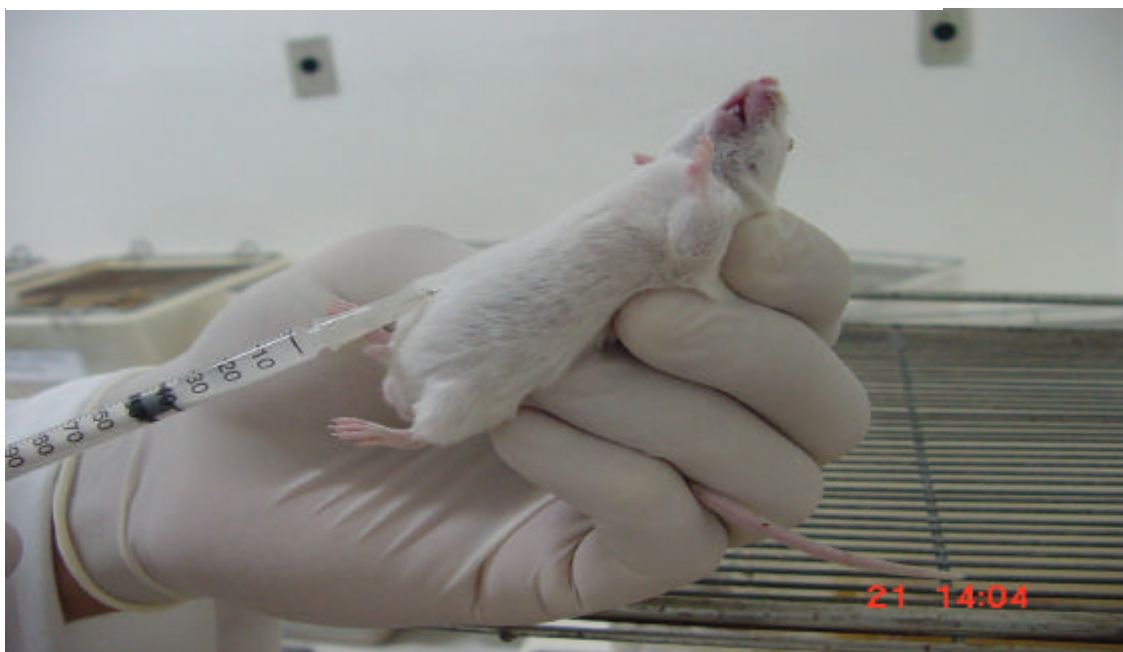
Figura 9 - Adm flavonóides atra

Tabela 2 – Distribuição dos animais por grupo.

Grupos	Número de animais	Tratamentos
Grupo 1 – animais não inoculados com TAE	12	Ração (R)
Grupo 2 – animais com TAE	14	Ração (R)
Grupo 3 – animais tratados	14	R + Rutina
Grupo 4 - animais tratados	14	R + Naringina
Grupo 5 – animais tratados	14	R + Rutina + Naringina

No 21-º dia após o tratamento diário com os flavonóides, procedeu-se a inoculação das células tumorais do tumor ascítico de Ehrlich ($1,66 \times 10^4$ cel/100 μ L em PBS pH 7,4) por via intraperitoneal conforme a figura 10. Nesse mesmo dia foi suspenso o tratamento com os flavonóides.

Figura 10 – Inoculação intraperitoneal das células tumorais.



Após 18 dias de inoculação (39-º de experimentação) os animais foram eutanasiados para execução das análises propostas no (item 4.6).

4.5.2. SEGUNDO EXPERIMENTO - TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS COM TAE COM FLAVONÓIDES

No segundo experimento avaliou-se o efeito dos flavonóides no tratamento de animais com TAE.

Os camundongos foram inoculados com as células tumorais do TAE por via intraperitoneal na concentração de $1,66 \times 10^4$ cel/100 μ L em PBS, pH 7,4. Após 24 horas de inoculação, iniciou-se o tratamento com os flavonóides na dosagem de 10mg/kg durante 18 dias conforme a tabela 3 .

Tabela 3 - Distribuição dos animais em cada grupo e seus respectivos tratamentos.

Grupos	Número de animais	Tratamentos
Grupo 1 – animais não inoculados com TAE	12	Ração (R)
Grupo 2 – animais com TAE	16	Ração (R)
Grupo 3 – animais com TAE tratados	16	R + Rutina
Grupo 4 - animais com TAE tratados	16	R + Naringina
Grupo 5 – animais com TAE tratados	16	R + Medicamento Neotaxel [®]
Grupo 6- animais com TAE tratados	16	R + Rutina + Naringina

4.5.3. NEOTAXEL

O medicamento Neotaxel[®] foi cedido pela empresa Quiral Química do Brasil S.A. A administração do medicamento Neotaxel[®] ocorreu em dose única por via endovenosa na veia da cauda do camundongo na dosagem de $100\text{mg}/\text{m}^2$ (1 quilograma de peso corporal é equivalente a $6,6 \text{ m}^2$) , após 24 horas da inoculação das células tumorais.

As informações abaixo foram retiradas da bula do medicamento Neotaxel[®] , produzido pela empresa Quiral Química do Brasil S.A.

Docetaxel é um agente antineoplásico pertencente à família dos taxóides. É preparado por semi-síntese, sendo o seu precursor extraído de uma fonte renovável de folhas de espécies do gênero *Taxus*. É um pó quase branco, com fórmula empírica $C_{43}H_{53}NO_{14}$ e massa molecular de 807,9.

O docetaxel, princípio ativo do Neotaxel[®] é um agente que atua promovendo a agregação das tubulinas na formação de microtúbulos estáveis, inibindo a sua despolimerização, causando a diminuição da tubulina livre. A ligação do docetaxel aos microtúbulos não altera o número de protofilamentos.

O docetaxel tem demonstrado, *in vitro*, romper a rede de microtúbulos, a qual é essencial para a interfase vital e função mitótica da célula. Mostrou ser citotóxico, *in vitro*, contra várias linhagens de células tumorais humanas e de roedores. Mostrou também ser ativo em linhagens celulares, destacando-se a p-glicoproteína, a qual é codificada por um gene multirresistente à drogas. *In vitro*, docetaxel demonstrou experimentalmente ter um largo espectro de atividade antitumoral contra enxertos tumorais avançados em humanos e roedores.

Baseado em estudos *in vitro*, isoenzimas do citocromo P450 parecem estar envolvidas no metabolismo do docetaxel. Cerca de 95% desse medicamento se encontra ligado às proteínas plasmáticas.

É indicado no tratamento de câncer de mama localmente avançado ou metastático, após falha na quimioterapia prévia. Também em câncer de pulmão e carcinoma metastático de ovário.

4.6. EUTANÁSIA DOS CAMUNDONGOS, COLETA DE SANGUE, COLETA DE LÍQUIDO ASCÍTICO E COLETA DO FÍGADO PARA HISTOPATOLOGIA.

Após 18 dias da inoculação das células tumorais, os animais sofreram eutanásia e retirou-se o sangue por punção cardíaca com auxílio de uma seringa de 5 mL. As amostras de sangue dos animais foram centrifugadas a $7100 \times g$ durante 15 minutos para obtenção do soro. As dosagens sorológicas de proteínas totais, alanina aminotransferase (ALT ou TGP), aspartato aminotransferase (AST ou TGO) e albumina foram efetuadas

no equipamento de dosagens multiparamétrico de Bioquímica (Alizé) utilizando kits da marca BioMérieux®.

Com o auxílio de uma seringa de 10 mL foi coletado todo o líquido ascítico da cavidade abdominal do camundongo, sendo este colocado em proveta graduada para mensuração do volume. Para a contagem das células presentes nesse líquido, foi retirado uma alíquota de 100 µL do líquido ascítico e colocado em um ependorf contendo 100 µL de azul de tripano e 800 µL de solução fisiológica (NaCl, 0,9%) . As células foram contadas em Hemocitômetro de Neubauer usando a técnica de exclusão pelo azul de tripano.

As amostras do líquido ascítico dos animais foram centrifugadas a 7100 \times g durante 15 minutos para precipitação das células. As dosagens no líquido ascítico de proteínas totais, alanina aminotransferase (ALT ou TGP), aspartato aminotransferase (AST ou TGO) e albumina foram efetuadas no equipamento de dosagens multiparamétrico de Bioquímica (Alizé) utilizando kits da marca BioMérieux®.

Após a retirada do sangue e líquido ascítico, foram coletados fragmentos de fígado para análise histopatológica verificando a adesão de células tumorais e focos metastáticos. Os fragmentos coletados foram imediatamente colocados em formol neutro tamponado a 10%, sendo que após as primeiras 6 horas de fixação foram recortados em fragmentos menores de aproximadamente 5 mm de espessura e colocados novamente em formol por 24 horas. Decorrido esse tempo, foram desidratados em soluções crescentes de álcoois 70°, 80°, 90° e 100%, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e cortados em micrótomo de rotação na espessura de 5 µm e estendidos em lâmina de vidro com polipec, sendo corados pela hematoxilina/eosina (H&E).

4.7. ANÁLISE DO TEMPO DE VIDA

Para avaliar a mortalidade dos animais foi registrada diariamente a ocorrência de morte dos mesmos para posterior confecção da curva de mortalidade. O ponto final do experimento foi determinado pela morte espontânea dos animais.

O tempo médio de sobrevivência dos animais (MST) e a porcentagem de aumento do tempo de sobrevivência (%ILS) foram avaliados durante 40 dias. A %ILS e MST foi calculada usando a equação segundo GUPTA et al (2004):

$$\text{MST} = \frac{(\text{1}^{\circ} \text{ dia de morte} + \text{último dia de morte})}{2}$$

$$\text{ILS}(\%) = \left[\frac{\text{MST grupo tratado}}{\text{MST grupo controle}} - 1 \right] \times 100$$

De acordo com ORSOLIC (2005) e GUPTA et al (2004) se a MTS dos grupos tratados dividido pela média do tempo de sobrevivência do grupo controle exceder 125% e ILS exceder 25%, é um indicativo que a droga testada possui uma atividade antitumoral significativa.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias dos tratamentos (ou grupos) foram comparadas por meio do teste t para amostras independentes, adotando-se $\alpha = 5\%$ como nível de significância. (Banzatto e Kronka, 1989; Gomes, 1985). A comparação entre os tempos foi feita por meio do teste F de Snedecor, também adotando-se $\alpha = 5\%$ como nível de significância, uma vez que a relação $F = t^2$ é válida quando se comparam apenas dois tratamentos.

O programa estatístico utilizado para efetuar os testes foi o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas, desenvolvido pelo Prof. Ricardo Frederico Euclides, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa-MG.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PREVENÇÃO DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich (TAE) EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM DIFERENTES FLAVONÓIDES POR 20 DIAS.

Na tabela 4 são apresentados os níveis médios de proteínas totais de camundongos tratados com flavonóides com posterior indução do Tumor ascítico de Ehrlich (TAE).

Tabela 4 - Valores médios de proteínas totais (\pm desvio padrão) no soro sanguíneo de camundongos tratados com flavonóides por 20 dias com posterior indução do tumor ascítico de Ehrlich

Tratamentos	Proteínas Totais (g/dl) 21 dias	Proteínas Totais (g/dl) 39 dias
Ração (G1)	55,9 \pm 3,67 a	-----
Ração + câncer induzido (G2)	-----	48,8 \pm 9,08 a
Ração + Rutina (G3)	53,12 \pm 7,94 Aab	60,13 \pm 36,7 Aa
Ração + Naringina (G4)	49,76 \pm 3,03 Bb	66,26 \pm 10,2 Aa
Ração + Rutina + Naringina (G5)	54,70 \pm 8,37 Aab	66,32 \pm 21,99 Aa

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$). Em cada tratamento A difere de B (na horizontal) pelo teste F ($P < 0,05$).

De acordo com os resultados bioquímicos, obtidos na tabela acima, observou-se que os animais tratados com os flavonóides Rutina (G3), Naringina (G4) e associação de Rutina + Naringina (G5) apresentaram valores médios de proteínas totais circulantes

próximos ao valor médio do grupo controle normal (G1) grupo esse, não submetido a nenhuma forma de tratamento durante o experimento.

Esses resultados são importantes considerando que a maioria das proteínas plasmáticas são sintetizadas pelo fígado. Sendo assim, a variação não significativa nos níveis desse parâmetro são indícios que os flavonóides testados não causam toxicidade aos hepatócitos.

As proteínas plasmáticas representam um grupo heterogêneo, de diferentes pesos moleculares. Consistem basicamente de albumina, que é a menor e a de maior ocorrência, -globulinas, -globulinas, -globulinas e fibrinogênio. Quando dosadas no soro, apresentam um valor menor do que no plasma, já que o fibrinogênio é perdido na formação do coágulo (AMARAL, 1996). Elas são o principal componente do tecido muscular, dos hormônios e das enzimas, e correspondem aos anticorpos, elementos de defesa orgânica do animal contra doenças (MELLO, 1988).

É importante ressaltar, que apenas o grupo (G4), após 20 dias de tratamento, apresentou um redução nos níveis de proteínas totais circulantes estatisticamente significativos em relação ao grupo (G1). Valores diminuídos na concentração de proteínas totais do soro sanguíneo podem estar relacionados com doenças renais, hepáticas ou em casos de hiperhidratação, desnutrição grave, síndrome de má absorção, deficiência de cálcio e de vitamina D (MEYER et al, 1992).

Outro fato, importante a ser relatado foi o aumento durante o período experimental de 34% nos níveis de proteínas totais circulantes ocorrido no grupo (G4) e essa variação foi estatisticamente significativa. Nota-se, no entanto, que no 21º dia de experimentação todos os animais encontravam-se normais (não haviam sido submetidos a indução carcinogênica por TAE), recebendo apenas os flavonóides, e após 38º dias todos os animais encontravam-se doentes apresentado sinais claros de ascite.

Na tabela 5 encontram-se registrados os valores médios de Aspartato Amino Transferase (também chamada de AST ou GOT ou TGO) do soro sanguíneo de camundongos, tratados durante 20 dias com flavonóides, com posterior indução do tumor ascítico de Ehrlich.

De acordo com os resultados bioquímicos obtidos na tabela 5 pode-se observar que não ocorreram variações estatisticamente significativas nos níveis de atividade de

(AST) após 21º dias de experimentação, entre os grupos submetidos aos diferentes tratamentos. Resultados semelhantes ocorreram aos 39º dias de experimentação.

Tabela 5 - Valores médios de aspartato aminotransferase (\pm desvio padrão) no soro sanguíneo de camundongos tratados com flavonóides por 20 dias com posterior indução do tumor ascítico de Ehrlich

Tratamentos	AST (U/ml) 21 dias	AST (U/ml) 39 dias
Ração (G1)	587,56 \pm 75,60 a	-----
Ração + câncer induzido (G2)	-----	2021,25 \pm 492,11 a
Ração + Rutina (G3)	333,36 \pm 176,28 Ba	1276,85 \pm 1006,78 Aa
Ração + Naringina (G4)	700,96 \pm 487,03 Ba	1680,88 \pm 282,97 Aa
Ração + Rutina + Naringina (G5)	561,34 \pm 371,78 Ba	2076,58 \pm 1204,68 Aa

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$). Em cada tratamento A difere de B (na horizontal) pelo teste F ($P < 0,05$).

A transaminase (AST) é uma enzima hepática cujo nível no sangue aumenta freqüentemente, mas não sempre, quando há lesões das células hepáticas (hepatócitos) provocadas por qualquer tipo de agressões, como vírus da hepatite (A, B ou C), consumo excessivo de álcool, processos carcinogênicos ou drogas. Existem no fígado mais de 60 reações que produzem transaminases, porém as únicas com valor clínico são a AST (também conhecida pelas siglas GOT, ASAT, TGO ou SGOT) e a ALT (também conhecida pelas siglas GPT, ALAT, TGP ou SGPT), sendo que, estas não são produzidas exclusivamente no fígado e se encontram extensamente distribuídas pelo organismo (VARALDO, 2005).

Comparando-se os valores médios das atividades de (AST) aos 21º- dia e aos 39º- dia de experimentação, entre os grupos submetidos ao mesmo tratamento, notou-se um aumento abrupto na atividade enzimática da transaminase, valores esses, estatisticamente significativos nos grupos (G3), (G4) e (G5). Lembrando sempre, que os animais sofreram indução carcinogênica após o vigésimo dia de tratamento hipótese essa que pode elucidar o aumento abrupto nos níveis de AST.

Como podemos observar na tabela acima, os flavonóides testados não desencadearam um aumento na atividade de AST após 21-º dias de tratamento, mas um aumento estatisticamente significativo foi observado após a inoculação de células do TAE nos animais.

A AST é uma enzima catalítica encontrada primariamente no coração, fígado e tecido muscular sendo que, níveis altos de AST na corrente sanguínea nem sempre indicam danos hepáticos. Por exemplo, até mesmo exercícios vigorosos podem elevar os níveis de AST no corpo. Essa transaminase catalisa a reação do ácido oxaloacético + ácido glutâmico para produzir ácido α -cetoglutarico + ácido aspártico. As variações na atividade dessa enzima podem ser encontradas em hepatites infecciosas, hepatopatias crônicas, carcinomas hepáticos e infarto do miocárdio (LIMA, 2003).

