

MARCELO AUGUSTO FILARDI

**EXTRATO FOLIAR DE ANONÁCEAS: CITOTOXICIDADE,
FLUXO DE ÍONS E MARCADORES TUMORAIS
EM CÉLULAS HEPATOCARCINOGENICAS**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa
como parte das exigências do
programa de pós-graduação em
Bioquímica Agrícola para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F478e
2014
Filardi, Marcelo Augusto, 1968-
 Extrato foliar de anonáceas : citotoxicidade, fluxo de
 íons e marcadores tumorais em células
 hepatocarcinogênicas / Marcelo Augusto Filardi. - Viçosa,
 MG, 2014.
 ix, 106f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Tânia Toledo de Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.89-106.

1. Plantas medicinais. 2. Anonáceas. 3. Carcinoma
hepatocelular. 4. Células HepG2. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola.
II. Título.

CDD 22. ed. 615.53

MARCELO AUGUSTO FILARDI

**EXTRATO FOLIAR DE ANONÁCEAS: CITOTOXICIDADE,
FLUXO DE ÍONS E MARCADORES TUMORAIS EM CÉLULAS
HEPATOCARCINOGENÉTICAS**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa
como parte das exigências do
programa de pós-graduação em
Bioquímica Agrícola para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovado: 02 de Julho de 2014.

Marcelo Nagem Valério de Oliveira

Marisa Alves Nogueira Diaz

Vanner Boere Souza

Virgínia Ramos Pizzolo
(Coorientadora)

Tânia Toledo de Oliveira
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Maria, Mãe de Deus, por me fazer vê-Lo também no mundo científico. Desde o mestrado. Desde sempre.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo ensino de qualidade e pela oportunidade de retribuir à sociedade o conhecimento científico que adquiri. Aos colegas do Laboratório de Infectologia Molecular Animal - BioAgro, Thiago Onofre, Raoni Siqueira e a todos os outros companheiros, pela convivência, contribuições e entusiasmo. Aos colegas do Laboratório de Biofármacos, muito obrigado a todos. Aos funcionários Aloisio Rezende Rodrigues, Eduardo Pereira Monteiro, Marcos José Machado Salgado e Sr. Valdir Soares Ferreira pelas contribuições sem limites. Vocês são muito importantes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

À Prof^a Tânia Toledo de Oliveira, pela confiança e liberdade. Liberdade: essa é a palavra. Obrigado por me fazer compreender que a motivação está perto demais: dentro de nós mesmos.

Aos professores Abelardo Silva Júnior, José Dantas Ribeiro Filho, Leandro Licursi de Oliveira, Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo, Marisa Alves Nogueira Diaz, Marcelo Nagem Valério de Oliveira (UFJF-GV), Vanner

Boere Souza e Virgínia Ramos Pizziolo, minha profunda gratidão pelas contribuições, co-orientação e esclarecimentos. Juntos fomos muito mais longe, fui muito mais forte. Aos Professores Juliana Lopes Rangel Fietto, Luciano Gomes Fietto e Maria Goreti de Almeida Oliveira, vocês todos são muito importantes. O mundo fica melhor assim. Agradecimentos sinceros também aos professores Michellia Pereira Soares (UNIRV-GO) e José Ferreira da Silva (UFAM-AM) pela disposição em ajudar.

Muda-se quando se tem na vida pessoas como João Carlos Chequer, Priscilla Siqueira Paes, Sílvio César Marchiori do Val e Vanderlei Altoé. Obrigado também a Alexandre Custódio Jorge, Maria Lucia Dantas de Menjivar, Vivian Maria Menjivar Dantas pela disposição em ajudar.

Nossos agradecimentos especiais ao Prof. Liovando Marciano da Costa (Depto. de Solos – UFV) e ao Dr. Marcelo Rocha da Costa por terem acreditado que poderíamos ir longe. E fomos, porque vocês foram imprescindíveis. A vida retribuirá.

Obrigado a mim mesmo. Pela coragem. Não ouvi, e a lei foi mudada.

Aos meus familiares, por serem a força que nunca encontrarei em outro lugar.

Por mais que eu cresça, é o mesmo coração.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. O câncer	4
2.2. O câncer no mundo	7
2.3. O câncer no Brasil	12
2.4. O carcinoma hepatocelular	14
2.4.1. Incidência e fatores de risco do Carcinoma Hepatocelular	15
2.4.2. Manifestações clínicas do Carcinoma Hepatocelular.....	21
2.4.3. Tratamento do Carcinoma Hepatocelular	21
2.4.4. Vias oncogênicas da hepatocarcinogênese.....	24
2.5. A química do câncer	29
2.6. Plantas como fonte de agentes antitumorais	37
2.7. Annonacea	40
2.7.1. Acetogeninas	40
2.7.2. Bioatividade antitumoral de Acetogeninas	43

	Página
3. OBJETIVOS	51
4. MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1. Reagentes.....	52
4.2. Equipamentos	52
4.3. Linhagem celular HepG2	53
4.4. Cultivo celular	53
4.5. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do vermelho neutro (<i>Neutral Red</i>).....	54
4.6. Extratos de folhas de Anonáceas	55
4.6.1. Preparo das soluções com os extratos de Anonáceas	55
4.6.2. Avaliação do efeito citotóxico dos extratos de Anonáceas.	57
4.7. Avaliação espectrométrica do efeito químico dos extratos	57
4.8. Avaliação dos marcadores celulares e tumorais.....	57
4.9. Avaliação do efeito apoptótico dos extratos de Anonáceas	58
4.10. Análise estatística	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1. Efeito do excipiente dos extratos sobre as células HepG2	59
5.2. Efeito dos extratos de Anonáceas sobre as células HepG2	63
5.3. Efeito dos extratos no fluxo químico celular.....	73
5.4. Efeito dos extratos sobre marcadores celulares e tumorais.....	77
5.5. Efeito do potencial apoptótico das Anonáceas	81
5.6. Perspectivas	85
6. CONCLUSÕES.....	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

RESUMO

FILARDI, Marcelo Augusto, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014. **Extrato foliar de Anonáceas: citotoxicidade, fluxo de íons e marcadores tumorais em células hepatocarcinogênicas.** Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Coorientadores: Leandro Licursi de Oliveira, Marcia Rogéria de Almeida Lamêgo e Virgínia Ramos Pizzolo.

O carcinoma hepatocelular é o mais frequente câncer primário do fígado e já se tornou a quinta neoplasia mais comum no mundo e a segunda causa de óbitos relatados por câncer. Estima-se que 2/3 das neoplasias humanas poderiam ser prevenidos pela modificação do estilo de vida, incluindo a dieta. Estudos farmacológicos intensificaram-se nos últimos anos com plantas da família *Annonaceae*, cujo interesse científico está nas acetogeninas, uma classe de compostos derivados de ácidos graxos com forte atividade antitumoral. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Infectologia Molecular Animal, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, na Universidade Federal de Viçosa, para avaliar *in vitro* as propriedades antitumorais de extratos foliares de 11 Anonáceas (9 espécies de 4 gêneros). Para isso, células tumorais hepáticas humanas da linhagem HepG2 (ATCC HB-8065™) foram expostas a três concentrações dos extratos foliares de Anonáceas e do quimioterápico 5-Fluoruracil (5-FLU), em três períodos de tempo (24, 48 e 72 h), com análise espectrofotométrica da viabilidade celular pela metodologia do corante vermelho neutro. Foram conduzidos ensaios para avaliar o efeito dos extratos vegetais e do quimioterápico sobre o fluxo químico celular no meio de cultura durante os cultivos através da análise por Espectrometria de

Emissão Atômica de diferentes espécies químicas, e sobre o metabolismo e integridade celular, através da análise de marcadores tumorais e intermediários metabólicos. Todos os ensaios induziram à morte celular, com resultados distintos entre plantas da mesma espécie, com até 100% de citotoxicidade, sendo que nove Anonáceas exibiram efeito citotóxico com até 1/8 da concentração daquela utilizada para o quimioterápico 5-FLU. Nenhum dos ensaios com extratos foliares exibiu retomada da proliferação celular após 48 ou 72 h, o que foi verificado para os cultivos com o quimioterápico, clara evidência de quimiorresistência tumoral. O mecanismo de morte celular por apoptose foi confirmado através da citometria de fluxo para dois dos extratos escolhidos, incluindo 5-FLU. Não houve um padrão no efeito dos extratos sobre o fluxo de íons ou dos marcadores tumorais durante os cultivos das células hepatocarcinogênicas, que se mostrou variável dentro da espécie ou entre elas, ou dentro de um mesmo gênero ou entre eles, com interferência na absorção de alguns íons especialmente, Ca, Na, P, S e depleção intracelular total de outros (Se, Zn) para alguns dos tratamentos. Marcadores bioquímicos como aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH) tiveram seus níveis elevados para alguns dos extratos utilizados, incluindo 5-FLU, resultado coincidente com a redução na absorção da glicose pelos hepatócitos tumorais, indícios da alteração no metabolismo e integridade celular.

ABSTRACT

FILARDI, Marcelo Augusto, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2014. **Leaf extract of Annonaceae: citotoxicity, ion flux and tumor markers in hepatic carcinogenic cells.** Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Co-advisers: Leandro Licursi de Oliveira, Marcia Rogéria de Almeida Lamêgo and Virgínia Ramos Pizziolo.