Na tabela 6 encontram-se registrados os valores médios de Alanina amino transaminase (também chamada de ALT ou GPT ou TGP) do soro sanguíneo de camundongos, tratados durante 20 dias com flavonóides, com posterior indução do tumor ascítico de Ehrlich.

Tabela 6 - Valores médios de alanina aminotransferase (\pm desvio padrão) no soro sanguíneo de camundongos tratados com flavonóides por 20 dias com posterior indução do tumor ascítico de Ehrlich

Tratamento	ALT (U/ml) 21 dias	ALT (U/ml) 39 dias
Ração (G1)	50,00 \pm 17,79 a	-----
Ração + câncer induzido (G2)	-----	53,40 \pm 18,23 a
Ração + Rutina (G3)	29,2 \pm 4,55 Abc	43,25 \pm 19,41 Aa
Ração + Naringina (G4)	25,20 \pm 4,92 Ac	58,99 \pm 36,59 Aa
Ração + Rutina + Naringina (G5)	38,60 \pm 13,54 Aab	30,20 \pm 16,05 Aa

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$). Em cada tratamento A difere de B (na horizontal) pelo teste F ($P < 0,05$).

De acordo com os resultados bioquímicos obtidos na tabela 6, no 21º dia de experimentação, os grupos submetidos ao tratamento com os flavonóides rutina (G3) e naringina (G4) apresentaram atividade enzimática de ALT reduzida em relação ao grupo ração (G1) e essa variação foi estatisticamente significativa.

A alanina aminotransferase (ALT) também é responsável por reações de transaminações (LIMA, 2003). A ALT é uma enzima produzida pelo fígado e encontrada em certos líquidos corporais (bile, líquido cefalorraquidiano, plasma, saliva), no fígado, na musculatura esquelética, no pâncreas e nos rins. Sua dosagem é comumente efetuada para avaliar lesões hepáticas, quando seus níveis podem aumentar e atingir até 50 vezes seu valor normal (MEYER, 1992).

Os valores bioquímicos de ALT encontrados no trabalho reforçam a premissa de que os flavonóides testados em nosso experimento, na concentração de 10mg/Kg, não desencadearam lesões hepáticas nos animais. Segundo Coles (1986b) esta enzima está presente em grandes quantidades no citoplasma dos hepatócitos. A pequena quantidade existente no soro é decorrente da substituição fisiológica de algumas células do tecido hepático, com a subsequente liberação da enzima. O aumento da atividade sérica reflete anormalidade das células hepáticas.

A ALT estará aumentada no soro quando houver degeneração ou necrose do fígado; nestes casos ocorre extravazamento da enzima do citoplasma do hepatócito para o sangue. Meyer et al. (1992a) acrescentaram que a ALT estará aumentada no soro também por processos que alterem a permeabilidade de membrana dos hepatócitos, como agressão por toxinas e hipóxia.

Na tabela 7 encontram-se registrados os valores médios de Albumina (g/dl) do soro sanguíneo de camundongos, tratados durante 20 dias com flavonóides, com posterior indução do tumor ascítico de Ehrlich.

Tabela 7 - Valores médios de albumina (\pm desvio padrão) no soro sanguíneo de camundongos tratados com flavonóides por 20 dias com posterior indução do tumor ascítico de Ehrlich.

Tratamentos	Albumina (g/dl) 21 dias	Albumina (g/dl) 39 dias
Ração (G1)	3,78 \pm 0,25 Aa	-----
Ração + câncer induzido (G2)	-----	3,48 \pm 0,44 ab
Ração + Rutina (G3)	3,37 \pm 0,48 Aa	2,90 \pm 0,88 Aab
Ração + Naringina (G4)	2,28 \pm 1,19 Bb	3,74 \pm 0,58 Aa
Ração + Rutina + Naringina (G5)	3,76 \pm 0,45 Aa	2,86 \pm 0,69 Bb

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$). Em cada tratamento A difere de B (na horizontal) pelo teste F ($P < 0,05$).

De acordo com os resultados bioquímicos obtidos, no 21º dia de experimentação, observou-se que as concentrações de albumina sofreram uma redução estatisticamente significativa apenas no grupo dos animais submetidos ao tratamento com naringina (G4) em relação ao grupo ração (G1). Sendo assim, a redução dos níveis de albumina no grupo (G4) desencadeou conseqüentemente, uma redução dos níveis de proteínas totais presentes no soro sanguíneo dos animais do mesmo grupo, pois estes

parâmetros encontram-se correlacionados. Nesse estudo, essa correlação pode ser observada, pois o tratamento com o flavonóide naringina (G4) apresentou valores estatisticamente significativos também na redução de proteína totais em comparação com o grupo ração (G1).

Pode-se observar também, que os níveis de albumina no grupo (G4) apresentaram um aumento estatisticamente significativo ao longo do tempo de experimentação como pode ser comprovado em análises bioquímicas realizadas no mesmo grupo aos 21º e 39º dias. Segundo Meyer, (1992) valores elevados de albumina podem ocorrer em carcinomatose metastática, colite ulcerativa, nefrose, neoplasias entre outras.

Outro fato observado foi que a associação entre os flavonóides rutina + naringina grupo (G5) sofreu um redução estatisticamente significativa nas concentrações de albumina ao longo do experimento.

Os valores referentes ao número de células tumorais vivas presentes no líquido ascítico encontram-se registrados na tabela 8.

Tabela 8 - Efeito dos flavonóides na prevenção do TAE. Número de células tumorais viáveis (\pm desvio padrão) presentes no líquido ascítico dos camundongos

<i>Tratamento</i>	<i>Células tumorais viáveis ($N \times 10^7$)</i>
<i>Ração + Animal com câncer (G2)</i>	10,84 \pm 1,44 a
<i>Ração + Rutina (G3)</i>	4,99 \pm 1,54 b
<i>Ração + Naringina (G4)</i>	6,78 \pm 1,24 b
<i>Ração + Rutina + Naringina (G5)</i>	5,95 \pm 1,97 b

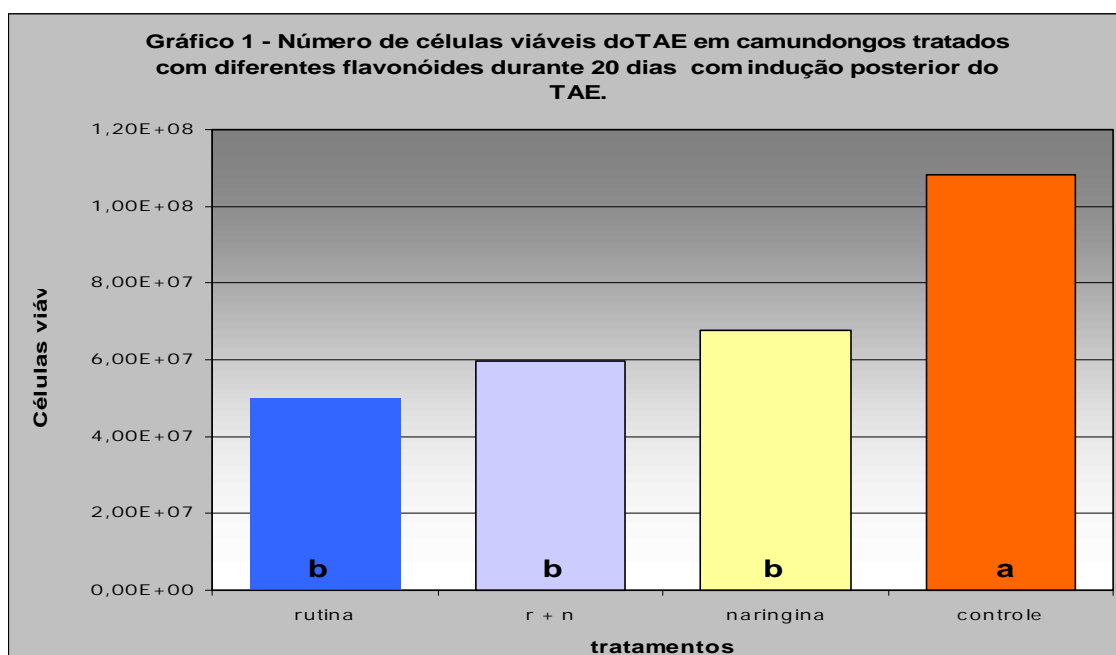
Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos na tabela 8 observou-se que os grupos submetidos a diferentes tratamentos com flavonóides, como forma de prevenção, apresentaram resultados estatisticamente significativos na redução do número de células tumorais viáveis do líquido ascítico de camundongos em comparação com o grupo (G2). Os tratamentos (G3), (G4) e (G5) não diferem estatisticamente na redução no número de células viáveis.

Kennedy, (2002) demonstrou que o extrato de chá verde, galoil polifenol e epigallocatequinas (ricos em flavonóides) têm demonstrado possuir efeito inibitório nas

células do TAE e muitos mecanismos têm sido elucidados. Muitos deles incluem redução da atividade da ornitina descarboxilase, glutatona celular e de proteínas que contêm o grupo SH. Polifenóis e flavonóides causam paralisação do ciclo celular na fase G0-G1, levando subsequentemente a apoptose.

Os resultados da ação dos flavonóides na redução do número de células vivas presentes no líquido ascítico de camundongos pode ser melhor visualizado no gráfico 1.



Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

Os valores referentes ao número de células tumorais mortas presentes no líquido ascítico encontram-se registrados na tabela 9.

Tabela 9 - Efeito dos flavonóides na prevenção do TAE. Número de células tumorais mortas (\pm desvio padrão) presentes no líquido ascítico dos camundongos

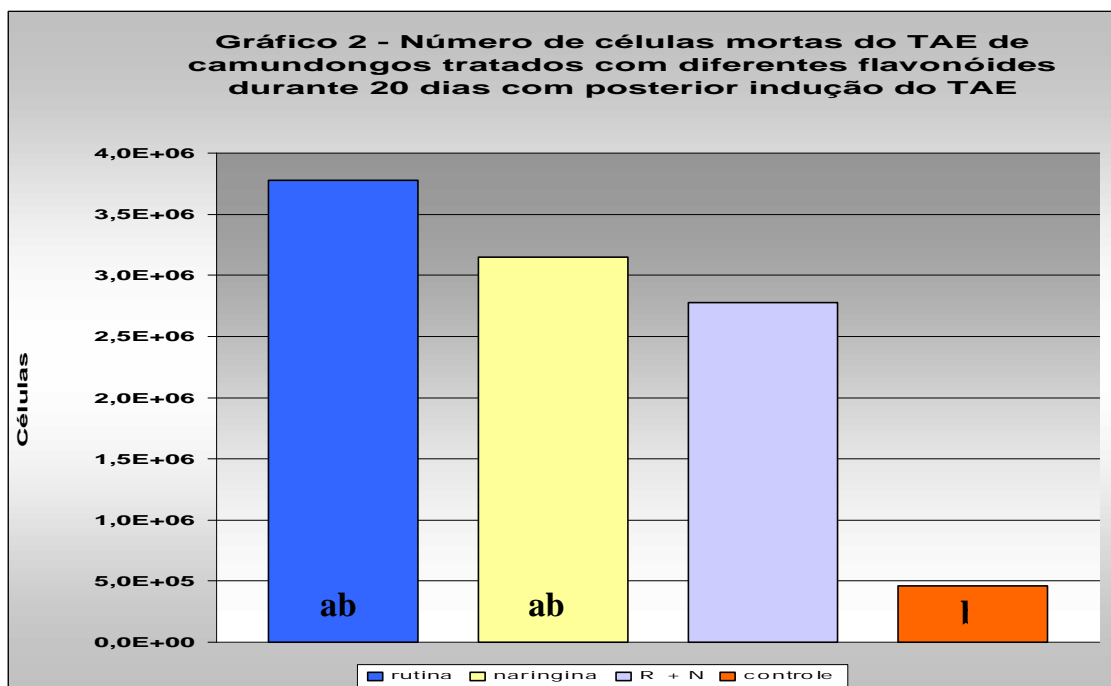
Tratamento	Células tumorais mortas ($N \times 10^7$)
Ração + Animal com câncer (G2)	0,046 \pm 0,020 b
Ração + Rutina (G3)	0,378 \pm 0,090 a
Ração + Naringina (G4)	0,315 \pm 0,177 ab
Ração + Rutina + Naringina (G5)	0,278 \pm 0,198 ab

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

De acordo com a tabela 9, pode-se observar que o número de células tumorais mortas do grupo tratado com o flavonóide rutina aumentou de forma estatisticamente significativa em relação ao grupo (G2).

Os flavonóides podem exercer efeitos modulatórios nas células, independentes da sua atividade antioxidante clássica, através de ações seletivas em diferentes rotas de sinalização das proteínas quinases. Ações inibitórias ou estimuladoras dessas rotas afetam profundamente a função celular por alterar a fosforilação de moléculas alvos e/ou por modular a expressão gênica. Ações inibitórias seletivas dessas quinases podem ser benéficas no tratamento do câncer, doenças proliferativas, inflamação e neurodegeneração que podem ser deteriorantes durante o desenvolvimento (WILLIAMS, 2004). Quercetina e genisteína inibem a proteína tirosina quinase que também está envolvida na proliferação celular.

Os resultados das ações dos flavonóides na indução da mortalidade de células presentes no líquido ascítico de camundongos, pode ser melhor visualizado no gráfico 2.



Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

Orsolíc (2005) realizou um estudo preventivo com o objetivo de avaliar a atividade terapêutica da própolis e dos flavonóides naringenina, crisina e quercetina em camundongos com TAE. Para realização do estudo os camundongos foram tratados com

50mg/kg desses compostos, por via oral, por 7º dias e no 8º dia ocorreu a indução do TAE. As análises de viabilidade celular, volume do líquido ascítico e número de células tumorais totais foram realizadas no 14º dia de experimentação. Esse autor afirma que a atividade terapêutica da própolis é dependente principalmente da presença de flavonóides, entre eles, quercetina, naringenina, crisina, galangina, etc. Quando foi avaliado o número de células tumorais mortas, observou-se um aumento de 4,3% no número dessas células quando os animais foram tratados com o flavonóide naringenina comparado ao grupo de animais com TAE não tratados e de 3,79% quando utilizado o flavonóide quercetina. Esse mesmo pesquisador afirma que a combinação de flavonóides apresenta melhores resultados na redução do número de células tumorais mamárias induzidas por DMBA e em cultura de células mamárias humanas da linhagem MDA-MB-435.

Os resultados encontrados nesse trabalho estão de acordo com os resultados de Orsolíc (2005). Ao avaliar o número de células tumorais mortas contidas no líquido ascítico dos camundongos com TAE tratados como a associação dos flavonóides rutina + naringina encontrou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de células tumorais mortas quando comparado aos animais do grupo com TAE não tratados.

Na tabela 10 encontram-se expostos os valores encontrados na contagem das células tumorais totais presentes no líquido ascítico dos diferentes grupos.

Tabela 10 - Efeito dos flavonóides na prevenção do TAE. Número de células tumorais totais (\pm desvio padrão) presentes no líquido ascítico dos camundongos

<i>Tratamento</i>	<i>Células tumorais totais ($N \times 10^7$)</i>
<i>Ração + Animal com câncer (G2)</i>	10,89 \pm 1,46 a
<i>Ração + Rutina (G3)</i>	5,37 \pm 1,63 b
<i>Ração + Naringina (G4)</i>	7,10 \pm 1,22 b
<i>Ração + Rutina + Naringina (G5)</i>	6,23 \pm 2,17 b

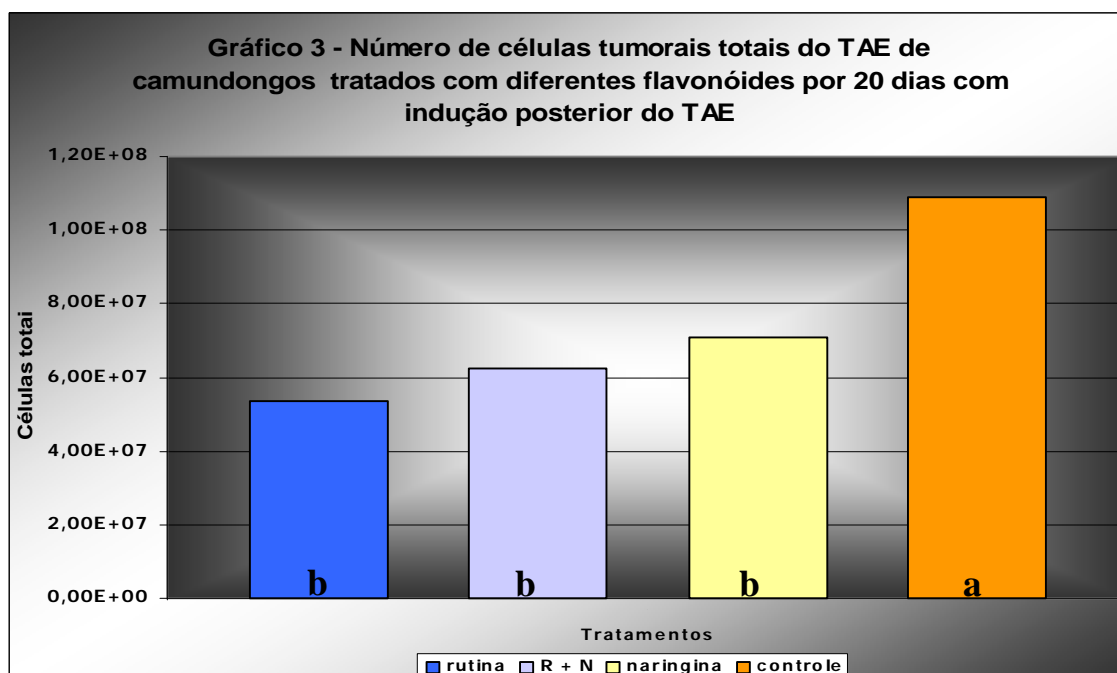
Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

Como pode-se observar na tabela 10 os grupos (G3), (G4) e (G5) apresentaram menores valores, referentes a totalidade de células, comparado ao grupo (G2) e esses valores foram estatisticamente significativos. Os resultados encontrados nesse estudo estão de acordo com os resultados encontrados por Orsolíc (2005) que constatou em seu

estudo preventivo uma redução estatisticamente significativa de 79% no número de células tumorais totais quando os animais foram tratados com própolis; 74% quando tratados com o flavonóide naringina e 57% com o flavonóide quercetina.

Quando comparou-se a eficácia na redução do número de células tumorais, entre os grupos (G3), (G4) e (G5) pode-se observar que não ocorreram variações estatisticamente significativas entre eles. Através dessa análise matemática, pode-se afirmar que os diferentes tratamentos apresentaram um mesmo padrão de redução no número total de células tumorais no líquido ascítico de camundongos.

Esses dados podem ser melhor visualizados no gráfico 3.



Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

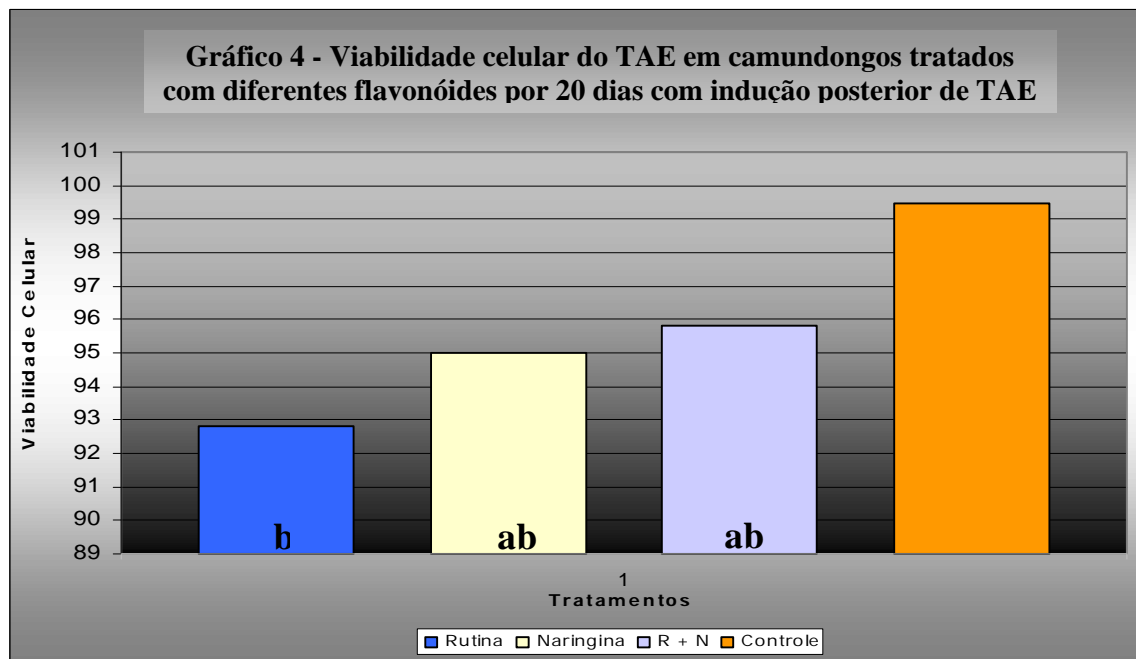
Os resultados referentes a viabilidade celular tumoral de Ehrlich encontram-se registrados na tabela 11.

De acordo com os resultados obtidos para a viabilidade celular observou-se que os grupos submetidos a diferentes tratamentos com flavonóides, como forma de prevenção da multiplicação celular tumoral, apresentaram resultados estatisticamente significativos apenas, quando os animais foram submetidos ao tratamento com o flavonóide rutina (G3) comparando ao grupo (G2). Esse resultado pode ser melhor visualizado no gráfico 4.

Tabela 11 - Efeito dos flavonóides na prevenção do TAE. Viabilidade celular \pm desvio padrão presente no líquido ascítico dos camundongos

Tratamento	Viabilidade celular (%)
Ração + Animal com câncer (G2)	99,5 \pm 0,12 a
Ração + Rutina (G3)	92,8 \pm 0,61 b
Ração + Naringina (G4)	95,0 \pm 2,00 ab
Ração + Rutina + Naringina (G5)	95,8 \pm 1,91 ab

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos de uma mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).



Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

Segundo Woo (2005), flavonóides inibem a proliferação celular pela modulação da atividade de ciclinas dependente de quinase, moléculas chave envolvidas na regulação do ciclo celular. Os flavonóides causam paralisação do crescimento de células tumorais por impedirem a progressão da fase G0-G1 do ciclo celular, levando subsequentemente a célula a apoptose. A paralisação do ciclo celular é mediada através da indução de fatores nucleares e da baixa modulação da ciclina D1 e E. Essa paralisação também pode estar associada com a inibição de CDK2, CDK 4 e CDK5 pela expressão de inibidores de cdk (p21 e p27).

Orsolice (2005) observou em seu estudo que os animais tratados com o flavonóide quercetina apresentaram no líquido ascítico uma viabilidade celular de

96,21%, e de 95,7% quando os animais foram tratados com o flavonóide naringenina. Sendo assim, os resultados encontrados nesse trabalho estão em concordância com os resultados encontrados por Orsolíc (2005). Em nosso estudo foi constatado que os animais tratados, com o flavonóide rutina, apresentaram uma viabilidade celular de 92,8%.

Na tabela 12 encontram-se destacados os valores referentes ao volume do líquido ascítico, acumulado ao longo do experimento, na cavidade abdominal dos animais.

Tabela 12 - Efeito dos flavonóides na prevenção do TAE. Volume do líquido ascítico(± desvio padrão) dos camundongos

<i>Tratamento</i>	Volume do líquido ascítico (mL)
<i>Ração + Animal com câncer (G2)</i>	14,9 ± 2,35 b
<i>Ração + Rutina (G3)</i>	27,0 ± 6,36 a
<i>Ração + Naringina (G4)</i>	16,9 ± 2,71 ab
<i>Ração + Rutina + Naringina (G5)</i>	23,7 ± 4,8 a

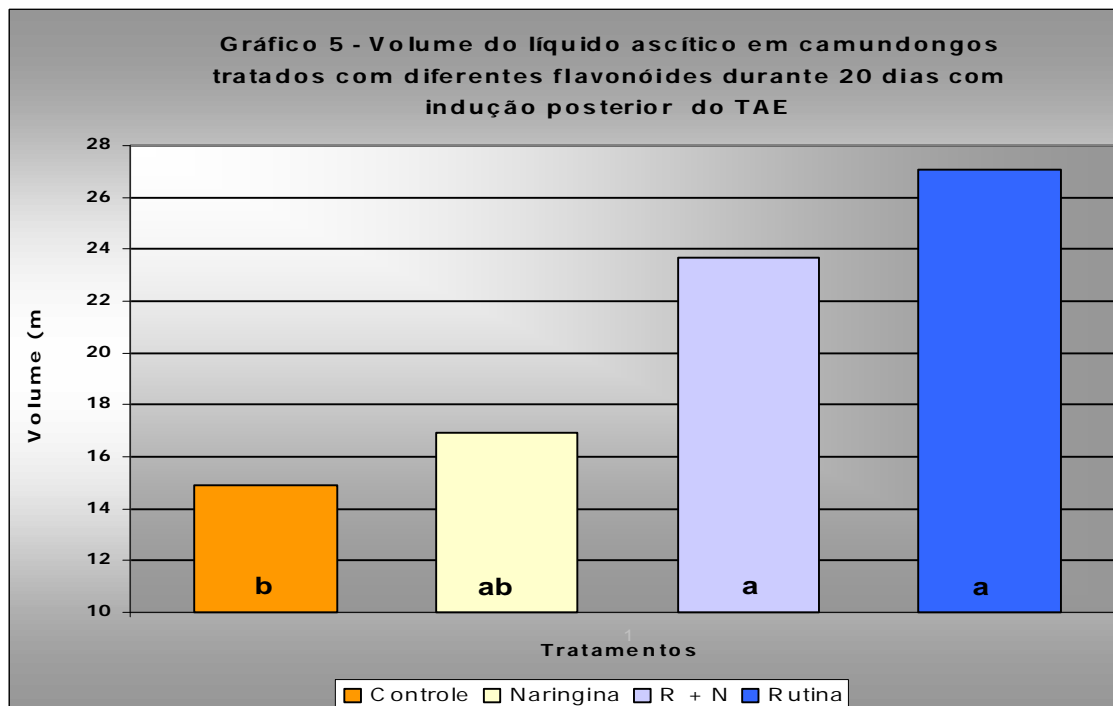
Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos observou-se que o grupo (G3), tratado com o flavonóide rutina, apresentou o maior valor em volume de líquido ascítico presente na cavidade abdominal dos animais quando comparado aos demais grupos. Valor esse, estatisticamente significativo em relação ao grupo (G2).

Orsolíc (2005), ao realizar seu estudo de prevenção com os flavonóides quercetina, naringenina administrados de forma oral e intraperitoneal, observou uma redução estatisticamente significativa no volume do líquido ascítico dos animais tratados em relação aos animais com TAE (não tratados). Os dados encontrados em nosso estudo mostraram que os animais tratados com os diferentes flavonóide (rutina, naringina, rutina + naringina) por 20 dias na prevenção do TAE, tiveram um aumento significativo no volume do líquido ascítico. Sendo assim, os resultados encontrados por Orsolíc (2005) não estão em concordância com os resultados encontrados nesse trabalho.

Quando comparou-se os tratamentos (G3), (G4) e (G5) observou-se que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas nos valores referentes ao volume de líquido acumulado na cavidade abdominal dos animais.

Esses resultados podem ser melhor visualizados no gráfico 5.

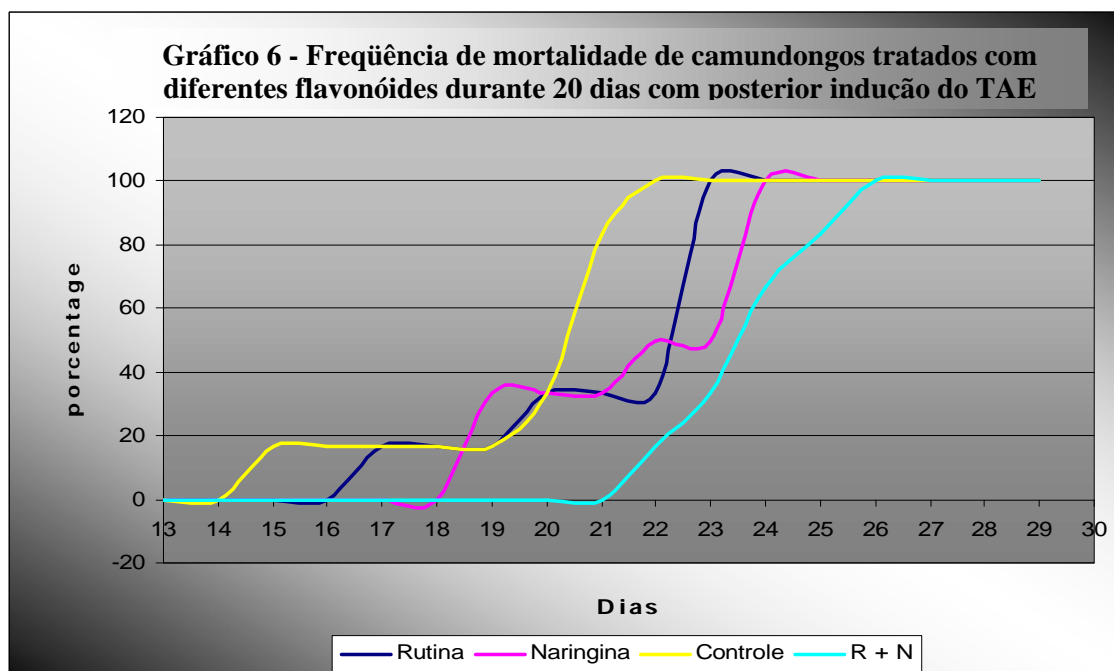


Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

O gráfico 6 destaca os resultados da frequência de mortalidade dos camundongos tratados com diferentes flavonóides por 20 dias com posterior indução do TAE.

De acordo com os resultados obtidos observou-se que o grupo controle, referente aos animais não submetidos a nenhuma forma de tratamento, apresentou taxa de mortalidade acumulada de 80% dos animais aos 21 dias de experimentação. Percentagem de mortalidade ocorrida aos 22 dias ao grupo tratado com o flavonóide Rutina.

O grupo tratado com o flavonóide Naringina apresentou taxa de mortalidade acumulada de 80% da população de camundongos aos 23 dias. Quando os flavonóides Rutina e Naringina foram associados observou-se um sinergismo de adição no potencial terapêutico, fato esse observado pela maior longevidade dos animais com taxa de mortalidade acumulada de 80% da população aos 25 dias de experimentação.



Nesse trabalho os camundongos foram tratados diariamente por 20 dias com 10mg/kg dos diferentes flavonóides por via oral e no 21º dia do experimento ocorreu a indução do TAE. Observou-se um aumento de 8,0 % na expectativa de vida dos camundongos que receberam o flavonóide rutina quando comparado ao grupo controle. Quando os animais foram tratados com a naringina esse aumento foi de 13,5%. A associação dos flavonóides rutina + naringina prolongou a vida dos animais em 29,7%.

De acordo com Orsolich (2005), em um estudo preventivo testando diferentes flavonóides em camundongos com TAE, foi observado um aumento de 15,83% no tempo de vida dos animais que foram tratados com o flavonóide naringenina na concentração de 50mg/kg por 7 dias. Quando o tratamento foi efetuado com a quercetina, o aumento observado foi de 6,66% . O autor afirma que esses tratamentos aumentam o tempo de vida dos animais, confirmando assim, a eficácia dos compostos testados.

Os resultados obtidos nesse experimento estão em concordância com os resultados publicados por Orsolich dessa forma, podemos afirmar que os flavonóides testados aumentam o tempo de vida dos animais com TAE.

A análise do tempo de vida dos animais também foi realizada através de cálculos de MST (Tempo médio de sobrevivência dos animais) e de %ILS (percentagem de aumento do tempo de sobrevivência). Esses resultados podem ser visualizados na tabela 13.

Ao analisar esses resultados observou-se que os flavonóides rutina e naringina quando administrados previamente por 20 dias nos camundongos não possuíram uma atividade antitumoral significativa de acordo com o critério de NCI citado por Orsolich (2005). Pois segundo esse critério, e a MTS dos grupos tratados dividido pela média do tempo de vida do grupo controle exceder 125% e ILS exceder 25%, é um indicativo que a droga testada possui uma atividade antitumoral significativa.

Um atividade antitumoral significativa de acordo com a MTS e ILS pode ser observada apenas na associação das drogas.

Tabela 13 – Atividade preventiva de flavonóides sobre o tempo de vida de camundongos com TAE

Tratamentos	Varição do tempo de vida	MST (d) ^a	ILS (%) ^b	T/C (%) ^c	Eficácia
Ração	15 -22	18,5	-----	-----	
Ração + rutina	17-23	20,0	8,0	108,0	-
Ração + naringina	19-23	21,0	13,5	113,5	-
Ração + rutina + naringina	22-26	20,0	29,7	129,7	+

a) $MST = (1^{\circ} \text{dia de morte} + \text{ultimo dia de morte})/2$; b) $ILS\% = (MST \text{ grupo tratado} / MST \text{ grupo controle}) - 1 \times 100$; c) $T/C\% = (MST \text{ grupo tratado} / MST \text{ grupo controle}) \times 100$

Um atividade antitumoral significativa de acordo com a MTS e ILS pode ser observada apenas na associação das drogas.