The hepatocellular carcinoma is the most common primary liver cancer and has become the fifth most common cancer worldwide and the second leading cause of cancer deaths reported. It is estimated that two thirds of human cancers could be prevented by changes in lifestyle, including diet. Pharmacological studies have intensified in recent years with the *Annonaceae* plant family, whose scientific interest is in the acetogenins, a class of compounds derived from fatty acids with strong antitumor activity. The experiments were conducted at the Laboratory of Molecular Animal Infectious Diseases, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Viçosa, to evaluate the in vitro antitumor properties of leaf extracts of 11 annonaceae (9 species of 4 genera). For this, human liver cancer cells HepG2 line (ATCC HB-8065™) were exposed to three different concentrations of leaf extracts of *Annonaceae* and of the chemotherapeutic 5-fluorouracil (5-flu) in three time periods (24, 48 and 72 h), with spectrophotometric analysis of cell viability by the neutral red dye method. Assays were conducted to evaluate the effect of plant

extracts and chemotherapeutic chemical flow cell on the culture medium during the cultivation by atomic emission spectrometry analysis of different chemical species, and the cellular integrity and metabolism, by analysis of tumor markers and metabolic intermediates. All assays induced cell death, with results between different plants of the same species, with up to 100% cytotoxicity, nine annonacea exhibited cytotoxic effect up to one eighth of the concentration of that used for the chemotherapeutic 5-flu. None of the trials with leaf extracts exhibited recovery of cell proliferation after 48 or 72 h, which was observed in cultures with chemotherapy, clear evidence of tumor chemoresistance. The mechanism of cell death by apoptosis was confirmed by flow cytometry for two extracts selected, including 5-flu. There was no pattern in the effect of the extracts on the flow of ions or of tumor markers during the cultivation of hepatic ocarcinogenic cells, which was variable within species or between or within the same genus or between them, interfering with the absorption of especially some ions, Ca, Na, P, S, and total depletion of other intracellular (Se, Zn) for some treatments. Biochemical markers such as aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) had their elevated levels for some of the extracts used, including 5-flu coincident result with a reduction in glucose uptake by tumor hepatocytes, evidence of changes in metabolism and cellular integrity.

1. INTRODUÇÃO

Responsável por uma em cada oito mortes em todo o mundo, o câncer causa mais mortes que tuberculose, AIDS e malária combinadas, ocupando o primeiro lugar em mortalidades em países desenvolvidos e o segundo lugar em países em desenvolvimento (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). O câncer não é totalmente conhecido, especialmente devido à complexidade etiológica que o envolve. Os tratamentos são desconfortáveis, agressivos ao paciente, sendo importante entender o melhor momento de intervenção ao tipo de câncer e seu estágio, utilizando a modalidade terapêutica apropriada. A qualidade de vida do paciente deve ser considerada prioridade no tratamento oncológico.

Estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais mostram que muitos constituintes da dieta estão associados à quimioproteção contra diferentes tipos de câncer em órgãos como mama, próstata, pulmão, cólon, estômago, fígado e rim. É estimado que mais de dois terços das neoplasias humanas poderiam ser prevenidos pela modificação do estilo de vida, incluindo a dieta. Um número cada vez maior de componentes da dieta tem sido reconhecido como agentes anticarcinogênicos (CANTWELL, 2012; FORTMANN et. al., 2013; RAMANLINGUM, MAHOMOODALLY, 2014; RASHED, 2014).

O carcinoma hepatocelular (CHC) é o mais frequente câncer primário do fígado com mais de 5% de novos casos/ano dos cânceres humanos, e a incidência mundial vem aumentando devido ao crescimento dos casos de hepatites (B e C) e das doenças relacionadas à obesidade. A taxa de sobrevida é baixa e não ultrapassa os seis meses: apenas de 3-5% registrada em países desenvolvidos, o que exige urgentemente novas pesquisas terapêuticas efetivas contra a doença (PIMENTA et. al., 2010). Sua incidência praticamente dobrou nos últimos 20 anos e já se tornou a quinta neoplasia mais comum no mundo e a segunda causa de óbitos relatados por câncer, ultrapassada apenas pelo câncer de pulmão (AHMED et al, 2006; JAHAN et. al., 2012; WHO, 2014).

O Brasil é considerado um país de média prevalência, com 5-10 casos/100.000 habitantes/ano, com forte associação à cirrose hepática em 70% dos casos de CHC, muito comum em pacientes portadores do vírus da hepatite B e C e alcoolistas (NCI, 2011a; ZHANG et. al., 2012a).

O câncer de fígado é caracterizado com potencial altamente agressivo. A quimioterapia sistêmica ainda é a maior opção de tratamento, mas está associada a uma eficiência variável e efeitos adversos severos. A cirurgia (ressecção ou transplante), mesmo em recorrência da doença, é um tratamento promissor (FUKS et. al., 2012), mas muitos pacientes em estágios avançados podem submeter-se somente a tratamentos paliativos, sendo a quimioembolização o tratamento mais efetivo (ZHANG et. al., 2012)

Estudos farmacológicos voltados para o tratamento do câncer têm se intensificado nos últimos anos com plantas tropicais da família *Annonaceae*. Com mais de 2.300 espécies, o interesse científico está na descoberta das acetogeninas, uma classe de compostos encontrada apenas nesta família de plantas (LIAW et. al., 2010; RAMALINGUM, MAHOMOODALLY, 2014).

Estruturalmente, as acetogeninas são derivadas de ácidos graxos alifáticos de cadeias longas (C₃₅-C₃₇), apresentando grande variedade de propriedades biológicas, em especial sua citotoxicidade e propriedades antitumorais. Sintéticas ou isoladas de Anonáceas, exibem propriedades farmacológicas antitumorais que poderão ser promissoras contra neoplasias quimioterápico-resistentes. Propriedades antineoplásicas já foram descritas *in vivo* e *in vitro* com efeitos atribuídos às acetogeninas, incluindo tumores

de fígado, pulmão, rim, ovário, próstata, leucemia, ileocecal, nasofaríngeal e melanoma (MCLAUGHLIN, 2008).

Estudos realizados no Laboratório de Biofármacos, da Universidade Federal de Viçosa, confirmam a atividade antitumoral apoptótica *in vitro* do extrato da anonácea *Trigynaea oblongifolia* sobre células leucêmicas (U932) e adenocarcinoma colorretal (Colo-205). Outros estudos (a serem publicados) confirmam o efeito antiproliferativo e citotóxico *in vitro* do extrato de folhas de *Annona muricata* (graviola) sobre células hepatocarcinogênicas HepG2 (ATCC HB-8065™), com um decréscimo na viabilidade celular de até 45% em 24 horas de cultivo, alcançando o maiores índices antiproliferativos de até 96% após 72 horas, na concentração de 8 mg/mL. O próximo passo é investigar o efeito comparativo *in vitro* de outras diferentes espécies de Anonáceas em células hepatocarcinogênicas HepG2, utilizando-se também do fármaco quimioterápico comercial 5-Fluoruracil nos ensaios, avaliando seus efeitos no metabolismo celular tumoral através da análise do fluxo químico em meios de cultivo e da liberação de marcadores tumorais *in vitro*, além da confirmação citométrica do efeito apoptótico provocado pelos extratos de Anonáceas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O câncer

Câncer ou **neoplasia** (*neo*, novo; *plasia*, crescimento) é um grupo de doenças caracterizado por crescimento anárquico e errático com expansão anormal de células desordenadas formando uma massa celular ou um *neoplasma*. É um distúrbio do crescimento e comportamento celulares, em que figuras mitóticas tipicamente mais abundantes apresentam alteração arquitetônica local (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). Tumores constituídos de células malignas em tecidos epiteliais de qualquer origem embrionária (ectoderme, mesoderme, endoderme) são denominados **carcinomas**. Quando toda a espessura de um epitélio perde a uniformidade celular individual, sua orientação e arquitetura (displasia), a lesão é considerada pré-invasiva e tem-se um carcinoma *in situ*. Neste caso, exibem as características citológicas de malignidade sem infiltração da membrana basal, um estágio anterior ao de um câncer invasivo. Em muitos órgãos (mama, fígado, pulmão, intestino) a maioria dos cânceres são **carcinomas**. Enquanto podem ter certas características em comum, diferentes tipos de neoplasias têm causas diferentes e podem apresentar respostas diferentes aos tratamentos (KUMAR et. al., 2013; YAO et. al., 2011).

Células tumorais proliferam muito mais rapidamente que células normais e ambas são afetadas pelos tratamentos anticâncer, limitando sua eficácia. O microambiente metabolicamente alterado resultante da transformação celular favorece a progressão carcinogênica e a quimiorresistência exigindo, por outro lado, um suprimento contínuo de energia e nutrientes canalizados para biossíntese de lipídios e outras macromoléculas para formação de novas células. A via glicolítica é a principal rota tumoral de obtenção de substratos anabólicos e energia (fornecendo 50-70% do ATP), mesmo em níveis fisiológicos de oxigênio e mitocôndrias intactas (“glicólise aeróbica” ou “efeito Warburg”) (WARBURG, 1956; ARCHETTI, 2014). Esse metabolismo tumoral reprogramado por oncogenes (AKT, mTOR), alterado e adaptado à hipoxia, característica de tumores sólidos, favorece a carcinogênese por intensificar a absorção de glicose (pela superexpressão de genes codificantes dos **transportadores transmembrana de glicose**, como o GLUT1) aumentando o fluxo de carbono disponível em desvios anabólicos da glicólise, via das pentoses fosfato e reações anapleróticas do ciclo de Krebs, favorecendo a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (Fig. 1). É intensa a redução de piruvato a lactato [reação catalisada pela isoforma PK-M2 da enzima **piruvato quinase**, presente somente em células tumorais e embrionárias], que é exportado para o meio extracelular [mediado pela isoforma LDH-A da **lactato desidrogenase**, superexpressa em células transformadas]. Além disso, um fluxo elevado de **glutamina** alimentando o ciclo de Krebs (via α -cetoglutarato) suporta as reações anapleróticas e o anabolismo tumoral mantendo a produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (efeito intensificado ainda pela ‘glicólise aeróbica’), vantagem seletiva ao microcarcinossistema intra e intercelular para as células tumorais, mas não para as células normais (ARCHETTI, 2014; BINGHAM et. al., 2014; COSTA et. al., 2014; ESCOTÉ, FAJAS, 2014, KEE, CHEONG, 2014; LU et. al., 2014).

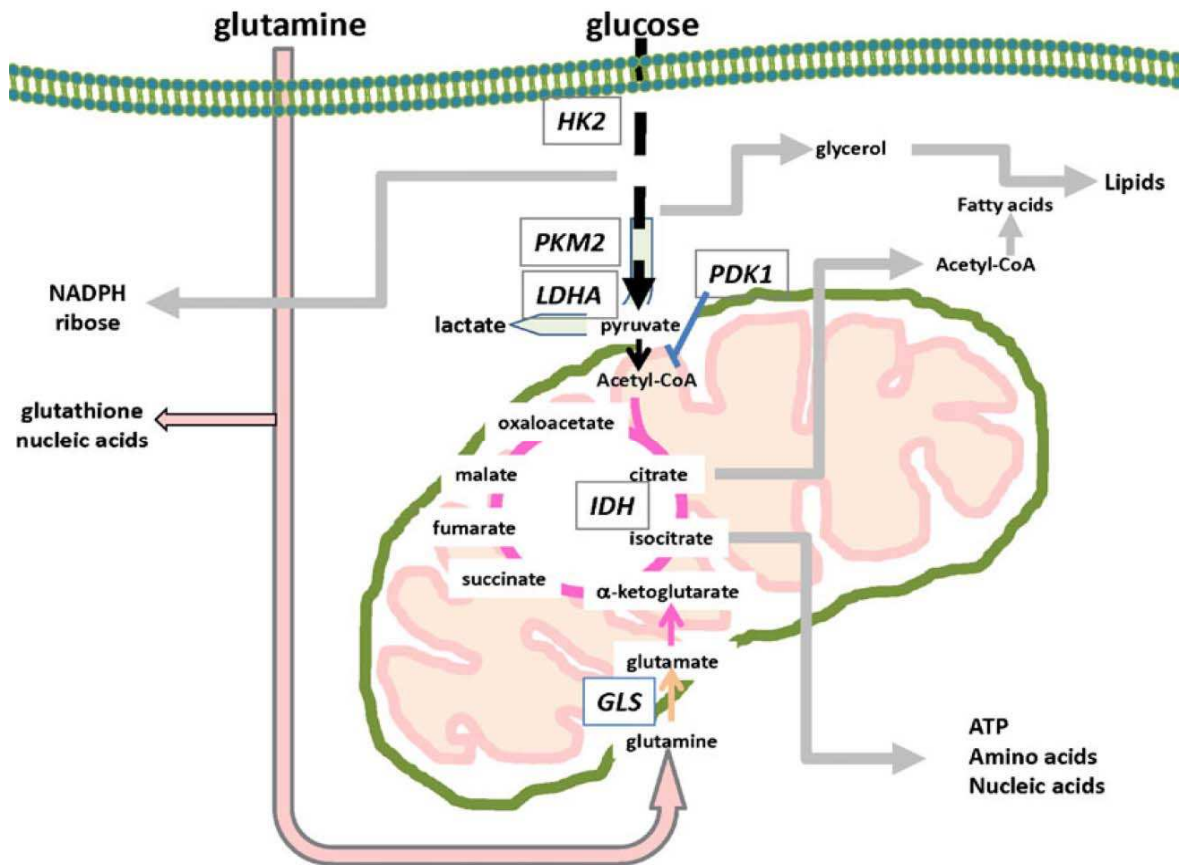


Figura 1 – Metabolismo celular tumoral. Glicose e glutamina são intensamente transportadas pela membrana e entram nas vias catabólicas através da glicólise e ciclo de Krebs. Glicose é convertida em trioses, que contribuem para biossíntese de lipídios, através da ação de enzimas como a hexoquinase-2 (HK2), piruvato quinase M2 (PKM2) e lactato desidrogenase A (LDHA). Piruvato desidrogenase quinase-1 (PDK1), que é ativada pelo fator de hipóxia (HIF-1), inibe a conversão de piruvato a acetil-CoA. Glutamina (que também contribui para síntese de ácidos nucleicos e glutatona) é convertida a glutamato pela enzima glutaminase (GLS) para ser catabolisada a α -cetoglutarato e entrar no ciclo de Krebs, onde está presente a isocitrato desidrogenase (IDH). Carbonos anabólicos do ciclo de Krebs contribuem para a síntese de aminoácidos, lipídios e ácidos nucleicos (DANG et. al., 2011).

As publicações científicas sobre a base molecular do câncer ultrapassaram até mesmo o ritmo de crescimento dos tumores mais malignos! Em mais de duas décadas de pesquisas, um “censo” genético identificou cerca de 400 genes que codificam proteínas tumorais, implicados na patogênese do câncer quando mutados, o que representa quase 2% dos estimados 25.000 genes codificantes do genoma humano (FUTREAL et. al., 2004; SANTARIUS et. al.; 2010).

Mutações nos genes que controlam a proliferação celular ou apoptose são responsáveis pelo câncer e quando ativados são chamados *oncogenes* e, se inativados, são ditos *supressores tumorais* (KAUSELMANN et. al., 2012). Oncogenes codificam oncoproteínas, alterações de suas versões normais, envolvidos em vias de sinalização que controlam a proliferação celular, enquanto que genes supressores atuam em pontos críticos da proliferação ou morte celular (AGARWAL et. al., 2012; MASGRAS et. al., 2012).

Em nível molecular, a progressão tumoral resulta do acúmulo de lesões genéticas que, em alguns casos, são favorecidas por defeitos durante o reparo do DNA resultante da expansão clonal de uma única célula transformada. São comuns mutações envolvendo um único gene e alguns poucos quilobases ou vários genes e inúmeros megabases do DNA, ocasionando regiões amplificadas provocando a superexpressão de determinados segmentos que levam à tumorigênese (FUTREAL et. al., 2004).

As células têm mecanismos bioquímicos elaborados para prevenir a entrada prematura no ciclo celular, assegurando todo o suporte bioquímico para a síntese de DNA e proteínas (Fig. 2). Ciclinas, quinases ciclino-dependentes (CDKs), proteínas retinoblastomas (Rb) e fatores de transcrição (E2F) são reguladores da proliferação e coordenam a transição de cada fase do ciclo. A via ciclina/cdk4-E2F1-pRb regula o metabolismo “glicolítico aeróbico” tumoral mantendo o ‘efeito Warburg’ (AGARWAL et. al., 2012; MASGRAS et. al., 2012; YAO et. al., 2012; ESCOTÉ, FAJAS, 2014).

2.2. O câncer no mundo

Responsável por uma em cada oito mortes em todo o mundo, o câncer causa mais mortes que AIDS, tuberculose e malária combinadas, ocupando o primeiro lugar das mortalidades em países desenvolvidos e o segundo lugar em países em desenvolvimento (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014; WHO, 2014). A taxa média de sobrevivência de todos os tipos de câncer combinados, após 5 anos da descoberta da doença, é de 68% (NCI, 2010). A Figura 3 apresenta uma projeção das mortes provocadas por causas diversas em países desenvolvidos, países emergentes (como o Brasil) e países pouco desenvolvidos.