5.2 - TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS COM TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH (TAE) COM DIFERENTES FLAVONÓIDES POR 18 DIAS.

Na tabela 14 encontram-se registrados os valores médios de Proteínas Totais do soro sanguíneos de camundongos com Tumor ascítico de Ehrlich tratados durante 18 dias com diferentes flavonóides.

Tabela 14 - Valores médios de proteínas totais (\pm desvio padrão) no soro sanguíneo de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich tratados com flavonóides por 18 dias .

<i>Tratamentos</i>	<i>Proteínas Totais (g/dl) 18 dias</i>
Ração (G1)	54,63 \pm 2,67 b
Ração + Animal com câncer (G2)	48,80 \pm 5,08 c
Ração + Rutina (G3)	74,32 \pm 8,42 a
Ração + Naringina (G4)	64,48 \pm 16,60 ab
Ração + Rutina + Naringina (G5)	52,73 \pm 3,28 bc
Ração + Neotaxel (G6)	60,13 \pm 7,49 b

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos observou-se que o grupo (G2), animais doentes com tumor ascítico de Ehrlich não submetidos a tratamento, apresentou a menor média na concentração de proteínas totais após 18 dias de experimentação. Segundo Meyer, (1992) hipoproteinemia pode ocorrer quando a um aumento do volume plasmático como na emodiluição por intoxicação hídrica, na cirrose ou quando a ascite está presente.

Quando análises foram efetuadas comparando-se os diferentes tratamentos com o grupo (G2) pode-se observar, com exceção do tratamento utilizando a associação Rutina + Naringina, que os diferentes tratamentos desencadearam um aumento nas concentrações de proteínas totais e esses resultados foram estatisticamente significativos. Esses aumentos, nos níveis de proteínas totais pelos flavonóides são de grande importância, pois essas proteínas estão envolvidas com transporte de fármacos, reparo de tecidos lesados e em respostas imunológicas.

De acordo com Meyer, (1992), as proteínas séricas totais sintetizadas no fígado e no sistema retículo-endotelial constituem mais de 100 substâncias diferentes, classificadas como albumina e globulinas. As proteínas séricas são essenciais para

regulação da pressão coloidosmótica. Elas incluem fatores de coagulação, enzimas, hormônios e são responsáveis por crescimento e reparo dos tecidos e tampões de pH, anticorpos, transportam componentes sanguíneos (bilirrubina, cálcio, esteróides, hormônios tireóideos, lipídeos, metais, oxigênio e vitaminas) e são preservadoras dos cromossomos.

É importante observar que os animais com câncer (G2) tiveram menores concentrações plasmáticas de proteínas totais e isso é coerente, pois no processo de carcinogênese diversas proteases são liberadas e suas atividades aumentadas dessa forma, ocorre uma maior degradação protéica, embora formem-se novas proteínas (oncoproteínas).

Na tabela 15 encontram-se registrados os valores médios da atividade de Aspartato Amino Transferase (também chamada de AST ou GOT ou TGO) no soro sanguíneo de camundongos, com tumor ascítico de Ehrlich, tratados durante 18 dias com diferentes flavonóides.

Tabela 15 - Valores médios de Aspartato aminotransferase – AST - (\pm desvio padrão) do soro sanguíneo de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich tratados com flavonóides por 18 dias

<i>Tratamentos</i>	<i>AST (U/ml) 18 dias</i>
Ração (G1)	587,56 \pm 75,60 c
Ração + Animal com câncer (G2)	2021,25 \pm 492,11 c
Ração + Rutina (G3)	4818,63 \pm 698,95 a
Ração + Naringina (G4)	2375,25 \pm 709,73 bc
Ração + Rutina + Naringina (G5)	2949,00 \pm 553,94 b
Ração + Neotaxel (G6)	2803,80 \pm 558,71b

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos, os tratamentos efetuados ao longo do experimento, com exceção do grupo G4, desencadearam um aumento na atividade de (AST) de forma estatisticamente significativa em relação ao grupo G1 e G2.

Gupta e colaboradores 2004 realizaram um estudo com uma planta da Índia, a *Cesalpinia bonducella*, que possui associação de flavonóides, terpenos, saponinas e

alcalóides. Para avaliar a toxicidade da planta em camundongos normais (sem TAE) foram testadas dosagens diferentes (50, 100, 200 e 300mg/kg) do extrato metanólico dessa planta (MECB). Esse extrato foi dissolvido em propileno glicol e administrado intraperitonealmente em camundongos. Após 14 dias de tratamento, foi observado um aumento estatisticamente significativo ($P < 0,05$) na atividade sérica das enzimas (transaminases) quando comparou o grupo controle (animal normal) em relação ao grupo tratado com 300mg/kg do extrato. As demais concentrações desse extrato provocaram um aumento da atividade dessas enzimas, porém esses resultados não foram estatisticamente significativos. Os autores concluíram que uma alta concentração do extrato da planta (300 mg/kg) provocou um aumento na atividade de transaminases indicando assim, a ocorrência de disfunções hepato-renais e alterações no metabolismo.

Os resultados encontrados nesse trabalho demonstraram um aumento na atividade de AST nos grupos (G3), (G5) e (G6) em comparação ao grupo (G2) dessa forma, estes resultados estão em concordância com os resultados de Gupta et al, mas alterações hepato-renais não foram observadas em análises histopatológicas de fígado realizadas em nosso experimento.

Na tabela 16 encontram-se registrados os valores médios da atividade de alanina amino transaminase (também chamada de ALT ou GPT ou TGP) no soro sanguíneo de camundongos, com tumor ascítico de Ehrlich, tratados durante 18 dias com diferentes flavonóides.

Tabela 16 - Valores médios de Alanina aminotransferase – ALT - (\pm desvio padrão) do soro sanguíneo de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich tratados com flavonóides por 18 dias.

<i>Tratamentos</i>	<i>ALT (U/ml) 18 dias</i>
Ração (G1)	50,00 \pm 17,79 b
Ração + Animal com câncer (G2)	53,40 \pm 18,23 b
Ração + Rutina (G3)	120,75 \pm 69,96 a
Ração + Naringina (G4)	27,50 \pm 2,29 bc
Ração + Rutina + Naringina (G5)	12,00 \pm 2,60 cd
Ração + Neotaxel (G6)	12,38 \pm 2,56 cd

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

De acordo com os resultados bioquímicos demonstrados na tabela acima, os animais submetidos ao tratamento com o flavonóide Rutina (G3) apresentaram a maior atividade enzimática de (ALT), estatisticamente significativa, em relação aos demais grupos. Outro fato, que merece ser destacado é a redução na atividade de (ALT) decorrentes dos tratamentos (G5) e (G6) quando comparados ao grupo (G2). Essas reduções ocorreram de forma estatisticamente significativa como podemos observar na tabela 16.

Matsuzaki et al (2003) realizaram um estudo com a planta *Pfaffia paniculata* (Ginseng brasileiro), que contém flavonóides e é um estimulante tônico e coadjuvante no tratamento do câncer. Foram testadas doses de 200 e 400mg/kg do extrato dessa planta administrados por via oral durante 10 dias em camundongos com TAE. Os resultados demonstraram que não ocorreram alterações histopatológicas em fígado e rins desses animais. Ao avaliar a atividade sérica da enzima ALT no soro sanguíneo dos animais que receberam 400mg/kg do extrato de Ginseng, observou-se uma redução na atividade dessa enzima quando comparado ao grupo de animais com TAE, não tratados.

Nassair et al (2000), analisando a hepatotoxicidade de flavonóides em culturas de hepatócitos de ratos, observaram que esses compostos não apresentaram efeitos tóxicos. Esses dados foram obtidos através da avaliação da liberação de lactato desidrogenase, inibição da respiração mitocondrial e do desacoplamento da fosforilação oxidativa.

Os resultados encontrados por Matsuzaki e Nassair estão em concordância com os resultados encontrados nesse trabalho, onde foram observadas reduções na atividade de ALT nos grupos G4 e G5 e a não toxicidade dos flavonóides testados. Essa não toxicidade pode ser comprovada através de análises histopatológicas de fígado realizadas em nosso trabalho.

Na tabela 17 encontram-se registrados os valores médios da concentração de albumina no soro sanguíneo de camundongos, com tumor ascítico de Ehrlich, tratados durante 18 dias com flavonóides.

De acordo com os resultados bioquímicos obtidos os grupos (G4) e (G5) apresentaram as menores concentrações plasmáticas de albumina e esses resultados foram estatisticamente significativos quando comparados ao grupo (G2). Segundo Meyer, (1992) em presença de ascite de qualquer causa a albumina sérica não é um bom índice da capacidade sintética dos hepatócitos, pois na ascite a síntese de albumina pode

estar normal ou mesmo alterada, no entanto os teores séricos podem estar baixos devido ao grande volume de distribuição. Mas, o objetivo da análise de albumina nesse trabalho não foi o de avaliar danos hepáticos e sim, a capacidade de transporte de drogas (flavonóides) na corrente sangüínea pela albumina.

Tabela 17 - Valores médios de albumina (\pm desvio padrão) do soro sanguíneo de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich tratados com diferentes flavonóides por 18 dias

<i>Tratamentos</i>	<i>Albumina (g/dl) 18 dias</i>
Ração (G1)	3,78 \pm 0,25 a
Ração + Animal com câncer (G2)	3,48 \pm 0,44 a
Ração + Rutina (G3)	3,61 \pm 0,43 a
Ração + Naringina (G4)	2,94 \pm 0,36 b
Ração + Rutina + Naringina (G5)	2,81 \pm 0,26 b
Ração + Neotaxel (G6)	3,71 \pm 0,83 a

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

O grupo tratado com o medicamento Neotaxel[®] (G6) apresentou valores semelhantes aos grupos (G1), (G2) e (G3) e esses valores não foram estatisticamente significativos. É importante ressaltar que além da função de transporte a albumina pode determinar a proporção de um fármaco livre farmacologicamente ativo disponível no plasma. Esses resultados demonstraram que o flavonóide rutina e o medicamento Neotaxel[®] encontravam-se em maiores proporções livres no plasma conseqüentemente, eles desempenharam uma maior ação farmacológica que os demais flavonóides testados.

Além da sua função como molécula fixadora e de transporte, a albumina desempenha um papel importante na nutrição. Argumenta-se que a proteína está constituída de tal modo que é facilmente metabolizada, contendo todos os aminoácidos essenciais (MEYER et al, 1992). Albumina representa de 40% a 60% das proteínas totais de um animal adulto, sendo produzida exclusivamente no fígado. A principal função da albumina normal é o transporte e armazenagem de uma ampla variedade de substâncias de baixo peso molecular, como o cortisol, hormônios sexuais, fármacos, ácidos graxos, cálcio e várias drogas. A fixação, e conseqüentemente a detoxificação,

constituem outra das funções primária da albumina no recém-nascido (AMARAL, 1996).

Na tabela 18 encontram-se registrados os valores médios da concentração de proteínas totais (g/dl), no líquido ascítico de camundongos, tratados durante 18 dias com diferentes flavonóides.

Tabela 18 - Valores médios de proteínas totais (\pm desvio padrão) do líquido ascítico de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich tratados com diferentes flavonóides por 18 dias

<i>Tratamentos</i>	<i>Proteínas Totais (g/dl) 18 dias</i>
<i>Ração + Animal com câncer (G2)</i>	37,72 \pm 2,92 a
<i>Ração + Rutina (G3)</i>	40,14 \pm 5,32 a
<i>Ração + Naringina (G4)</i>	39,18 \pm 2,05 a
<i>Ração + Rutina + Naringina (G5)</i>	36,76 \pm 2,13 a
<i>Ração + Neotaxel (G6)</i>	37,22 \pm 2,74 a

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos na tabela 18, foram observadas pequenas variações na concentração de proteínas totais, presentes no líquido ascítico. Essas variações não foram estatisticamente significativas. Dessa forma, os flavonóides testados não provocaram danos hepáticos aos animais.

Na tabela 19 encontram-se registrados os valores médios da concentração de aspartato amino transferase (também chamada de AST ou GOT ou TGO), no líquido ascítico de camundongos, tratados durante 18 dias com diferentes flavonóides.

De acordo com os resultados bioquímicos expostos na tabela 19, os grupos (G3) e G4) apresentaram menor atividade enzimática de (AST) quando comparados ao grupo (G2) e esses resultados foram estatisticamente significativos. Sendo assim, os flavonóides rutina e naringina promoveram uma proteção aos hepatócitos quando administrados na concentração de 10mg/Kg.

Tabela 19 - Valores médios de aspartato aminotransferase - AST (\pm desvio padrão) do líquido ascítico de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich tratados com diferentes flavonóides por 18 dias.

<i>Tratamentos</i>	<i>AST (U/ml) 18 dias</i>
<i>Ração + Animal com câncer (G2)</i>	236,00 \pm 60,52 a
<i>Ração + Rutina (G3)</i>	31,67 \pm 32,35 b
<i>Ração + Naringina (G4)</i>	109,00 \pm 101,53 b
<i>Ração + Rutina + Naringina (G5)</i>	284,25 \pm 68,28 a
<i>Ração + Neotaxel (G6)</i>	265,20 \pm 38,05 a

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

Na tabela 20 encontram-se registrados os valores médios de alanina amino transferase (também chamada de ALT ou GPT ou TGP), no líquido ascítico de camundongos, tratados durante 18 dias com diferentes flavonóides.

Tabela 20 - Valores médios de Alanina aminotransferase – ALT (\pm desvio padrão) do líquido ascítico de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich tratados com diferentes flavonóides por 18 dias

<i>Tratamentos</i>	<i>ALT (U/ml) 18 dias</i>
<i>Ração + Animal com câncer (G2)</i>	21,25 \pm 4,43 d
<i>Ração + Rutina (G3)</i>	71,67 \pm 22,05 a
<i>Ração + Naringina (G4)</i>	33,75 \pm 10,24 bc
<i>Ração + Rutina + Naringina (G5)</i>	66,60 \pm 40,07 ab
<i>Ração + Neotaxel (G6)</i>	25,00 \pm 4,69 cd

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos observou-se que o grupo de animais tratado com o flavonóide rutina (G3) obteve o mais alto valor na atividade enzimática de (ALT) e esse valor foi estatisticamente significativo quando comparado ao grupo de animais com câncer (G2). Resultado semelhante pode ser observado no grupo (G5).

A atividade da ALT encontra-se elevada na presença de danos hepáticos. Sendo assim os tratamentos dos grupos G3 e G5 podem ter desencadeado lesões aos hepatócitos as quais, não foram confirmadas por análises histológicas.

Quando comparamos o grupo (G2), com o grupo tratado com o quimioterápico Neotaxel[®], (G6) observamos que não ocorreram variações estatisticamente significativas em valores de atividade enzimática de (ALT) entre os grupos.

Na tabela 21 encontram-se registrados os valores médios da concentração de Albumina (g/dl), no líquido ascítico de camundongos, tratados durante 18 dias com diferentes flavonóides.

Tabela 21 - Valores médios de albumina (\pm desvio padrão) no líquido ascítico de camundongos com tratados com diferentes flavonóides por 18 dias.

<i>Tratamentos</i>	<i>Albumina (g/dl) 18 dias</i>
<i>Ração + Animal com câncer (G2)</i>	2,73 \pm 0,25 ab
<i>Ração + Rutina (G3)</i>	2,75 \pm 0,33 ab
<i>Ração + Naringina (G4)</i>	2,79 \pm 0,14 a
<i>Ração + Rutina + Naringina (G5)</i>	2,64 \pm 0,11 b
<i>Ração + Neotaxel (G6)</i>	2,59 \pm 0,18 b

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

De acordo com os resultados bioquímicos, demonstrados na tabela 21, observou-se que os grupos (G4), (G5) e (G6) apresentaram valores em concentração de albumina semelhantes ao grupo de animais com câncer (G2) e esses resultados não foram estatisticamente significativos. Isso indica que a capacidade de transporte da albumina não foi alterada na presença dos flavonóides testados.

Na tabela 22 encontram-se registrados os valores referentes a contagem de células tumorais vivas presentes no líquido ascítico dos grupos submetidos a diferentes tratamentos.

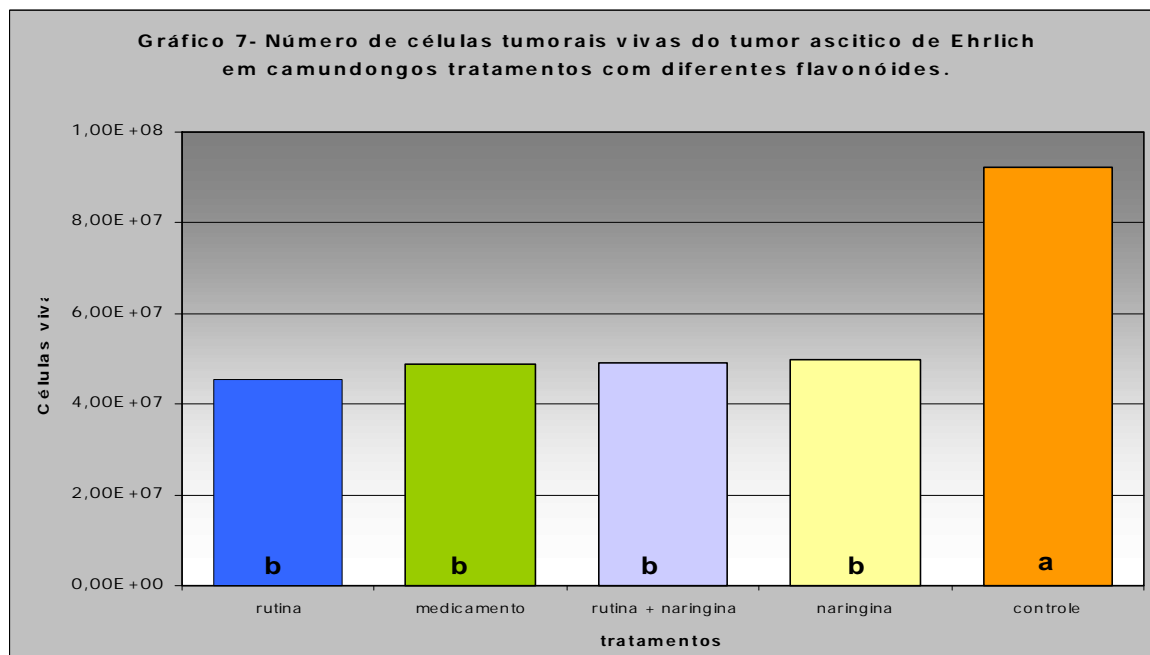
De acordo com os resultados obtidos, o número de células vivas tumorais presentes no líquido ascítico dos camundongos apresentou uma redução, estatisticamente significativa em todos os grupos, quando comparados ao grupo (G2). É importante ressaltar que, os diferentes tratamentos reduziram o número de células tumorais vivas em aproximadamente 40.000.000 milhões de células.

Tabela 22 - Efeito dos flavonóides no tratamento do TAE. Número de células tumorais viáveis presentes no líquido ascítico dos camundongos

<i>Tratamento</i>	<i>Células tumorais viáveis (N x 10⁷)</i>
<i>Ração + Animal com câncer (G2)</i>	9,23 ± 1,37 a
<i>Ração + Rutina (G3)</i>	4,56 ± 1,60 b
<i>Ração + Naringina (G4)</i>	4,99 ± 0,56 b
<i>Ração + Rutina + Naringina (G5)</i>	4,93 ± 1,41 b
<i>Ração + Neotaxel[®] (G6)</i>	4,88 ± 0,13 b

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student (P>0,05).

Como podemos observar na tabela acima, os flavonóides e a associação de flavonóides apresentaram resultados estatisticamente semelhantes ao grupo (G6). Esses mesmos resultados podem ser melhor visualizados no gráfico 7.



Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student (P>0,05).

Gupta, (2004) avaliaram a atividade anti-tumoral de uma planta da Índia, *Cesalpinia bonducella*, que possui associação de flavonóides, terpenos, saponinas e alcalóides. Camundongos com TAE foram tratados por 14 dias com dosagens diferentes do extrato metanólico dessa planta. Ao avaliar o número de células viáveis presentes no líquido ascítico dos camundongos com Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) e tratados

com o extrato da planta, os pesquisadores encontraram reduções significativas ($p < 0,01$) no número de células tumorais viáveis nos animais dos grupos tratados com 50 e 200mg/kg do extrato quando comparado com os animais do grupo com TAE não tratados.

Os resultados encontrados por Gupta et al (2004) estão de acordo com resultados encontrados nesse estudo, onde também foram observadas reduções significativas ($p < 0,05$) no número de células tumorais viáveis quando os camundongos com TAE foram tratados com 10mg/kg dos flavonóides rutina, naringina e rutina + naringina.

Na tabela 23 encontram-se registrados os valores referentes a contagem de células tumorais mortas presentes no líquido ascítico dos grupos submetidos a diferentes tratamentos.

Tabela 23 - Efeito dos flavonóides no tratamento do TAE. Número de células tumorais mortas \pm desvio padrão presentes no líquido ascítico dos camundongos.

<i>Tratamento</i>	<i>Células tumorais mortas ($N \times 10^6$)</i>
Ração + Animal com câncer (G2)	0,11 \pm 0,12 b
Ração + Rutina (G3)	1,18 \pm 0,46 a
Ração + Naringina (G4)	0,27 \pm 0,06 b
Ração + Rutina + Naringina (G5)	0,34 \pm 0,16 b
Ração + Neotaxel[®] (G6)	0,78 \pm 0,16 a

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

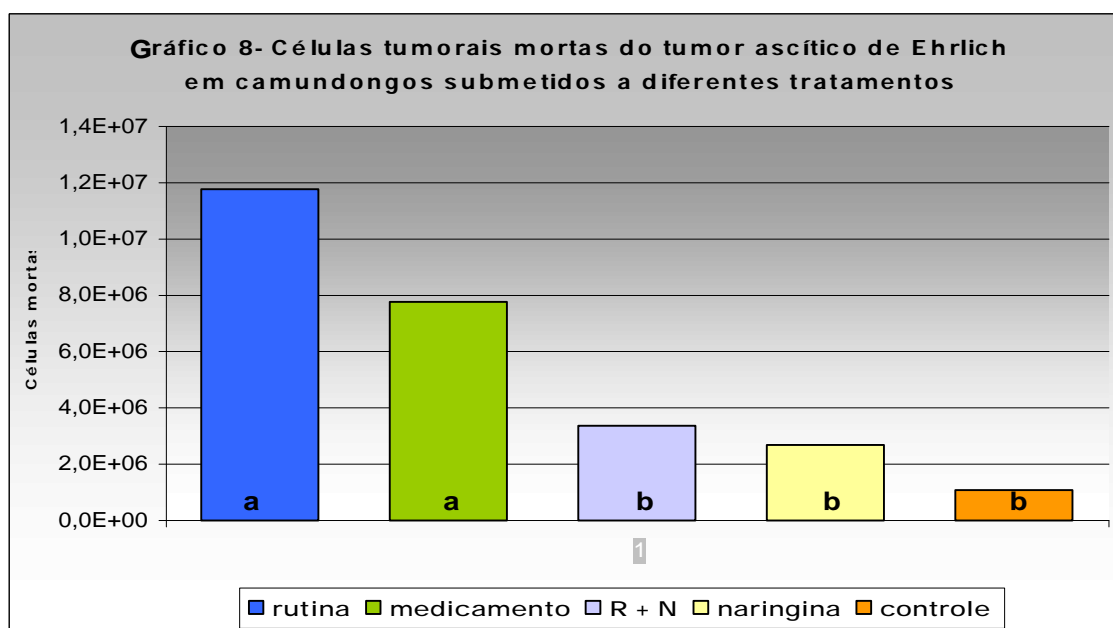
De acordo com os resultados obtidos o grupo tratado com o flavonóide Rutina (G3) apresentou um aumento no número de células tumorais mortas 10 vezes maior do que o grupo controle (G2). Como podemos observar também, o grupo (G3) apresentou resultados semelhantes ao grupo (G6) comprovando assim, a eficácia desse tratamento no aumento do número de células tumorais mortas presentes no líquido ascítico.

Quando Gupta et al, (2004) avaliaram o número de células tumorais mortas presentes no líquido ascítico dos camundongos com TAE e tratados com diferentes dosagens do extrato da planta (*Cesalpinia bonducella*), eles observaram que os animais do grupo tratados com 50mg/kg tiveram um aumento significativo ($p < 0,01$) de 96% no número de células mortas. Os animais dos grupos tratados com 100 e 200mg/kg tiveram

um aumento significativo ($p < 0,01$) de 162% e 343% respectivamente, quando comparados com os animais do grupo com TAE não tratados.

Os resultados de Gupta (2004) estão de acordo com os resultados encontrados nesse trabalho. Ao avaliar o número de células tumorais mortas contidas no líquido ascítico dos camundongos com TAE tratados com o flavonóide rutina, encontrou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de células tumorais mortas quando comparado aos animais do grupo com TAE não tratados.

Esses resultados podem ser melhor visualizados no gráfico 8.



Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

A contagem do número de células tumorais totais, presentes no líquido ascítico dos animais submetidos a 18 dias de tratamento encontram-se registrados na tabela 24.

Tabela 24 - Efeito dos flavonóides no tratamento do TAE. Número de células tumorais totais presentes no líquido ascítico dos camundongos.

Tratamento	Células tumorais totais ($N \times 10^7$)
Ração + Animal com câncer (G2)	9,33 \pm 1,24 a
Ração + Rutina (G3)	5,73 \pm 1,22 b
Ração + Naringina (G4)	5,26 \pm 0,60 b
Ração + Rutina + Naringina (G5)	5,28 \pm 1,57 b
Ração + Neotaxel[®] (G6)	5,66 \pm 0,28 b

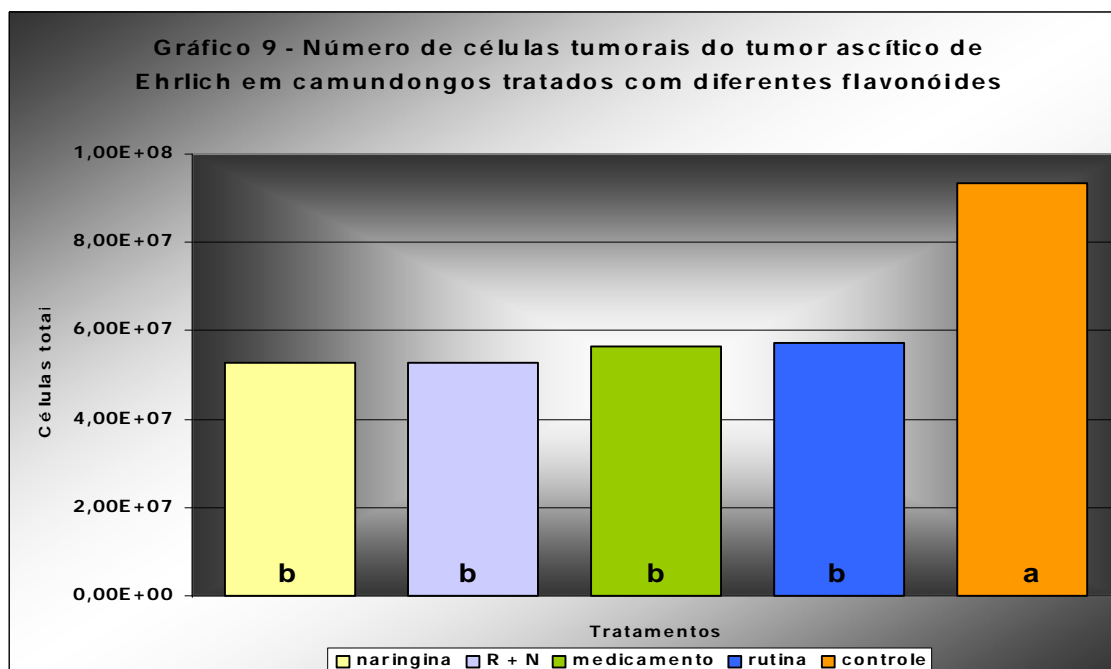
Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos, os grupos (G3), (G4), (G5) e (G6) apresentaram valores estatisticamente significativos menores no número de células tumorais totais, quando comparados ao grupo controle (G2). Lembrando sempre, que essa redução no número de células tumorais abrange a casa dos milhões.

Matsuzaki et al (2003) realizaram um estudo para avaliar o efeito do Ginseng brasileiro (planta rica em flavonóides) em camundongos com TAE e observaram que quando os animais foram tratados com 200mg/kg do extrato por 20 dias, ocorreu uma redução de 30% no número de células tumorais totais presentes no líquido ascítico dos animais. Sendo assim, os resultados encontrados por Matsuzaki estão em concordância com os resultados encontrados nesse trabalho.

É importante observar também, que os grupos (G3), (G4) e (G5) não diferem estatisticamente do resultado obtido quando os animais foram tratados com o quimioterápico Neotaxel[®] (G6). Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Rusak (2005), onde ele afirmou que os flavonóides inibem de forma significativa o crescimento de linhagens de HL-60 (célula humana leucêmica) e sua eficácia antiproliferativa foi equivalente ou um pouco maior que os agentes anticarcinogênicos tradicionais como doxorrubicina, vincristina e metotrexato.

Esses resultados podem ser melhor visualizados no gráfico 9.



Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

As porcentagens de viabilidade celular no líquido ascítico de camundongos, submetidos a diferentes tratamento, encontram-se registradas na tabela 25.

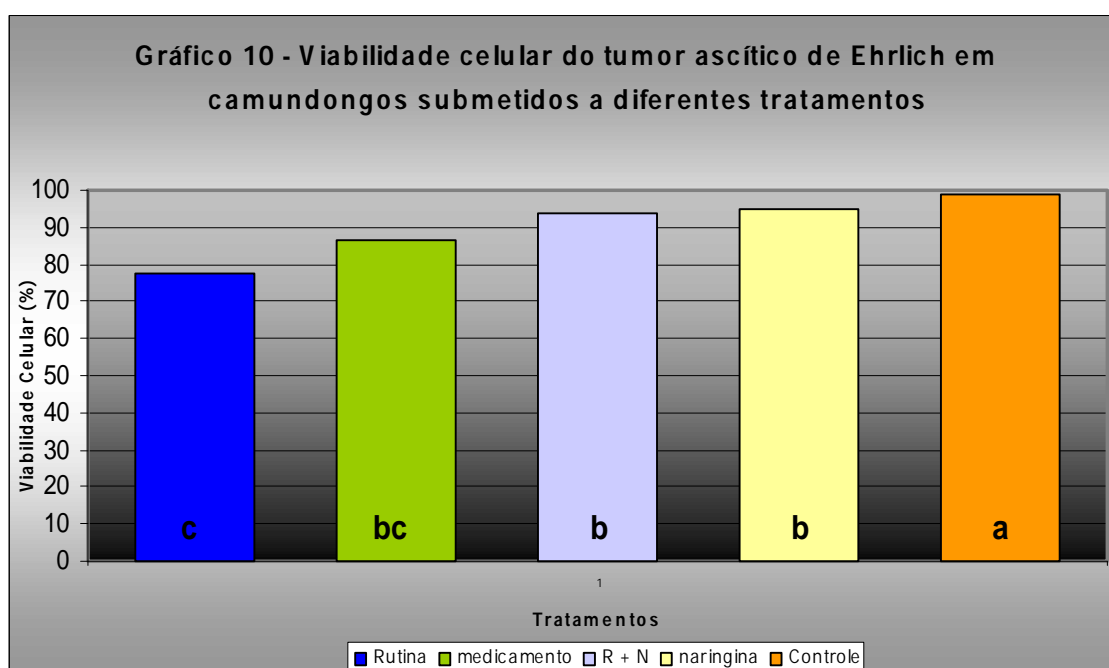
Tabela 25 - Efeito dos flavonóides no tratamento do TAE. Viabilidade celular \pm desvio padrão no líquido ascítico dos camundongos.

Tratamento	Viabilidade celular (%)
Ração + Animal com câncer (G2)	98,67 \pm 1,62 a
Ração + Rutina (G3)	77,80 \pm 12,3 c
Ração + Naringina (G4)	94,93 \pm 0,85 b
Ração + Rutina + Naringina (G5)	93,73 \pm 1,07 b
Ração + Neotaxel[®] (G6)	86,37 \pm 2,03 bc

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos, todos os tratamentos reduziram a viabilidade celular das células tumorais em valores estatisticamente significativos quando comparado ao grupo (G2).

Observou-se que o flavonóide rutina (G3) apresentou uma maior eficácia na redução da viabilidade celular tumoral, efeitos esses similares aos produzidos pelo quimioterápico Neotaxel[®]. Esses resultados, podem ser melhor visualizados no gráfico 10.



Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

Os flavonóides possuem uma dupla ação quimioprotetora no câncer, eles suprimem o crescimento tanto das células tumorais quanto das células endoteliais (O'PREY, 2003). Luteolina, genistéina, apigenina, quercetina e fisitina inibem culturas de células tumorais e endoteliais em concentrações similares. (GOSSLAU, 2004). Tem sido sugerido que flavones, 3,4-diidroxiflavone, resveratrol e luteolina são alguns dos mais potentes polifenóis anti-endoteliais que suprimem a proliferação celular (CAO, 2002).

Os valores referentes ao volume do líquido ascítico encontram-se registrados na tabela 26.

Tabela 26 - Efeito dos flavonóides no tratamento do TAE. Volume do líquido ascítico dos camundongos.