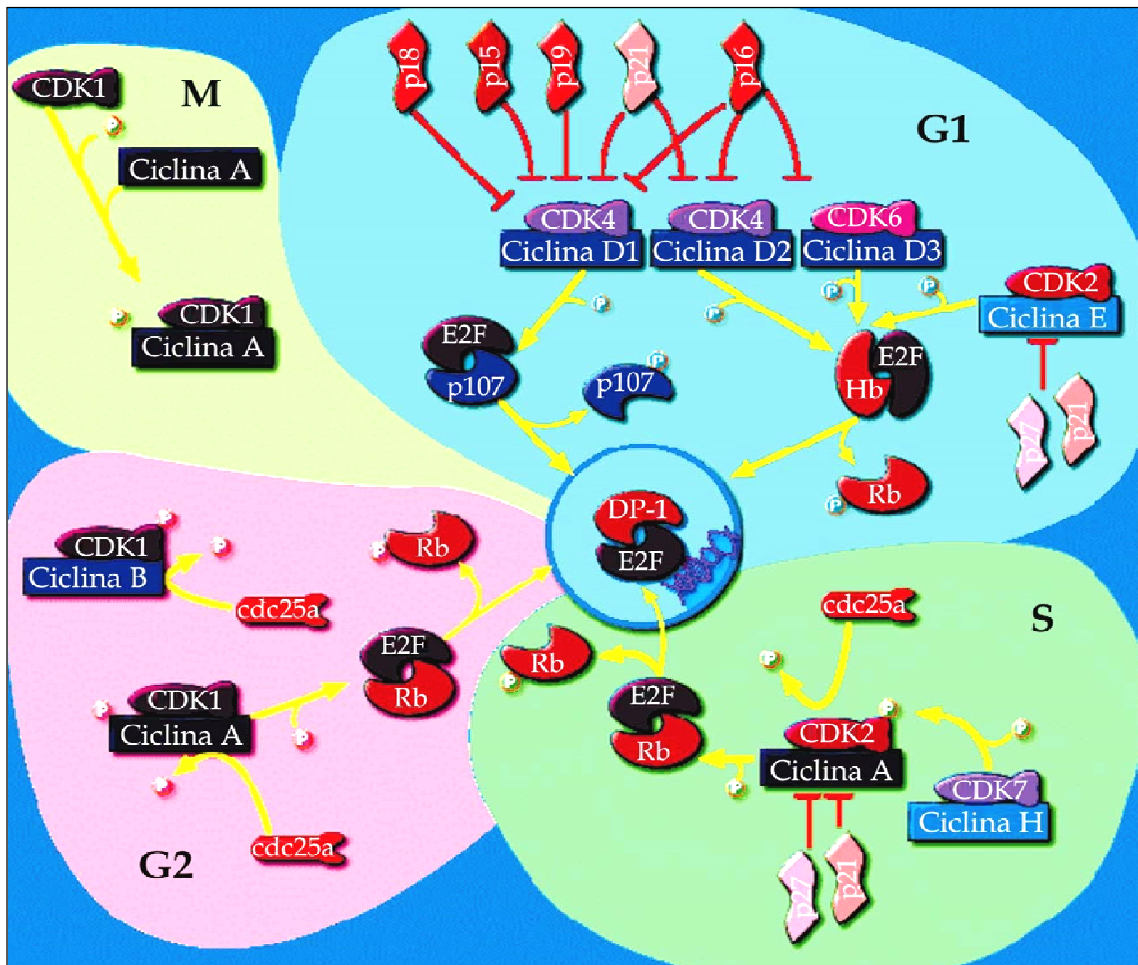
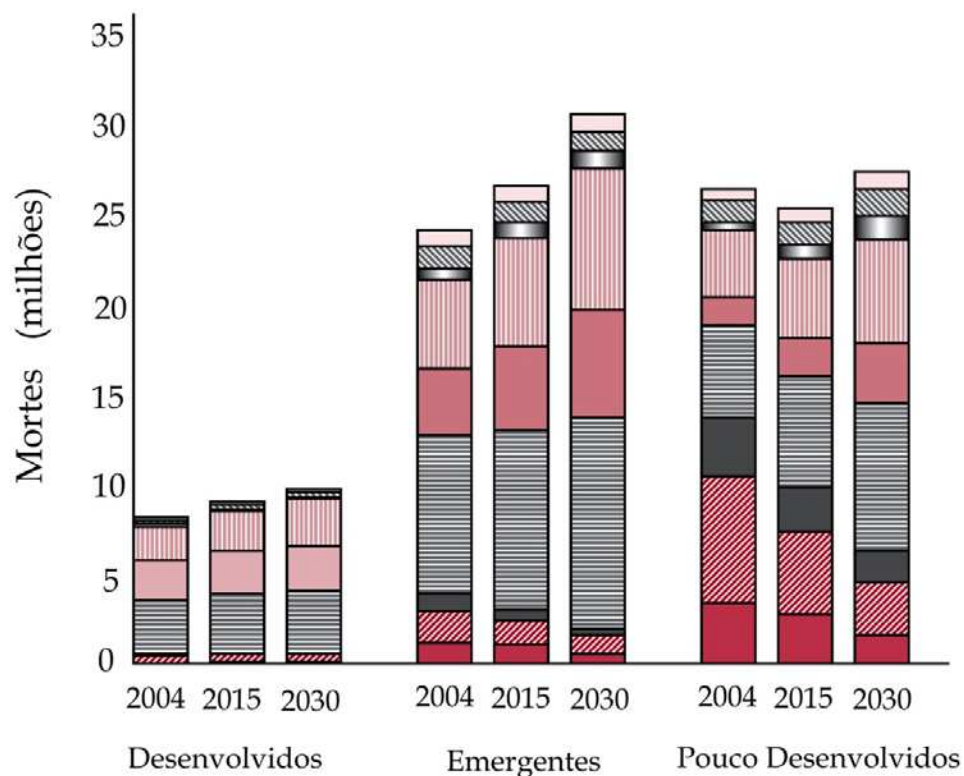


Figura 2 – Pontos regulatórios no ciclo celular em G1, S e G2. Múltiplos mecanismos previnem a passagem inapropriada da fase G1 para S, onde ocorre a síntese de DNA. Um ponto central é a fosforilação de membros da família RB, como o P107 pelas enzimas quinase ciclino-dependentes (CDKs). A fosforilação libera e ativa o fator de transcrição E2F que controla transcrição de um número de genes requeridos para entrada da célula na fase S, cuja continuidade se dá por ciclinas adicionais que mantêm o estado fosforilado de RB. Estão mostrados também outros pontos de checagem que podem ser ativados em G2 ou M do ciclo celular em resposta a danos no DNA (BERTRAM, 2001).



- Injúrias intencionais
- ▨ Outras injúrias não intencionais
- ▣ Acidentes de automóveis
- ▤ Outras doenças não comunicadas
- Câncer
- ▨ Doenças cardiovasculares
- Condições perinatais, maternal e nutricional
- ▨ Outras doenças infecciosas
- HIV, malária, Tabagismo

Figura 3 – Mortes projetadas por causas diversas em países desenvolvidos, países emergentes e países pouco desenvolvidos (WHO, 2008).

Fatores de risco ambientais e comportamentais são responsáveis por 35% das mortes por câncer: índice de massa corporal elevado, dieta pobre em vegetais, sedentarismo, tabagismo, alcoolismo, sexo não seguro, poluição do ar nas cidades e em locais fechados, seringas injetáveis contaminadas. Associados a causas infecciosas, alcançam 45% das mortes por câncer em todo o mundo, sendo 63% das mortes por câncer de estômago são causados pela infecção com *Helicobacter pylori* e 73% das mortes por câncer no fígado são causados por infecção com vírus da hepatite (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014; NCI, 2011b; WHO, 2012).

No mundo, o câncer de pulmão é o mais fatal (19,4%), seguido pelo câncer de fígado (9,1%) e estômago (8,7%) (IARC, 2013; WHO, 2014). Nos Estados Unidos, e em muitas outras partes do mundo, o câncer é o maior problema de saúde pública, onde uma em cada quatro mortes é devido ao câncer, com diferenças no padrão de incidência entre homens e mulheres (Fig. 4) (SIEGEL et. al., 2014).

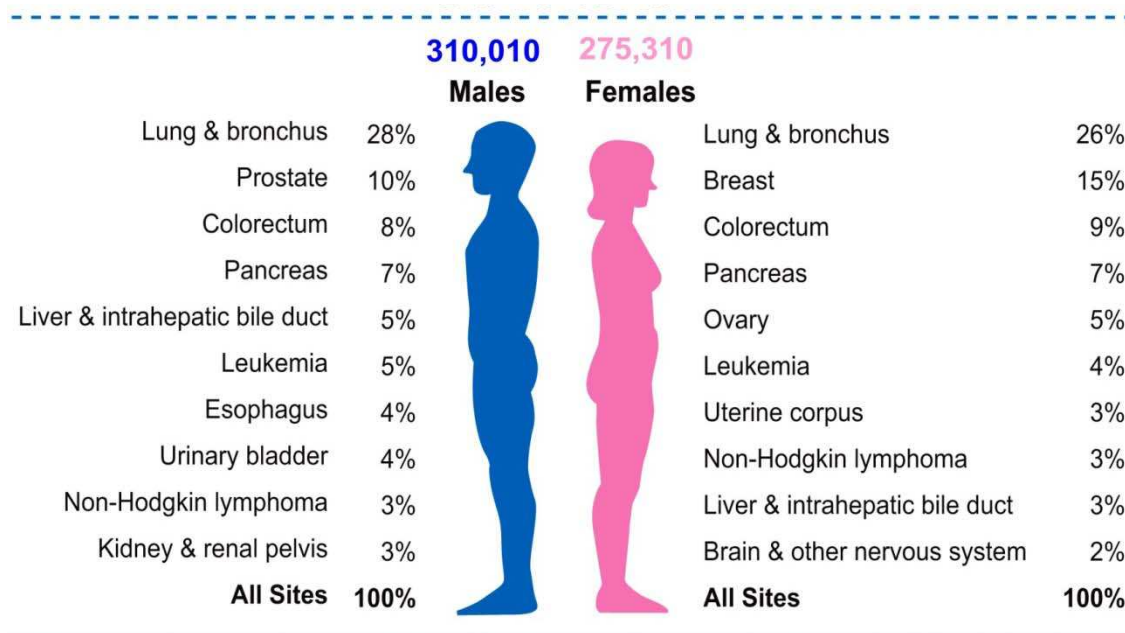


Figura 4 – Mortes estimadas para 2014 dos dez tipos de neoplasias mais incidentes nos EUA (SIEGEL, 2014).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o impacto global do câncer mais que dobrou nas últimas décadas e poderá ter um aumento de 50% até 2020, de 10 milhões de novos casos no ano 2000 para 15 milhões em 2020, sendo que 2/3 das mortes ocorrerão principalmente em países de médio e baixo desenvolvimento. A projeção para 2030 é que as neoplasias ocupem o 3º lugar, ficando atrás das doenças cardiovasculares e desordens fisiológicas, como as do sistema digestório, respiratório, genito-urinário e neuro-endócrino (IARC, 2009), com 13,2 milhões de mortes, em consequência do crescimento e envelhecimento da população (INCA, 2014). Até 2050, espera-se que o número de pacientes diagnosticados anualmente com

câncer cresça mais que o dobro, com projeção nos custos de tratamento superior à U\$ 80 bilhões apenas na próxima década (LI et. al., 2011).