<i>Tratamento</i>	<i>Volume do liquido ascítico (mL)</i>
<i>Ração + Animal com câncer (G2)</i>	17,00 ± 1,91 c
<i>Ração + Rutina (G3)</i>	19,10 ± 1,15 bc
<i>Ração + Naringina (G4)</i>	26,30 ± 2,69 a
<i>Ração + Rutina + Naringina (G5)</i>	24,00 ± 2,65 a
<i>Ração + Neotaxel[®] (G6)</i>	22,33 ± 2,89 ab

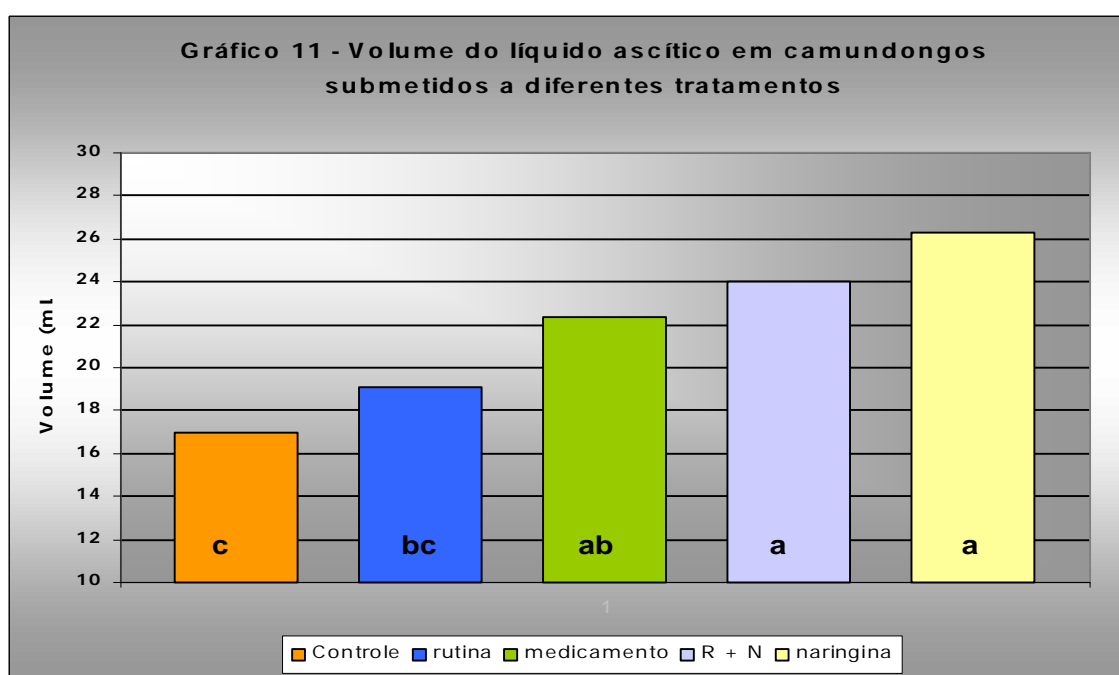
Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos na tabela 26 observou-se que os grupos (G4), (G5) e (G6) apresentaram valores aumentados em volume de líquido ascítico e esses foram estatisticamente significativos quando comparados aos grupos (G2).

Gupta et al (2004) avaliaram o volume do líquido ascítico presente na cavidade abdominal dos camundongos com TAE e tratados com diferentes dosagens do extrato da planta *Cesalpinia bonducella*. Eles observaram que independente das concentrações do extrato da planta, houve uma redução significativa ($p < 0,01$) no volume desse líquido comparado ao grupo de animais com TAE que não receberam tratamento. Os dados encontrados nesse trabalho não estão de acordo com os resultados obtidos por esses pesquisadores. Nesse estudo observamos um aumento no volume do líquido ascítico dos camundongos tratados com os flavonóides naringina e rutina + naringina e estes resultados foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo de animais com TAE não tratados.

Matsuzaki et al (2003) realizaram um estudo para avaliar o efeito do Ginseng brasileiro em camundongos com TAE e observaram que quando os camundongos com TAE foram tratados com 200mg/kg do extrato por 20 dias, observou-se uma redução no volume do líquido ascítico ($p < 0,05$) desses animais, quando comparado ao grupo de animais com TAE não tratados. Sendo assim, o resultado encontrado por estes pesquisadores também não estão em concordância com os resultados encontrados nesse trabalho.

O grupo (G3) quando comparados ao grupo (G2), não apresentou variações significativas em volume de líquido ascítico. Esses resultados podem ser melhor visualizados no gráfico 11.

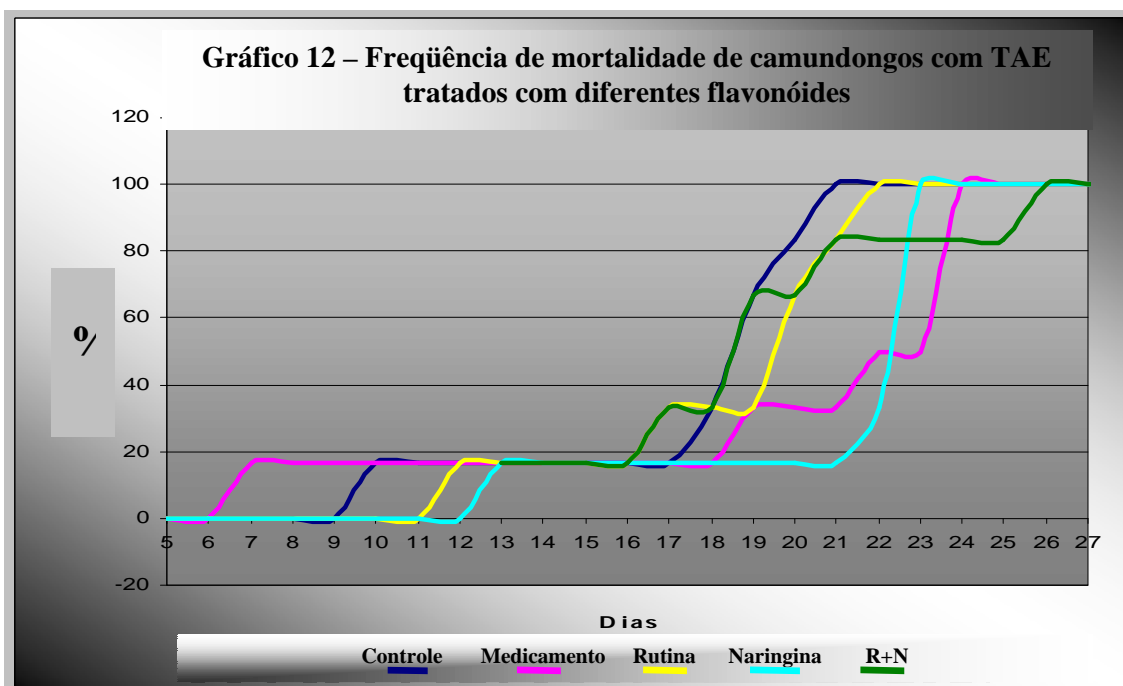


Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

Os resultados da mortalidade dos camundongos com câncer induzidos e tratados com flavonóides durante 18 dias encontram-se registrados no gráfico 12.

Observou que os grupos tratados com os diferentes flavonóides obtiveram resultados melhores sobre a sobrevivência dos animais quando comparado ao grupo controle. O grupo composto pela associação de flavonóides obteve o melhor resultado em sobrevivência animal quando comparado aos demais tratamentos.

De acordo com os resultados obtidos o grupo controle com câncer não tratado teve 80% de mortalidade dos animais aos 20 dias de experimentação. O grupo de animais tratado com medicamento alcançou 80% de mortalidade aos 24 dias. Já o grupo tratado com rutina foi aos 21 dias e com naringina aos 23 dias.



Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P > 0,05$).

De acordo com Gupta et al (2004), ao avaliar a percentagem do aumento de vida de camundongos com TAE tratados por 14 dias com diferentes concentrações do extrato da planta *Cesalpinia bonducella*, eles observaram que houve um aumento do tempo de vida de 24,44%, 58,88% e 87,22% quando os animais foram tratados com 50, 100 e 200mg/kg do extrato, respectivamente.

Nesse trabalho testaram-se os flavonóides rutina e naringina isoladamente na concentração de 10mg/kg administrados oralmente por 18 dias, como forma de tratamento, e foi observado um aumento de 8,8% no tempo de vida dos animais tratados com o flavonóide rutina em comparação com o tempo de vida dos animais com TAE que não receberam tratamento. Quando os animais foram tratados com a naringina, houve um aumento do tempo de vida em 11,7%. Os resultados obtidos nesse experimento estão em concordância com os resultados publicados por Gupta dessa

forma, podemos afirmar que os flavonóides testados aumentam o tempo de vida dos animais com TAE.

Quando Gupta et al (2004) injetaram diariamente 20mg/kg, intraperitonealmente do medicamento 5-fluorouracil (quimioterápico), obtiveram um aumento de 119,49% no tempo de vida dos camundongos em comparação com o grupo de animais com TAE não tratados. O fármaco utilizado em nosso trabalho foi o Neotaxel[®] administrado em uma única dosagem intravenosa 24 horas após a indução do câncer na concentração de 100mg/m². Observou-se que ocorreu uma redução de 9% no tempo de vida dos animais.

A análise do tempo de vida dos animais também foi realizada através de cálculos de MST (Tempo médio de sobrevivência dos animais) e de %ILS (percentagem de aumento do tempo de sobrevivência). Esses resultados podem ser visualizados na tabela 27.

Tabela 27 – Atividade dos flavonóides e tempo de vida de camundongos com TAE

Tratamentos	Varição do tempo de vida	MST (d) ^a	ILS (%) ^b	T/C (%) ^c	Eficácia
Ração	10 -24	17,0	-----	-----	
Ração + Neotaxel [®]	7-24	15,5	-8,8	91,1	-
Ração + rutina	13-24	18,5	8,8	108,8	-
Ração + naringina	14-24	19,0	11,7	111,7	-
Ração + rutina + naringina	14-27	20,5	20,5	120,5	-

a) $MST = (1^{\circ} \text{dia de morte} + \text{ultimo dia de morte})/2$; b) $ILS\% = (MST \text{ grupo tratado} / MST \text{ grupo controle}) - 1 \times 100$; c) $T/C\% = (MST \text{ grupo tratado} / MST \text{ grupo controle}) \times 100$

Ao analisar esses resultados observou-se que nenhuma das substâncias testadas possuiu uma atividade antitumoral significativa de acordo com o critério de NCI citado por ORSOLIC (2005). Pois segundo esse critério, e a MTS dos grupos tratados dividido pela média do tempo de sobrevivência do grupo controle exceder 125% e ILS exceder 25%, é um indicativo que a droga testada possui uma atividade antitumoral significativa.

5.3. MORFOLOGIA HEPÁTICA

O fígado é a maior glândula do corpo humano, localizado no quadrante superior do abdômen, é composto por quatro lóbulos separados de tecido conjuntivo, que sustentam vasos sanguíneos e condutos biliares com disposição arboriforme e uma grande massa de células parenquimatosas que se dispõem ao longo dos ramos mais finos da árvore vascular formando placas contínuas de células (CONTRAN, 2000).

A unidade estrutural clássica do fígado é o lóbulo hepático descrito com um prisma hexagonal de tecido, com diâmetro aproximado de 0.7 x 2 mm, contendo células parenquimatosas anastomosadas e um labirinto sistêmico de sinusóides. A massa de células parenquimatosas corresponde a 60% do peso do fígado. As paredes dos sinusóides são constituídas de células endoteliais e células integrantes do sistema retículo-endotelial, chamadas células de Kupffer, dotadas de funções imunológicas, hematopoiéticas e fagocitárias (WEISS, 1977).

O lóbulo hepático é composto por uma veia central eferente, tributária da veia hepática para a qual convergem radialmente sinusóides, oriundos das subdivisões de ramos da veia porta e artéria hepática, presentes nos espaços portais periféricos. Vasos sanguíneos eferentes e ductos biliares encontram-se distribuídos a longo das extremidades do poliedro. Todas as funções bioquímicas do fígado são efetuadas pelas células epiteliais parenquimatosas do fígado, os hepatócitos, e são dependentes de relações complexas entre sistema vascular e o sistema de drenagem da bile (STEVENS, 2001).

O fígado funciona com uma glândula endócrina e exócrina. O sistema excretor inicia-se no interior do lóbulo, em espaços tubulares finos que resultam de sulcos opostos nas faces de contato de hepatócitos contíguos. Esses canalículos biliares não têm paredes próprias, anastomosam-se ricamente, formando um retículo que envolve as células hepáticas e drenam em dutos biliares terminais de paredes finas, localizados na periferia do lóbulo denominados colangiólos ou canais de Hering. Os colangiólos, por sua vez, são tributários dos dutos biliares mais calibrosos nos espaços portais interlobulares. A bile secretada pelo fígado é responsável pela emulsificação das gorduras no duodeno (STEVENS, 2001). O fígado também sintetiza muitas substâncias em resposta às demandas do corpo como albumina, colesterol e glicogênio, além de metabolizar drogas participando assim, do mecanismo de detoxificação do organismo (WEISS,1977).

Essencial para a vida, o fígado junto com outros órgãos participa da homeostase metabólica normal, isso inclui o processamento dos aminoácidos, carboidratos, lipídios e vitaminas alimentares; síntese de proteínas séricas, desintoxicação e excreção na bile de resíduos endógenos e xenobióticos poluentes (COTRAN, 2000). Com grande poder de regeneração, os hepatócitos do rato apresentam vida média que varia entre 191 a 453 dias.

5.4. MODIFICAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS ENCONTRADAS

Nesse trabalho foram analisados cortes de tecidos hepáticos de três animais de cada grupo, escolhidos ao acaso, com objetivo de avaliar possíveis alterações no tecido causado pelo TAE e/ou pelos diferentes flavonóides testados.

A morfologia hepática pertencente aos animais do grupo tratado apenas com ração e não submetidos à indução do TAE encontra-se representada na figura 11.

Como podemos observar na figura 11 os núcleos dos hepatócitos são grandes, esféricos e centrais. Muitas células são binucleadas, sendo que os núcleos frequentemente são poliplóides. Podemos observar também, a presença de espaços sinusóide ao longo do tecido hepático.

A morfologia hepática pertencente aos animais do grupo tratado apenas com ração e submetidos à indução do TAE encontra-se representada na figura 12.

Ao analisar o corte de tecido hepático dos animais com TAE que receberam somente ração observou-se uma grande adesão das células do TAE na cápsula hepática. Os núcleos hepáticos encontram-se dilatados e um grande número de hemácias pode ser observado no interior dos espaços sinusóides quando, comparamos o tecido representado na figura 12 com o tecido da figura 11.

A morfologia hepática pertencente aos animais com TAE tratados com o flavonóide naringina por 18 dias encontra-se representada na figura 13.

O fígado dos animais com TAE tratados com o flavonóide naringina na concentração de 10mg/Kg por 18 dias apresentou aparentemente uma redução na

quantidade de células tumorais aderidas (linha branca) quando comparado ao grupo com TAE não tratado, porém observou-se que essa adesão foi aparentemente maior ao comparar com o grupo de animais com TAE tratados com o medicamento Neotaxel[®].

Outro fato observado foi a formação de angiogênese (seta azul) pelas células tumorais, mas não foi observado a presença de hemácias nos espaços sinusóides (setas pretas) que encontram-se dilatados.

Como podemos observar, o flavonóide naringina não causou alterações histopatológica aos tecidos hepáticos analisados, conseqüentemente o flavonóide testado não demonstrou ser tóxico às células do tecido na concentração de 10mg/Kg por 18 dias.

A morfologia hepática pertencente aos animais com TAE tratados com a associação dos flavonóides rutina + naringina por 18 dias encontra-se representada na figura 14.

Os animais com TAE tratados com a associação dos flavonóides rutina + naringina apresentaram aparentemente em análise histopatológica do fígado uma menor adesão (linha branca) das células do TAE na cápsula hepática quando comparado aos animais que não receberam tratamento. Porém, essa adesão foi aparentemente maior que nos animais dos grupos tratados com medicamento Neotaxel[®] e com o flavonóide rutina. Foi possível observar também, a presença de hemácias (seta azul) no interior dos espaços sinusóides como também, a formação de angiogênese pelas células do tumor ascítico de Ehrlich.

Como podemos observar, a associação dos flavonóides rutina + naringina não causou alterações histopatológica aos tecidos hepáticos analisados, conseqüentemente a associação testada não demonstrou ser tóxica às células do tecido na concentração de 10mg/Kg por 18 dias

A morfologia hepática pertencente aos animais com TAE tratados com o medicamento Neotaxel[®] encontra-se representada na figura 15.

O fígado dos animais com TAE que receberam uma dosagem única do quimioterápico Neotaxel[®], por via intravenosa, apresentou aparentemente em análise histopatológica uma pequena adesão das células do TAE na cápsula hepática como pode ser verificado na figura 15. Além disso, pode-se observar a presença de angiogênese

formada pelas células do TAE. Os espaços sinusóides apresentaram pequenas variações ao comparar com os animais com TAE não tratados.