A Tabela 1 lista as dezoito maiores causas de morte no mundo para homens e mulheres e sua projeção mundial para 2030, com mudança na posição do ranking em 2002 e 2030. Infecções nas vias respiratórias inferiores, condições perinatais, doenças da diarreia, malária e sarampo apresentam projeção ao declínio substancial até 2030. Por outro lado, diabetes melitos, cânceres de fígado, estômago, colorretal e pulmão têm projeção para subir três ou mais posições no ranking (MATHERS, LONCAR, 2006).

Tabela 1 – Mudança de posição no ranque das maiores causas de morte no mundo, entre 2002 e 2030 (MATHERS, LONCAR, 2006).

DOENÇA OU INJÚRIA	RANQUE 2002	RANQUE 2030	MUDANÇA NO RANQUE
Doenças Isquêmicas do Coração	1	1	0
Doenças Cerebro-Vasculares	2	2	0
Infecções Respiratórias Inferiores	3	5	↓2
AIDS	4	3	↑1
Doença Obstrutiva Pulmonar Crônica	5	4	↑1
Condições Perinatais	6	9	↓3
Doenças da Diarreia	7	16	↓9
Tuberculose	8	23	↓15
Câncer de Traqueia, Brônquio e Pulmão	9	6	↓3
Acidentes Automobilísticos	10	8	↑2
Diabete Melitos	11	7	↑4
Malária	12	22	↓10
Doenças Cardíacas Hipertensivas	13	11	↑2
Injúrias auto-Imunes	14	12	↑2
Câncer de Estômago	15	10	↑5
Nefrites e Nefrose	17	13	↑4
Cânceres de cólon e reto	18	15	↑4
Cânceres hepáticos	19	14	↑5

2.3. O câncer no Brasil

No Brasil, o câncer é a segunda causa de morte, com destaques para as doenças cardiovasculares que ocupam o 1º lugar e as doenças respiratórias, o 3º lugar (Fig. 5) (BRASIL, 2011; WHO, 2011a). Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2014) para o ano de 2015, surgirão mais de 576 mil casos novos de câncer sendo que, em homens, os tipos mais incidentes são próstata, pulmão, cólon/reto; o fígado ocupa a oitava posição; nas mulheres, mama, útero e cólon e reto são as neoplasias mais frequentes entre as 10 mais incidentes (Fig. 6), acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina.

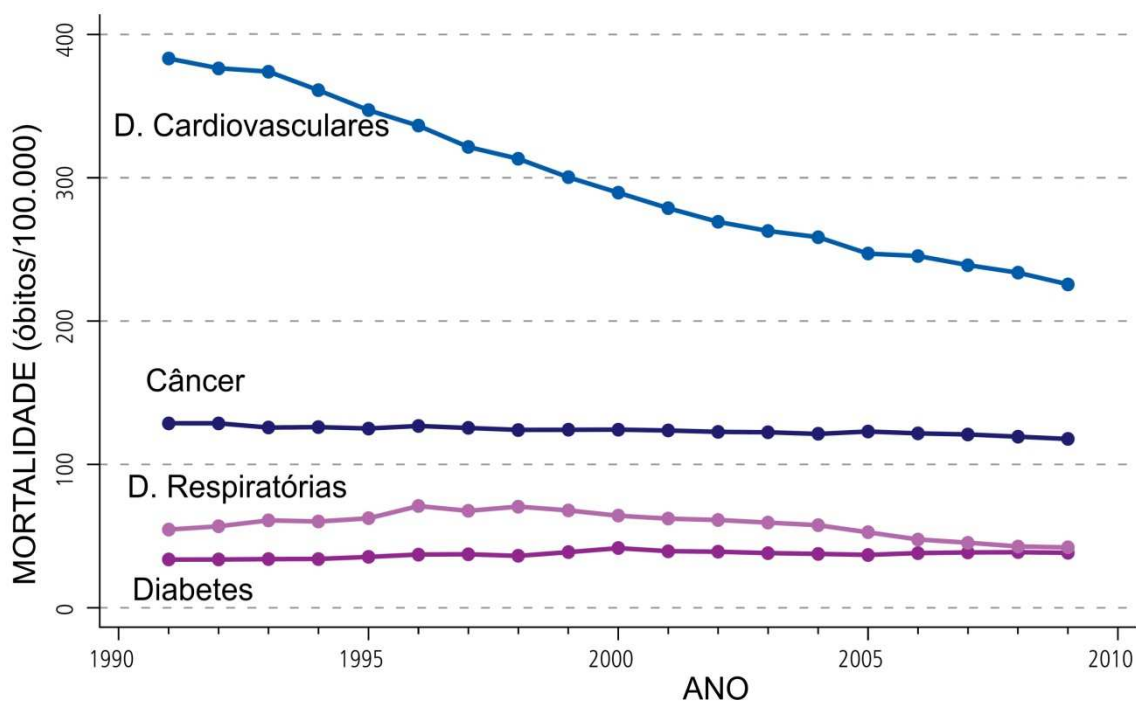


Figura 5 – Mortalidade (óbitos/100.000) pelas principais doenças crônicas não transmissíveis no Brasil, entre 1991 e 2009. Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde (BRASIL, 2011).

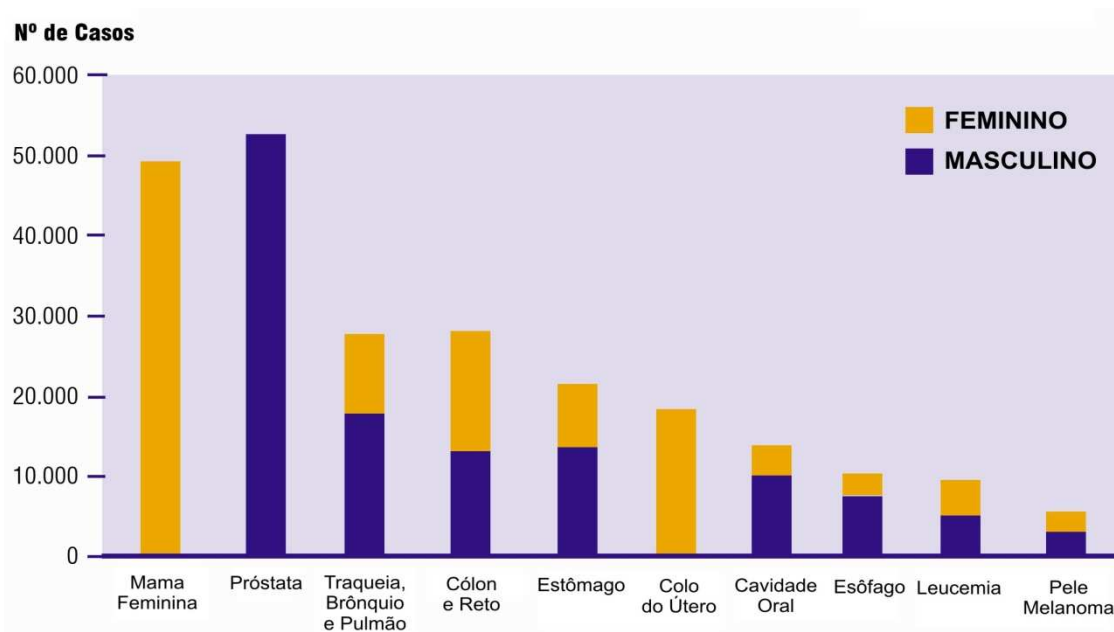


Figura 6 – Tipos de câncer mais incidentes, exceto pele não melanoma, na população brasileira. Fonte: Instituto Nacional de Câncer/Ministério da Saúde (INCA, 2009).

A distribuição dos novos casos de câncer segundo localização primária mostra-se heterogênea entre Estados e capitais do país, o que fica em evidência ao se observar a representação espacial das diferentes taxas brutas de incidência (Fig. 7). As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto que as regiões Norte e Nordeste mostram as menores taxas; a região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário (INCA, 2011).