Como podemos observar o medicamento Neotaxel[®] não causou alterações histopatológica aos tecidos hepáticos analisados, conseqüentemente o medicamento testado não demonstrou ser tóxico às células do tecido na concentração de 100mg/m² em dosagem única. Informações essas, de não toxicidade hepática relatadas na bula do medicamento.

A morfologia hepática pertencente aos animais com TAE tratados com o flavonóide rutina por 18 dias encontra-se representada na figura 16.

Ao analisar o corte de tecido hepático dos animais com TAE tratados com o flavonóide rutina observou-se que o tratamento apresentou aparentemente uma maior eficácia na redução da adesão das células do TAE à cápsula hepática. Porém, um grande número de hemácias pode ser observado no interior dos sinusóides hepáticos.

Como podemos observar, o flavonóide rutina não causou alterações histopatológica aos tecidos hepáticos analisados, conseqüentemente o flavonóide testado não demonstrou ser tóxico às células do tecido na concentração de 10mg/Kg por 18 dias.

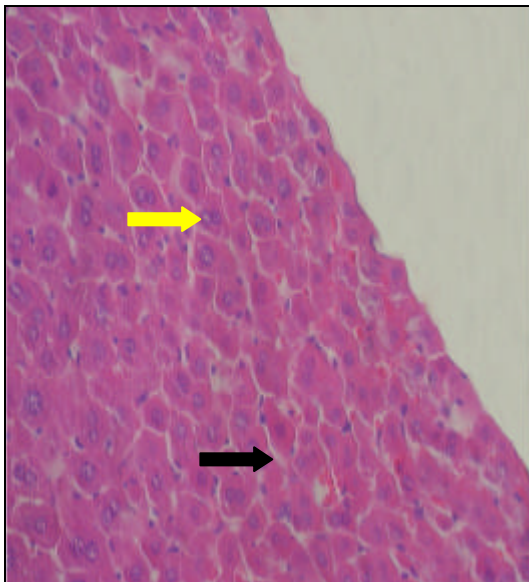


Figura 11 - Corte de tecido hepático de animal normal que recebeu ração, onde são observados hepatócitos (seta amarela) e espaço sinusóide (seta preta).

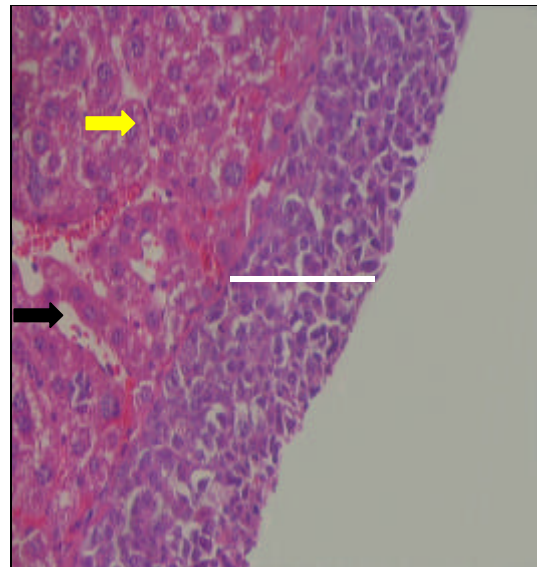


Figura 12 - Corte de tecido hepático de animal com TAE que recebeu ração, onde são observados hepatócitos (seta amarela), espaço sinusóide (seta preta) e adesão de células tumorais (linha branca).

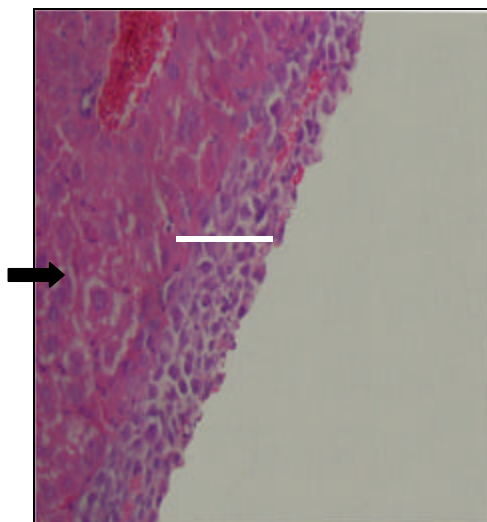


Figura 13 - Corte de tecido hepático de animal com TAE que recebeu o flavonóide naringina, onde são observados, espaço sinusóide (seta preta) e adesão de células tumorais (linha branca).

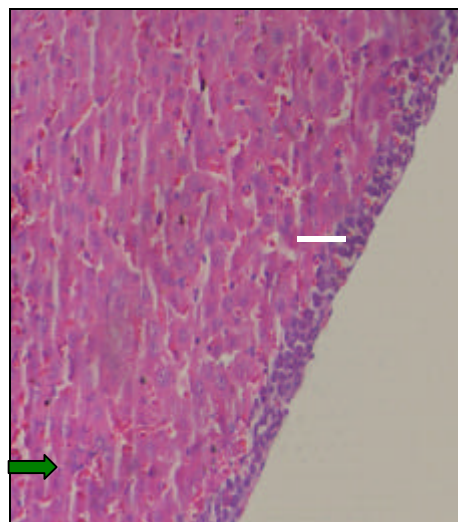


Figura 14 - Corte de tecido hepático de animal com TAE que recebeu a associação dos flavonóide rutina + naringina, onde são observadas, hemácias (seta verde) e adesão de células tumorais (linha branca).

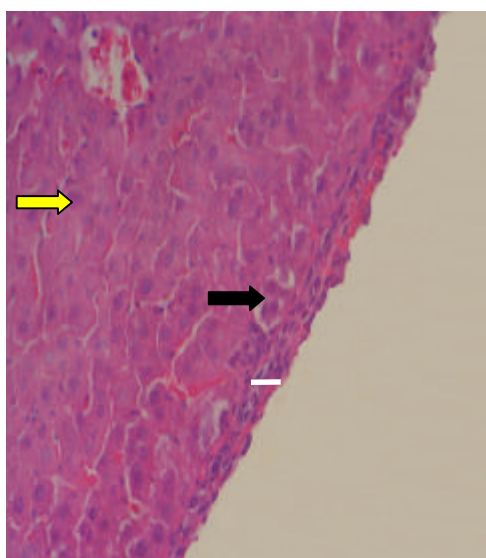


Figura 15 - Corte de tecido hepático de animal com TAE que recebeu o medicamento Neotaxel®, onde são observados hepatócitos (seta amarela), espaço sinusóide (seta preta) e adesão de células tumorais (linha branca).

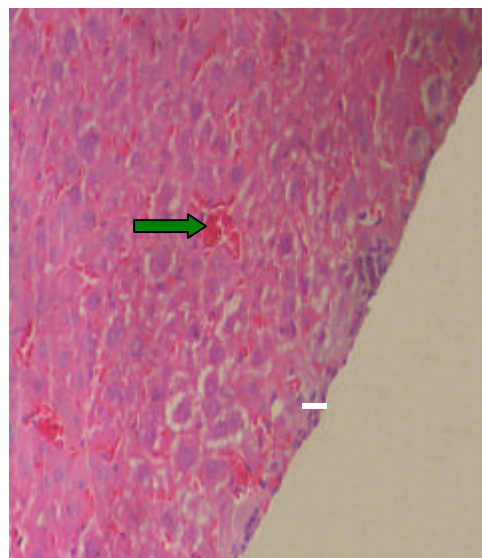


Figura 16 - Corte de tecido hepático de animal com TAE que recebeu o flavonóide rutina, onde são observadas hemácias (seta verde) e adesão de células tumorais (linha branca).

6. CONCLUSÕES

6.1. Conclusões do experimento de prevenção

- O flavonóide naringina reduziu os valores médios de proteínas totais (g/dl) no soro sanguíneo dos animais.
- Os flavonóides rutina e naringina reduziram a atividade de alanina aminotransferase (ALT) no soro sanguíneo dos animais
- O flavonóide naringina reduziu os valores médios de albumina (g/dl) no soro sanguíneo dos animais
- Com relação a viabilidade celular das células tumorais de Ehrlich observou-se uma redução significativa no tratamento utilizando o flavonóide rutina.
- O tratamento preventivo com a associação de flavonóides (rutina + naringina) demonstrou atividade anti-tumoral significativa de acordo com os critérios de NCI.

6.2. Conclusões do experimento de tratamento

- Os animais com TAE tratados com o flavonóide rutina e os animais tratados com o flavonóide naringina apresentaram um aumento nos valores médios de proteínas totais (g/dl) no soro sanguíneo.
- Os animais com TAE tratados com o flavonóide rutina e com a associação (rutina + naringina) aumentaram a atividade de aspartato amino transferase (AST) no soro sanguíneo
- A associação de flavonóides (rutina + naringina) reduziu a atividade de alanina aminotransferase (ALT) no soro sanguíneo dos animais
- Os tratamentos efetuados com o flavonóide naringina e associação dos flavonóides (rutina + naringina) reduziram os níveis de albumina no soro sanguíneo dos animais
- Com relação a viabilidade celular das células tumorais todos os tratamentos efetuados com os flavonóides apresentaram redução em comparação aos animais controle.
- Observou-se que o flavonóide rutina apresentou valores semelhantes na redução da viabilidade celular ao do medicamento Neotaxel[®].
- É importante ressaltar, que os melhores resultados na redução da viabilidade celular foram obtidos durante os experimentos de tratamento.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Pela grande facilidade de transplantação, padronização e crescimento rápido do TAE este modelo favorece o estudo de associações de flavonóides como quimioterápicos.
- Avaliar a presença de marcadores tumorais no soro sanguíneo dos animais tratados com diferentes flavonóides.
- Atuação dos flavonóides sobre a forma sólida do tumor de Ehrlich que possibilite uma avaliação experimental por um tempo maior.
- Estudos *in vitro* que possibilitem avaliar quais os mecanismos de atuação dos flavonóides na redução da viabilidade celular.

8. Bibliografia

ADAMS, J. Potential for proteasome inhibition in the treatment of cancer. **Drug Discovery Today**, v.8, n.7, p. 307-15, 2003.

AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism. **Nutrition**. New York: v. 18,n. 1, p. 75-81, 2002.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia Molecular da Célula**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997, p. 963-1006.

AMARAL, S.A; GASPAR, J.F.L; HENNEMANN, A.R.C. Valores de referência de constituintes bioquímicos séricos para cães da região de Santa Maria, RS. Rev. **Faculdade Zootecnia, Veterinária e Agronomia de Uruguaiana**, v. 2/3, n. 1, p. 81-86 jan./dez. 1995/1996.

BAAK, J.P.A., PATH, F.R.C., HERMSEN, M.A.J.A., MEIJER, G., SCHMIDT, J., JANSSEN, E.A.M. Genomics and proteomics in cancer. **European Journal of Cancer**, v.39, p.1199-1215, 2003.

BASU, T.K; TEMPLE, N.J; GARG, M.L. Antioxidants in Human Heart and Disease. **British Library**, London 1999.

BERGAMI-SANTOS, P.C.; MARIANO, M.; BARBUTO, J.A.M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life Sciences**, v. 75, n. 2, p. 245-255, 2004.

BIRT, D.F., HENDRICH, S., WANG, W., Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v.90, p. 157-177, 2001.

BOLD, R.J; TERMULEN, P.M; MACCONEY, D.J. Apoptosis, cancer and cancer therapy. **Surgical Oncology**, v.6, n.3, p.133-142, 1997.

BRAVO L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutricion**. V.11, p.317–33 1998.

BRENTANI, R. R; LOPES, J.D; JUNQUEIRA, L.C.U; Biology of metastasis. **Braz. J .Med.Biol;** Res. 21; 1-17, 1988.

BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. **Microbiologia Médica**. 21a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000. p. 435-453.

BROWN HK, HEALEY JH. **Metastatic cancer to bone**. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg AS. Principles and practice of oncology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Raven; 2001. chap. 56.

CALALUCE. R, L.D. EARNEST, HEDDENS. D, EINSPAHR. G.J, ROE. D, BOGERT. L.C, ET AL., Effects of piroxicam on prostaglandin E2 levels in rectal mucosa of adenomatous polyp patients: a randomized phase IIb trial, **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev**. 9, 1287–1292, 2000.

CAO Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 33, 357–69, 2002.

CARMELIET P; JAIN R.K, Angiogenesis in cancer and other diseases: from genes to function to therapy. **Nature**, v.407, 249–257

CATHERINE, A.RICE-EVANS; PACKER, L. **Flavonoids in health and disease**. 2^a ed. revised and expanded. New York/ Basel. Copyright, 2003 by Marcel Dekker.

CHANG WS, LEE YJ, LU FJ, CHIANG HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. **Anticancer Res**:13, 2165–70, 1993.

CHEN, D., DANIEL, K, G., CHEN, M, et al, Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. **Biochemical Pharmacology**, v.69, p.1421-1432, 2005.

CHEVET, E., CAMERON, P.H., PELLETIER, M.F., THOMAS, D.Y., BERGERON, J.J.M. The endoplasmatic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation. **Current Opinion in Structural Biology**, v.11, p.120-4, 2001.

CLEETER. W.M, COOPER. M.J, DARLEY-USMAR. M.V, MONCADA. S, SCHAPIRA. H.A, Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases, **Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.** 345, 50–54, 1994.

CNAMBERS, A.F.; GROOM, A.C.; MACDONALD, LC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature Reviews**, v. 2, p. 563-572, 2002.

CODY, V; JR, MIDDLETON. E; HARBORNE, B J. **Progress in Clinical and Biological Research**. Biochemical, Pharmacological, and Structure-activity relationships. Volume 213. New York, Copyright, 1986 by Alan R, Liss.

COLES, E. H. **Veterinary clinical pathology**. 4.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986b. Cap. 7: Liver function, p. 129-151.

COOK, N.C; SAMMAN S. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources – review. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 7, n. 1, p. 66-76, 1996.

COS P, YING L, CALOMME M, ET AL. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. **J Nat Prod**. v. 61, 71–6, 1998.

COSTA, MIRELA TINUCCI; FABENI, RITA DE CÁSSIA; APTEKMANN, KARINA PREISSING *et al*. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. **Cienc. Rural**, set./out. 2003, vol.33, no.5, p.967-974. ISSN 0103-8478.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 233-293, 2000.

CRAGG. G.M, NEWMAN. D.J, SNADER. K.M, Natural products in drug discovery and development, **J Nat Prod**. 60 ,52–60, 1997.

DAGLI, M.L.Z. **Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental**. São Paulo, USP, 1989, p.148. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia) - Universidade de São Paulo, 1989.

DAGLI, M.L.Z., LORIS, S.C.S., GUERRA, J.L. Effect of B-carotene on development of the solid Ehrlich tumor in mice. **Life Science**, v. 71, p. 717-724, 2002.

DAWE, C.J. Comparative neoplasia. In: HOLLAND, J. F. & FREI III, E. **Cancer medicine**. 2. ed. Philadelphia : Lea & Febiger, 1982. p. 209.

DEGÁSPARI, C.H; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, Jan- Jun./2004

DJURIC, Z., CHEN, G., DOERGE, D.R., HEILBRUN, L.K., KUCUK, O., Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. **Cancer Letters**, v. 172, p. 1-6, 2001.

DORMOND. O, FOLETTI. A, PAROZ. C, RUEGG. C, nsoids inhibit alpha beta 3 integrin-mediated and Cdc41Rac-dependent endothelial cell spreading, migration and angiogenesis, **Nat. Med.** v.7, 1041–1047, 2001.

DUDA, G.D; FUKUMURA, D; JAIN, K.R. Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. **Trends in Molecular Medicine** Vol.10 No.4 April 2004

ETHERTON, P.M.K., HECKER, K.D., BONANOME, A., COVAL, S.M., BINKOSKI, A.E., HILPERT, K.F., GRIEL, A.E. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n.9B, p. 71s-88s, 2002.

FERGUSON, L.R.. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, v. 475, p. 89-111, 2001.

FERRALI M, SIGNORINI C, CACIOTTI B, ET AL. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. **FEBS Lett.**9, 416:423, 1997.

FERRANDIZ ML, ALCARAZ MJ. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents Actions**, v.32, 283–288, 1991.

FONSECA, C.S., DALECK, C.R., REPETTI, L., NETTO, T.R., BORLINA, A.A.. Terapias sistêmicas e oncologia veterinária. **Nosso Clínico – Medicina Veterinária para Animais de Companhia**. Ano 5, n.30, p.28-38, 2002.

FORMICA, J.V., REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Fd Chem Toxic.** V.33, n.12, p. 1061-1080, 1995.

FOSSLIEN. E, Review: molecular pathology of cyclooxygenase- 2 in cancer-induced angiogenesis, **Ann. Clin. Lab Sci.** v.31, 325–348, 2001.

FRIESENECKER B, TSAI AG, INTAGLIETTA M. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. **Int J Microcirc Clin Exp;**15(suppl):17–21, 1995.