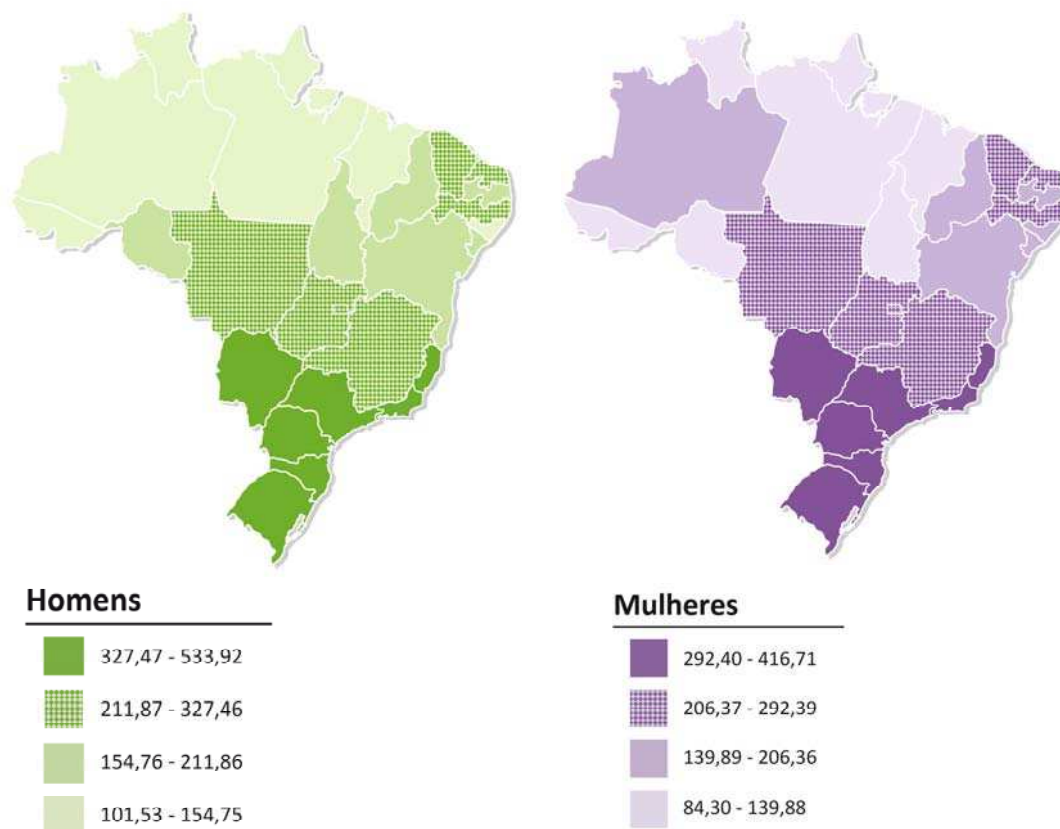


Figura 7 – Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens e 100 mil mulheres, segundo a Unidade da Federação Brasileira (todas as neoplasias malignas, exceto as de pele não melanoma). Fonte: Instituto Nacional de Câncer e Ministério da Saúde (INCA, 2014).

2.4. O carcinoma hepatocelular

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um câncer primário que começa nos hepatócitos e é o tumor sólido mais comum no mundo, representando mais de 90% das neoplasias primárias hepáticas, com mais de 1.000.000 de mortes por ano em todo o mundo e com duração média de vida de 7 a 8 meses após diagnóstico (SUBRAMANIAM et. al., 2013). Tumores malignos do fígado (Tabela 2), primários ou secundários (metastásicos) são, na maioria, assintomáticos, sem alterações das funções hepáticas (AHMED et al, 2006).

Tabela 2 – Classificação dos tumores malignos do fígado; (*) indica a porcentagem de tumores primários, excluindo as metástases (AHMED et al, 2006)

PRIMÁRIO	SECUNDÁRIO (METASTÁSICOS)
<ul style="list-style-type: none"> • TUMORES EPITELIAIS <i>Hepatocelular</i> <ul style="list-style-type: none"> - Hepatoblastoma (7%)* - Carcinoma Hepatocelular (75%)* - Colangiocelular (6%) - Colangiocarcinoma - Cistadenocarcinoma • TUMORES MESENQUIMAIS <i>Tumores de Vasos Sanguíneos</i> <ul style="list-style-type: none"> - Angiosarcoma - Hemangioendotelioma <i>Outros Tumores</i> <ul style="list-style-type: none"> - Sarcoma embrional - Fibrosarcoma • TUMORES DO TECIDO MUSCULAR <ul style="list-style-type: none"> - Leiomiosarcoma - Rbdomiosarcoma • MISTOS <ul style="list-style-type: none"> - Carcinosarcoma - Teratoma - Tumor do Saco Vitelínico - Carcinoide - Carcinoma Escamoso - Linfoma Primário 	<ul style="list-style-type: none"> • TUMORES GASTROINTESTINAIS <ul style="list-style-type: none"> - Colorretal - Pâncreas - Estômago - Esôfago - Carcinoide • TUMORES NÃO GASTROINTESTINAIS <ul style="list-style-type: none"> - Brônquios - Mama - Ovário - Melanoma - Linfoma - Renal

2.4.1. Incidência e fatores de risco do Carcinoma Hepatocelular (CHC)

CHC é o quinto câncer mais comum no mundo e a segunda causa de morte (9,1% do total), ultrapassado apenas pelo câncer de pulmão (19,4%) (IARC, 2013; WHO, 2014). A taxa de incidência é cerca de 10 casos por 100 mil (América do Norte e Europa Ocidental) a 50-150/100 mil (África e Ásia). Nos países em desenvolvimento, os registros de CHC são de 2 a 3 vezes maiores que em países desenvolvidos (EL-SERAG, 2012; FORNER et. al., 2012; IARC, 2013; INCA, 2014; SHLOMAI et. al., 2014).

As estatísticas do CHC elevam-se quando há associação da diabetes tipo II e vírus da hepatite B (KO et. al., 2012), obesidade (EL-SERAG, 2014; FARREL, 2014; PORT et. al., 2014), dieta rica em carnes vermelhas e gorduras (FREEDMAN et. al., 2010; EL-BAHRAWY et. al., 2014) ou laticínios (SALLES et. al., 2014). A infecção crônica pelo vírus da hepatite B e C (BAUMERT et. al., 2014) é o mais importante fator de risco (ALEKSANDROVA et. al., 2014; BRUIX et. al., 2014; HUANG, HOLLINGER, 2014; SHLOMAI et. al., 2014; WHO, 2012) e terapias anti-virais, como a vacinação, resultam em um substancial declínio da doença (SINGH et. al., 2014). Os portadores da hepatite B apresentam de 20 a 100 vezes mais chance de desenvolver CHC, agravado pelos seguintes fatores: duração da infecção, idade, sexo masculino, coinfeção com outros vírus hepatotrópicos (C ou D), alcoolismo, fumo, aflatoxina, inflamação hepática crônica com fibrose, hemocromatose, esteatose e diabetes (ALEKSANDROVA et. al., 2014; SINGH et. al., 2014; TURATI et. al., 2014; VANNI, BUGIANESI, 2014; VANNI et. al., 2014).

Os agentes hepatovirais B e C exibem estreitas ligações com genes reguladores do estresse oxidativo, vias angiogênicas (EL-SERAG, 2012; JAHAN et. al., 2012; SHLOMAI et. al., 2014) e mutações genéticas tumorais supressoras que provocam, particularmente, nos genes p53 e na proteína-quinase retinoblastoma (pRB), exercendo esses efeitos oncogênicos de modo progressivo, desde a lesão hepatocelular direta inicial, passando pela inflamação, mitoses proliferativas e a malignização final (ARZUMANYAN et. al., 2013; SHLOMAI et. al., 2014; SINGH et. al., 2014).

O CHC é um tipo de câncer que apresenta variações geográficas importantes dependentes da exposição ao vírus da hepatite (INCA, 2008; SHLOMAI et. al., 2014). A incidência global de câncer hepático, reportada em 100 mil pessoas, responde por 70-85% dos casos de câncer (Fig. 8). A incidência vem aumentando nos últimos anos em áreas historicamente com baixas taxas, como Oceania, Europa Central e América do Norte, atribuído à elevação das infecções por hepatite C, uso de drogas injetáveis e à obesidade. Por outro lado, taxas do câncer hepático vêm declinando em áreas historicamente de alto risco, como China e Singapura, devido à redução nos casos de hepatite B através de campanhas sanitárias e vacinação (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014; WHO, 2011; SIEGEL et. al., 2012; VANNI, BUGIANESI, 2014).