FRITZ, W., WANG, H., ELTOUM, I.E., LAMARTINIERE, C.A.. Dietary genistein down-regulates androgen and estrogen receptor expression in the rat prostate. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 186, p.89-99, 2002.

FUKUDA. R, KELLY. B, SEMENZA. L.G, Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1, **Cancer Res.** 63 2330–2334, 2003.

GABAI, V.L., ZAMULAEVA, I.V., MOSIN, A., YULIA, M.M., BUDAGOVA, Y.V., KABAKOV, A.E. Resistance of Ehrlich tumor cells to apoptosis can be due accumulation of heat shock proteins. **Cancer Letters**, v.375, p.21-26, 1995.

GENTILE, L.F. **Modulação por PGE₂ no perfil de subpopulações celulares e de citocinas na evolução do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).** Botucatu, UNESP, 2001, 101 p. Dissertação (Mestrado em Medicina) -Universidade Estadual Paulista, 2001.

GHAFOURIFAR. P, BRINGOLD. U, KLEIN. D.S, RICHTER. C, Mitochondrial nitric oxide synthase, oxidative stress and apoptosis, **Biol. Signals Recept.** 10 (2001) 57–65.

GIBBS, W.W. Desvendando as raízes do câncer. **Scientific American**, v. 2, n. 15, p. 39-47, 2003.

GILMAN, G.A., HARDMAN,, J.G., LIMBIRD, L.E. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 10a edição, Rio de Janeiro , Editora McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 1.671p, 2003

GOSSLAU, A., CHEN, K.Y. Nutraceuticals, apoptosis, and disease prevention. **Nutrition**, v. 20, n.1, p. 95-102, 2004.

GRACE, P.A. Ischaemia-reperfusion injury. **Br J Surg** 1994;81:637–47.

GREENWALD, P., CLIFFORD, C.K., MILNER, J.A. Diet and cancer prevention. **European Journal of Cancer**, v. 37, p.948-965, 2001.

GUPTA, M., MAZUMDER, U.K., KUMAR, R.S., SIVAKUMAR, T., VAMSI, M.L.M. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich Ascites carcinoma in swiss albino mice. **Journal of Pharmacological Science**, v.94, p.177-184, 2004.

HARBORNE, B.J; WILLIAMS, A.C. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry** 55 (2000) 481-504.

HARNDEN D.G.; MCGEE, J.O'D. Neoplasia. In: MCGEE, J.O'D.; ISAACSON, P.G.; WRIGHT, N.A. Oxford Textbook of Pathology, **Oxford University Press**, v. 1, p. 571-717, 1992.

HAUSBERGER, R.; DE BEM, R.S.; ALENCAR, B.L.F.; PEDROSO, M.L.A.; BOARETTI, A.C.; MESSIAS-REASON, L.J.T. Comportamento do sistema complemento no líquido ascítico de diferentes etiologias. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 37, n. 3, p.187-196, 2001.

HEIM, E.K; TAGLIAFERRO, R.A; BOBILYA, J.D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry** 13 (2002) 572–584

HONG, J, SMITH. J. T, HO. T.C, AUGUST. A D, YANG. S C, Effects of purified green tea and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues, **Biochem. Pharmacol.** 62 (2001) 1175–1183.

HUANG, Y. et al. Inhibition of nitric oxide/cyclic GMP-mediated relaxation by purified flavonoids, baicalin and baicalein, in rat aortic rings. **Biochemical Pharmacology** 67 (2004) 787–794

HULS. G, KOORNSTRA J.J, KLEIBEUKER. H.J, Non-steroidal anti-inflammatory drugs and molecular carcinogenesis of colorectal carcinomas, **Lancet** 362 (2003) 230–232.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER; **Ministério da Saúde**. Estimativa 2005/ incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 2004. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/publicacoes>.

JAIN RK. Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. **Semin Oncol** 2002;29:3–9.

JÚNIOR. C.B.G; KLUMBE. E.C; MAIA C.R. P53 and hematological malignancies **Revista Brasileira de Cancerologia**, 48(3): 419-427, 2002

KENNEDY, D.O., KOJIMA, A., MOFFATT, J, et al. Cellular thiol status-dependent inhibition of tumor cell growth via modulation of retinoblastoma protein phosphorylation by (-)-epigallocatechin. **Cancer Letters**, v. 179, p. 25-32, 2002.

KORKINA. LG, AFANAS'EV IB, Antioxidant and chelating properties of flavonoids. **Adv Pharmacol** 1997;38:151–63.

KROEFF M. O câncer é curável? **Revista Brasileira de Cancerologia** 2004; 50(1): 5-6

LANDER. E.S, LINTON. L.M, BIRREN. B, NUSBAUM. C, ZODY. M.C, BALDWIN. J, DEVON. K, DEWAR. K, DOYLE. M, FITZHUGH. W, ET AL., initial sequencing and analysis of the human genome, **Nature** 409 (2001) 860–921.

LAUTRAITE. S, MUSONDA. AC, DOEHMER. J, EDWARDS. GO, CHIPMAN. JK. Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. **Mutagenesis** 2002;17:45–53.

LIMA, L.R.P., OLIVEIRA, T.T., NAGEM, T.J. Efeitos dos flavonóides quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. **Revista de Nutrição**, v.16, n.3, p.1-11, 2003.

LIOTTA, L.A.; KOHW, E.C. Cancer biology: invasion and metastases. In: BAST, R.C.; KUFEL, D.W.; POLLOCK, R.E.; WEICHELBAUM, R.R.; HOLLAND, I.F.; FREI, E.; GANSIER, T.S. **Cancer Medicine**. 5 th ed. Canada: BC Decker Inc, 2000. www.pubmed.com. Acesso 24/11/04.

LOO, G.Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (Review). **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.14, p. 64-73, 2003.

MADELAINE. J; ZALCMAN. G. Biology of bronchial cancers. **EMC-Pneumologie** 2 9–31, 2005.

MAEDA, H.; AKAIKE, T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. **Biochemistry (Mosc)**, v.63, n.7, p.854-865, 1998. /Resumo/.

MANSON, M. Cancer prevention – the potencial for diet to modulate molecular signaling. **Trends in Molecular Medicine**. V.9, n.1, p. 11-18, 2003.

MARCHAND, L.L. Cancer preventive effects of flavonóides – a review. **Biomed Pharmacother**, v.56, p.296-301, 2002

MARRONI, N.P., MARRONI, C.A. **Estresse Oxidativo e Antioxidante**. Porto Alegre: Editora Ulbra, 2002 p.33-48.

MATSUZAKI, P., AKISUE, G., OLORIS, S.C.S., GORMIAK, S.L., DAGLI, M.L.Z. Effect of *pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascit form. **Life sciences**, v.74, p. 573-579, 2003.

MELLO HV, SILVA JF. A criação de coelhos. 2.ed. Rio de Janeiro: **Publicações Globo Rural**; 1988.

MEOHAS W; PROBSTNER D; VASCONCELLOS T.A.R; SÁ LOPES C.A; NETO REZENDE F.J; FIOD J.N. Metástase óssea: revisão da literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia** 2005; 51(1): 43-47

MEYER, D. J., COLES, E.H., RICH, L. J. Veterinary laboratory medicine. **Philadelphia: W.B. Saunders**, 1992b. Cap. 7: Pancreatic and intestinal tests, p. 83-92.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Review**, v.43, n.2, p.109-142, 1991.

MORAN. E.M, Epidemiological and clinical aspects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer risks, **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.** 21 (2002) 193–201.

MUTOH M, TAKASHI M, FUKUDA K, KOMATSU H, ENYA T, MASUSHIMA-HIBIYA Y, MUTOH H, SUGIMURA T, WAKABAYASHI K. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. **Jpn J Cancer Res** 2000;91:686–91.

NARKO. K, RISTIMAKI. A, MACPHEE. M, SMITH. E, HAUDENSCHILD. C.C, HLA. T, Tumorigenic transformation of immortalized ECV endothelial cells by cyclooxygenase-1 overexpression, **J. Biol. Chem.** 272 (1997) 21455–21460.

NASSIR F, WIOLETTA Z, BAYLE D, GUEUX E, RAYSSIGUIER Y, MAZUR A. Hypoalbuminaemia in acute phase response is not related to depressed albumin synthesis: experimental evidence in magnesium deficient rat. **Nutr Res** 2000; 22:489-96.

NELSON CW, WEI EP, POVLISHOCK JT, KONTOS HA, MOSKOWITZ MA. Oxygen radicals in cerebral ischemia. **Am J Physiol** 1992;263: H1356–62.

NERY R.H.L. Eficácia da dexametasona e da doxorubicina no tumor de Ehrlich transplantado em camundongos Balb/c. Viçosa, UFV, 2004,. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de Viçosa, 2004.

NIJVELDT, J.R; NOOD, V.E; HOORN VAN, D.E.C; BOELEN, G.P; NORREN VAN, K; LEEUWEN VAN, M.A.P. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr**, (2001) 74 418–25.

NOVELLI, D.M. Disponível: site LIDO (Laboratório de informática dedicado à odontologia, 2000) [URL:http://www.fo.usp.br/lido/potoartegeral/patoarteinfl2.htm](http://www.fo.usp.br/lido/potoartegeral/patoarteinfl2.htm)
[Consultado em 02 set.2005.](#)

O'PREY, J., BROWN, J., FLEMING, J HARRISON, P.R..Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 2075-2088, 2003.

OLIVEIRA, S.L, FECCHIO, D., BRUMATTI,G., LANDRAF, R.G., AMARANTE, MG.P., JANCAR, S. Efeito antagonista de PAF no número de células, apoptose, produção de PGE2 e no crescimento do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Instituto de Ciências Biomédicas, USP, **Pôster 236**,2003.

ORSOLIC, N., KOSALEC, I., BASIC, I. Synergistic antitumor effect of polyphenolic componente of water soluble derivate of propolis against Ehrlich ascites tumor. **Biol. Pharm. Bull.** V. 28, i.4, p.694-700, 2005.

PADILHA. C.P; PINHEIRO L.R. O Papel dos Alimentos Funcionais na Prevenção e Controle do Câncer de Mama. **Revista Brasileira de Cancerologia** 2004; 50(3): 251-260

PAI. R, SOREGHAN. B, SZABO. L.I, PAVELKA. M, BAATAR. D, TARNAWSKI. S.A, Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy, **Nat. Med.** 8 (2002) 289–293.

PELZER, E.L; GUARDIA, T; JUAREZ, O; GUERREIRO, E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **IL Farmaco** 53 (1998) 421-424

PETERSON, J; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.

RASO GM, MELI R, DI CARLO G, PACILIO M, DI CARLO R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Sci** 2001;68:921–31.

REDDY, L., ODHAV, B., BHOOLA, K.D.. Natural products for cancer prevention: a global prespective. **Pharmacology & Therapeutics**, v.99, p.1-13, 2003.

RIZZO, M.S. **Colonização preferencial e disseminação do tumor transplantável de ehrlich em camundongos.** São Paulo, 2000. 100p. Dissertação (Doutorado). Faculdade

de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo.

RODRIGUEZ L.A, HUERTA-ALVAREZ. C, Reduced incidence of colorectal adenoma among long-term users of S. Zha et al. / **Cancer Letters** 215 (2004) 1–20
15 nonsteroidal antiinflammatory drugs: a pooled analysis of published studies and a new population-based study, **Epidemiology** 11 (2000) 376–381.

ROOS, E. Cellular adhesion, invasion and metastasis. **Biochimica et Biophysica Acta**, V. 738, p.263-284, 1984.

RUSAK, G., GUTZEIT, H., MULLER, J.L. Structurally related flavonoids with antioxidative properties differentially affect cell cycles progression and apoptosis of human acute leukemina cells. **Nutrition Research**, v. 25, p.141-153, 2005.

SAAD-HOSSNE R, HOSSNE WS, PRADO RG. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumorascítico de Ehrlich: estudo experimental in vitro. **Acta Cir Bras [serial online]** 2004 Jan-Fev;19. Disponível em [URL:http://www.scielo.br/acb](http://www.scielo.br/acb).

SAAD-HOSSNE R. Tumor hepático experimental (VX-2) em coelho: implantação do modelo no Brasil. **Acta Cir Bras [serial online]** 2002 Jul-Ago; 17. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>.

SAKATA, K., HIROSE, Y., QIAO, Z., TANAKA, T., MORI, H. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. **Cancer Letters**, v. 199, p. 139-145, 2003

SANHUEZA J, VALDES J, CAMPOS R, GARRIDO A, VALENZUELA A. Changes in the xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase ratio in the rat kidney subjected to ischemia-reperfusion stress: preventive effect of some flavonoids. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol** 1992;78:211–8.

SCHULTZ, D.R., HARRINGTON, W.J. Apoptosis: programmed Cell death at a molecular level. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v.32, n.6, p. 345-69, 2003.

SHAN, Z; YEGNASUBRAMANIAN, V; NELSON, W; WILLIAM B; DE MARZO. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. **Cancer Letters** 215 (2004) 1–20

SHARMA, R.A., HARRIS, A.G.D., STEWARD, W.P., O'BYME, K.J.. Angiogenesis as a biomarker and target in cancer chemoprevention. **The Lancet Oncology**, v. 2, p. 726-732, 2001.

SHEIKE, N., WANIBUCHI, H. MORIMURA, K., WEI, M., NISHIKAWA, T., HIRATA, K., YOSHIKAWA, J., FUKUSHIMA, S. Enhancement of lung carcinogenesis by nonylphenol and genistein in a F344.2003

SHENG. H, MORROW. D.J, BEAUCHAMP. D.R, DUBOIS. N.R, Modulation of poptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells, **Can. Res.** 58 (1998) 362–366

SHIRAI, T., ASAMOTO, M., TAKAHASHI, S., IMAIDA, K. Diet and prostate câncer. **Toxicology**, v. 181-182, p. 89-94, 2002.

SHOSKES. DA, Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents. **Transplantation** 1998;66:147–52.

SHUTENKO Z, HENRY Y, PINARD E, ET AL. Influence of the antioxidant quercetin in vivo on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. **Biochem Pharmacol** 1999;57:199–208.

SIMÕES, C; SCHENKEL, E; GOSMANN, G; MELLO, J; MENTZ, L; PETROVICK, P. **Farmacognosia** da planta ao medicamento. 2ª ed. rev. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed Universidade /UFRGS/ Ed. Universidade/ UFSC, 2000

STRAUSS, L., SANTTI, R., SAARINEN, N., STRENG, T., SURESH, J., MAKELA, S. Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease. **Toxicology Letters**, v. 102-103, p. 349-354, 1998.

SURH, Y.J., FERGUSON, L.R. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential – highlights of a symposium. **Mutation Research**, v. 523-524, p. 1-8, 2003.

TANAKA, K.; SONOO, H.; KUREBA Y ASHI, J.; NOMURA, T.; OHKUBO, S.; Y AMAMOTO, Y.; Y AMAMOTO, S. Inhibition of infiltration and angiogenesis by thrombospondin-1 in papillary thyroid carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 1125-1131, 2002

VALERIO JR LG, KEPA JK, PICKWELL GV, QUATTROCHI LC. Induction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene expression by the flavonol quercetin. **Toxicol Lett** 2001;119:49–57.

VAN ACKER SA, TROMP MN, HAENEN GR, VAN DER VIJGH WJ, BAST A. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. **Biochem Biophys Res Commun** 1995;214:755–9.

VARALDO C. Disponível: site AMIGOS DO C (12 fev. 2005) URL:<http://www.tubaraonarede.com.br/asp/amigosdoc/news.asp?tipo=show&id=27> Consultado em 4 jan. 2006.

VIVA SAUDÁVEL. Disponível: site MILLENNIUMBCP.PT. URL:<http://www.millenniumbcp.pt/template/print.jhtml?articleID=131880> Consultado em 4 jan. 2006.

WALLE, T. Flavonoids and isoflavones(phytoestrogens): absorption, metabolism and bioactivity. **Free radical biology & medicine**, vol.36, n.7, p.829-837, 2004

WEISS, J.F., LANDAUER, M.R. Protection against radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals. **Toxicology**, v. 189, p. 1-20, 2003.

WILLIAMS, R.J., SPENCER, J.P.E., EVANS, C.R. Flavonoids: antioxidant or signaling molecules? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 7, p. 838-849, 2004.

WÓJCIK, C., DeMARTINO, G.N. Intracellular localization of proteasomas. **The International Journal of Biochemistry e Cell Biology**, v.35, p. 579-589, 2003.

WOO, H; JEONG, R.B; HAWES, C.M. Flavonoids: from cell cycle regulation to biotechnology. **Review Biotechnology Letters** (2005) 27: 365–374

YANG, C.S; LANDAU, J.M; HUANG, M.T; NEWMARK, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, **Annu. Rev. Nutr.** 21 (2001) 381–406

ZORNIG, M., HUEBER, A.D., BAUM, W., EVAN, G. Apoptosis regulators and their role in tumorogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.155, p. 1-37, 2001.