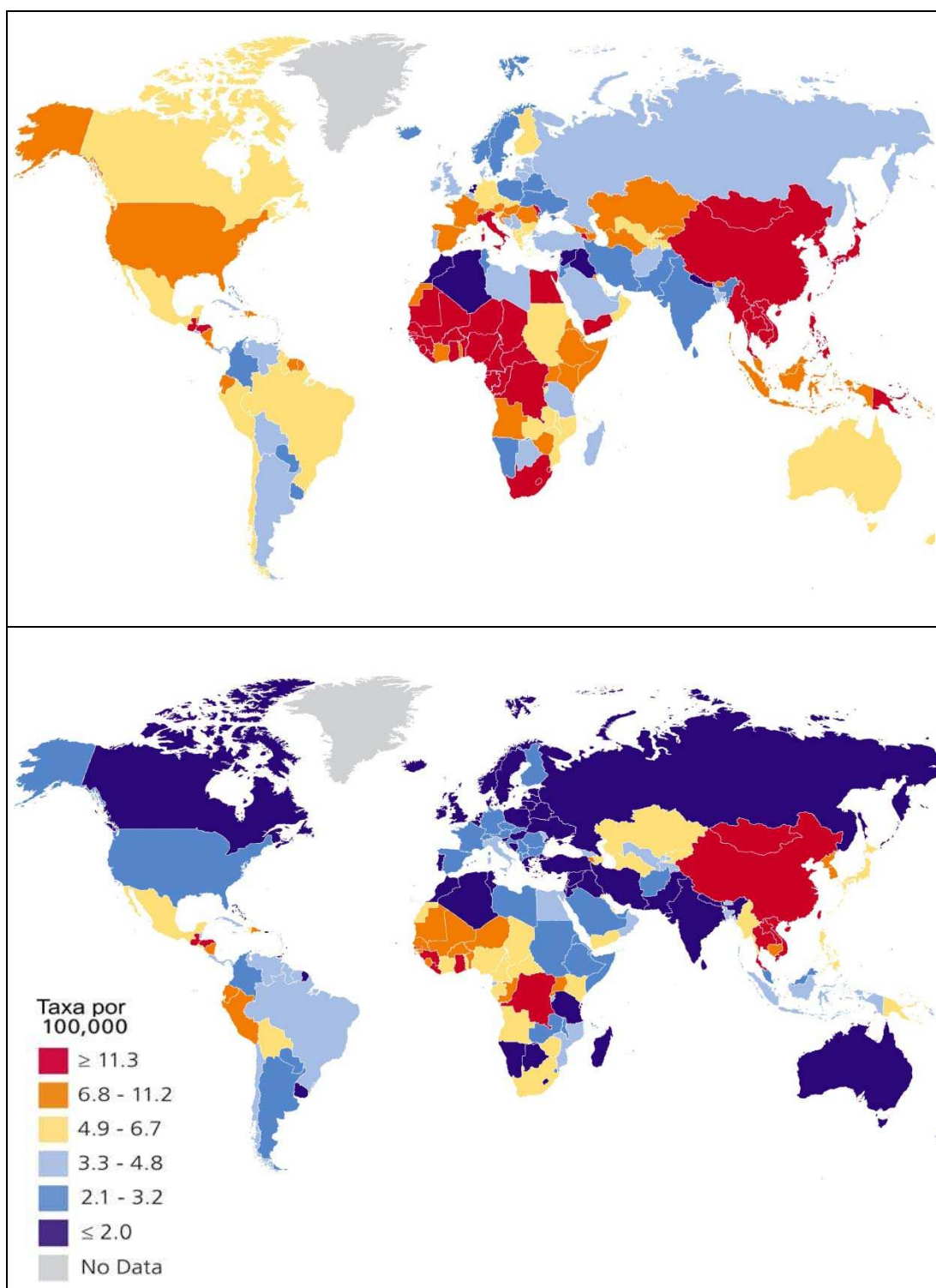


Figura 8 – Variações das taxas de mortalidade do carcinoma hepatocelular em todo o mundo entre homens (gráfico superior) e entre mulheres (inferior), reportadas em 100 mil pessoas (WHO, 2011).

Nas últimas décadas, as taxas de incidência e mortalidade de CHC têm aumentado em ambos os sexos de todos os grupos humanos (Fig. 9), sendo duas vezes maiores em negros e afro-americanos que em brancos, e duas vezes maior em hispânicos que em brancos (NCI, 2013; SIEGEL et. al., 2012; WHO, 2011).

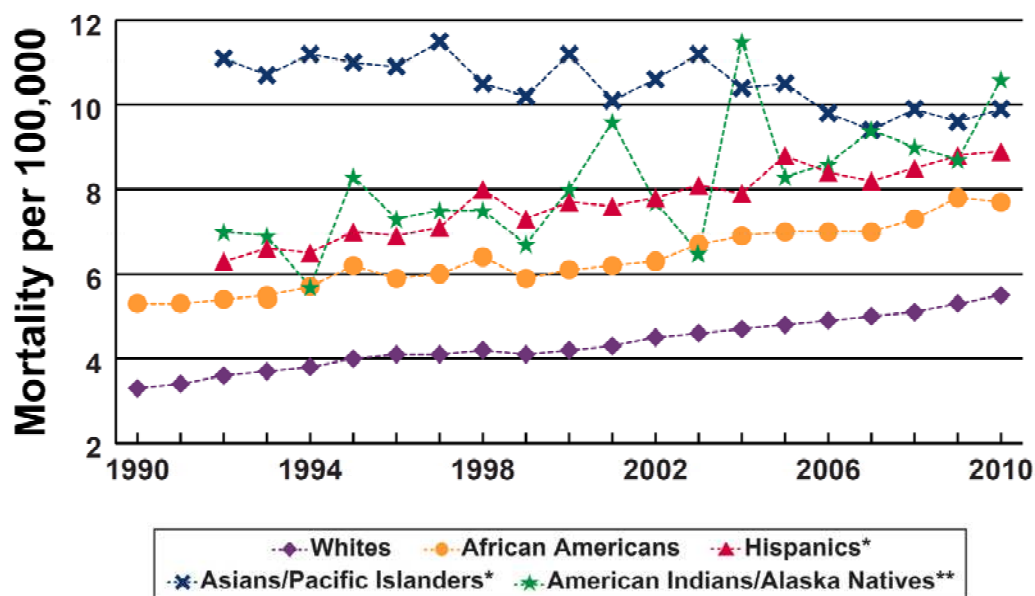


Figura 9 – Mortalidade de câncer hepático em diferentes grupos humanos, entre os anos 1990 e 2010 (NCI, 2013).

O número de casos praticamente dobrou nos últimos 20 anos, provavelmente relacionado ao aumento dos casos de hepatite (73% dos óbitos), obesidade e diabetes (EL-SERAG, 2012; JAHAN et. al., 2012; NCI, 2012; SHLOMAI et. al., 2014; VANNI, BUGIANESI; 2014), principalmente se houver cirrose associada (IELUZZI et. al., 2014). As taxas de incidência têm aumentado especialmente em homens com idade entre 55 e 64 anos (Figura 10) (SIEGEL et. al., 2014; WHO, 2012).

Mais de 80% dos casos de câncer de fígado ocorrem na Ásia e África, associados às infecções pelo vírus da hepatite B e C; em países ocidentais, a cirrose hepática provocada pelo uso abusivo do álcool favorece o câncer hepático. Homens são duas vezes mais afetados que as mulheres, sendo a

segunda causa de mortes por câncer entre homens e a sexta causa de morte entre mulheres em todo o mundo, respondendo por 4% de todas as neoplasias humanas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011; EL-SERAG, 2014; FORNER et. al., 2012; NCI, 2012). Nas últimas duas décadas, o câncer hepático, em ambos os sexos, mostrou elevação nas taxas anuais de incidência (3,6% em homem; 3,0% em mulheres) e mortalidade (2,1% em homens; 1,3% em mulheres) (NCI, 2012; SIEGEL et. al., 2012; WHO, 2011; 2012).

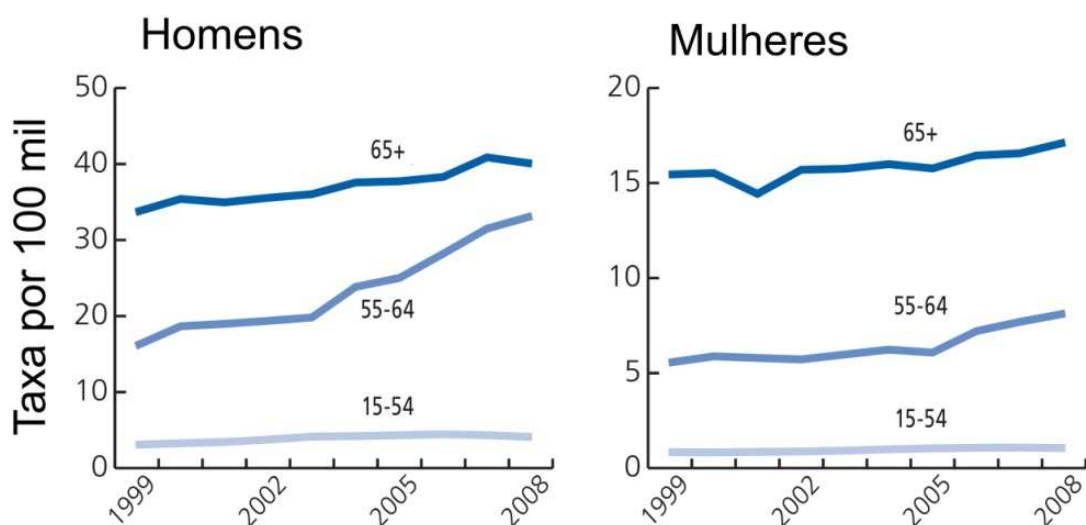


Figura 10 – Taxas de incidência de câncer hepático, por sexo e idade, nas última década (WHO, 2012).

A Fig. 11 apresenta alguns fatores que favorecem o acometimento de CHC e a Tabela 3 mostra as áreas geográficas dominantes em relação ao fator de risco. Em países europeus, há relação entre CHC e ingestão elevada de laticíneos particularmente leite e queijo (SALLES et. al., 2014) e forte associação com cirrose hepática em mais de 80% dos casos de CHC (ALEKSANDROVA et. al., 2014; IELUZZI et. al., 2014; SHLOMAI et. al., 2014).

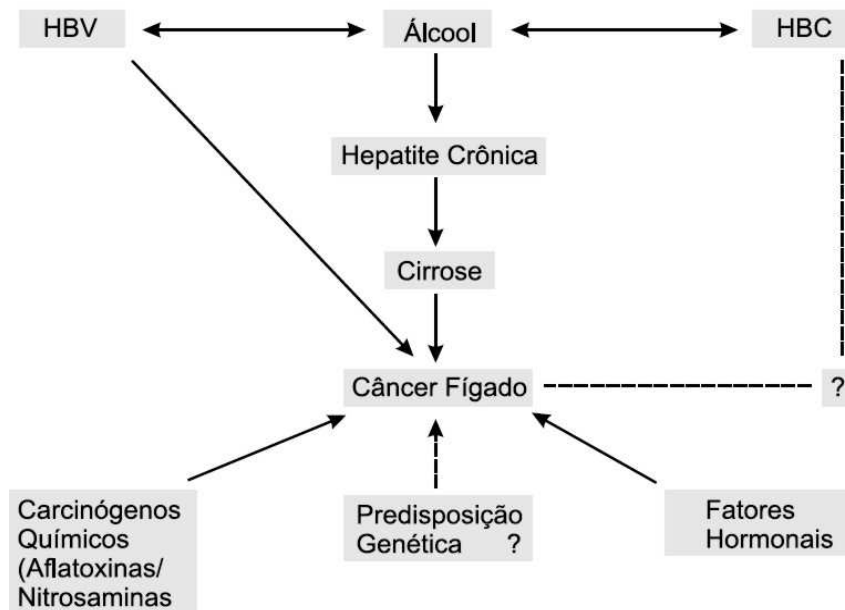


Figura 11 – Fatores etiológicos do carcinoma hepatocelular. Vírus da hepatite B (HBV) e C (HBC) são os fatores mais importantes, agravados pelo alcoolismo (PIMENTA et. al., 2010).

Tabela 3 – Etiologia do carcinoma hepatocelular (NCI, 2012).

PRINCIPAIS AGENTES CAUSADORES	ÁREA GEOGRÁFICA PREDOMINANTE
Vírus da Hepatite B	Ásia e África
Vírus da Hepatite C	Europa, Estados Unidos e Japão
Álcool	Europa e Estados Unidos
Aflatoxina	Oeste da Ásia e África

No Brasil, o CHC não está incluído entre os dez tipos de câncer mais comuns, provavelmente devido às subnotificações, mas é a sétima causa de óbitos, responsável por 4% das mortes por câncer no país, anualmente, e está associado à cirrose hepática avançada em 71,2% dos casos com incidência de 1:100.000 habitantes/ano e estima-se que há cerca de 3.000 diagnósticos da doença por ano (JAGER et. al., 2011; ZHANG et. al., 2012a).

2.4.2. Manifestações clínicas do Carcinoma Hepatocelular

O câncer hepático inicial não manifesta sintomas, embora há alterações em parâmetros fisiológicos como a elevação nos níveis séricos do marcador hepático específico α -feto proteína (JOHNSON et. al., 2014), da molécula de adesão epitelial E-caderina, aumento da atividade das enzimas metabólicas G6PDH (lipogênica) e aldolase (glicolítica) e redução dos níveis de IGF-1 [*insuline-like growth factor*]. IGF-1 promove proliferação celular, migração e malignificação, tornando-se um importante marcador precoce para diagnose do hepatocarcinoma, já que a redução da síntese de IGF-1 pode ser explicada pelas lesões oxidativas de um quadro cirrótico pré-tumoral no parênquima hepático (EL-ASHMAWY et. al., 2014; EL-BAHRAWY et. al., 2014). Parâmetros bioquímicos (colesterol total, albumina, creatinina, ácido úrico, transferrina, ferro, zinco, vitamina B12, dentre outros) também podem contribuir para identificar pacientes com cirrose hepática avançada, com ou sem carcinoma hepatocelular, sendo que o metabolismo do ferro (níveis de ferro e ferritina, hematócrito) e metabolismo lipídico (HDL, triglicerídios) são os que mais podem ser alterados (PORT et. al., 2014). Em estágios mais avançados da tumorigênese, os sinais e sintomas dos pacientes são: inchaço e dor abdominal na região superior direita, anorexia, perda de apetite/peso, náusea, vômito, olhos e pele amarelados, urina escurecida e ascite. Alguns pacientes poderão evoluir para ruptura espontânea do tumor seguida de choque hipovolêmico (INCA, 2009; PIMENTA et. al., 2010; NCI, 2012; WHO, 2012).

2.4.3. Tratamento do Carcinoma Hepatocelular

Os tratamentos para o CHC (Tabela 4) dependem da extensão da doença dentro e fora do fígado, das condições gerais do órgão e o estado de saúde do paciente, e são convencionalmente divididos em curativos, como a ressecção/hepatotectomia, transplante de fígado, radiofrequência e injeções etanólicas, ou paliativos, como a quimio/radioembolização (BRITTEN et. al., 2012; BRUIX et. al., 2014; FORNER et. al., 2012). Drogas quimioterápicas incluem moléculas citotóxicas não seletivas com fortes efeitos colaterais: sorafenib

(CAMMÀ et. al., 2013), 5-fluoruracil (SHAABAN et. al, 2014; TAN et. al, 2014), cisplastina, doxorubicina, paclitaxel e mitomicina (SHAABAN et. al, 2014; SUBRAMANIAM et. al., 2013),.

A taxa de sobrevivência é de apenas 14% após cinco anos do diagnóstico; 39% dos pacientes são diagnosticados nos estágios iniciais da doença, para os quais a taxa de sobrevivência chega a 27%, mas cai para 4% para aqueles diagnosticados tardiamente (WHO, 2012). Infelizmente, a recorrência de tumores pós-operatórios é comum, com taxa de sobrevida de 30 a 50% após cinco anos (SONG et. al., 2004) ou até mesmo de 14% (WHO, 2011). Cerca de 20-30% dos pacientes podem ser tratados com cirurgia e a maioria dos pacientes apresenta tumores não ressectáveis, com média de sobrevivência alcançando somente cinco a oito meses (INCA, 2009; LAINO, 2008).

Tabela 4 – Intervenções terapêuticas para o tratamento de tumores malignos do fígado (FORNER et. al., 2012; RAOUL, 2008)

INTERVENÇÃO CIRÚRGICA	DROGAS
- Ressecção do Fígado	- Geneterapia
- Transplante de Fígado	- Imunoterapia
INTERVENÇÃO PERCUTÂNEA OU MINIMAMENTE INVASIVA	INTERVENÇÕES TRANSARTERIAIS
- Injeções Etanólicas	- Embolização
- Termo-ablação por Radiofrequência	- Quimioperfusão
- Termo-ablação por Frio - Crioablação	- Quimioembolização
- Termo-ablação por Calor: Micro-ondas ou Laser	

Carcinoma hepatocelular é uma malignidade altamente vascular, associada a inúmeros fatores angiogênicos como Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), receptores VEGF e β -Receptor de Fatores de Crescimento Derivados de Plaquetas (PDGF). Drogas quimioterápicas como sorafeniba (*Nexavar*) e sunitiniba (*Sutent*) (CAMMÀ et. al., 2013; NCI, 2012; WHO, 2012) ou anticorpos monoclonais (*Bevacizumab*) têm claros efeitos

antiangiogênicos (BRITTEN et. al., 2012). Aprovados há dois anos pela FDA, imatiniba (*Gleeve*) e cabozantiniba (*Exelixis*) são anti-angiogênicos inibidores de enzimas tirosina-quinases, indicados a pacientes com tumores gastrointestinais, incluindo cânceres hepáticos, com forte redução de recorrência tumoral (VOGELZANG et. al., 2012).

Estágios iniciais do hepatocarcinoma geralmente podem ser tratados com sucesso em pacientes com tecidos hepáticos saudáveis (Fig. 12); a ressecção do carcinoma é uma primeira linha de tratamento e o transplante em caso de recorrência é uma opção promissora (FUKS et. al., 2012; PIMENTA et. al., 2010).

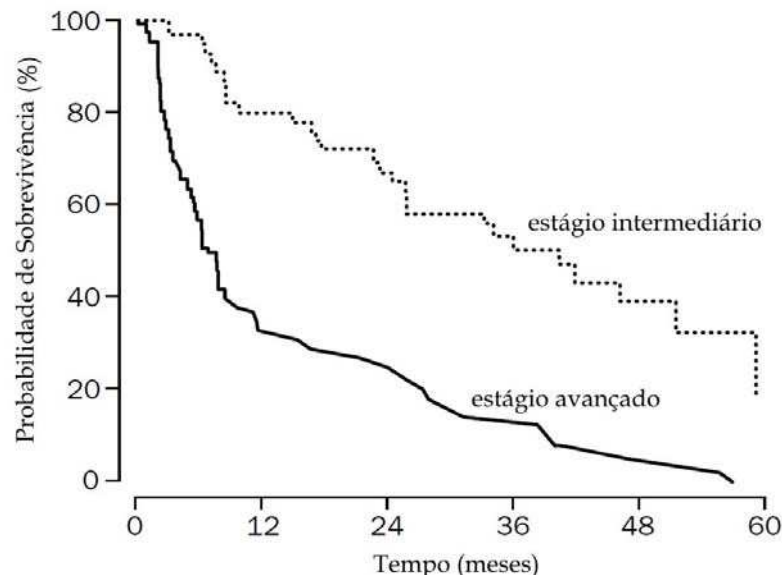


Figura 12 – Probabilidade de sobrevivência de pacientes não tratados acometidos com CHC de acordo com o estágio do tumor. Estágio intermediário: tumores multinodulares assintomáticos, com média de sobrevivência de 40 meses. Estágio avançado: estágio sintomático, invasão vascular e expansão extra-hepática; média de sobrevivência de 4-5 meses (LLOVET et. al., 2003).

De acordo com os registros de transplantes no Brasil (ABTO, 2014), o fígado ocupa a segunda posição nos procedimentos realizados (Fig. 13), e a terceira posição no sistema de Lista Única de espera de órgãos para transplantes sendo que, pela primeira vez, houve redução (5,7%) no número de transplantes em 2014. O carcinoma hepatocelular ocupa a segunda

causa (8%) em indicação dos transplantes de fígado no Brasil, depois da insuficiência hepática cirrótica causada por infecção com o vírus da hepatite C (69%), como pode ser observado na Fig. 14 (ABTO, 2007).

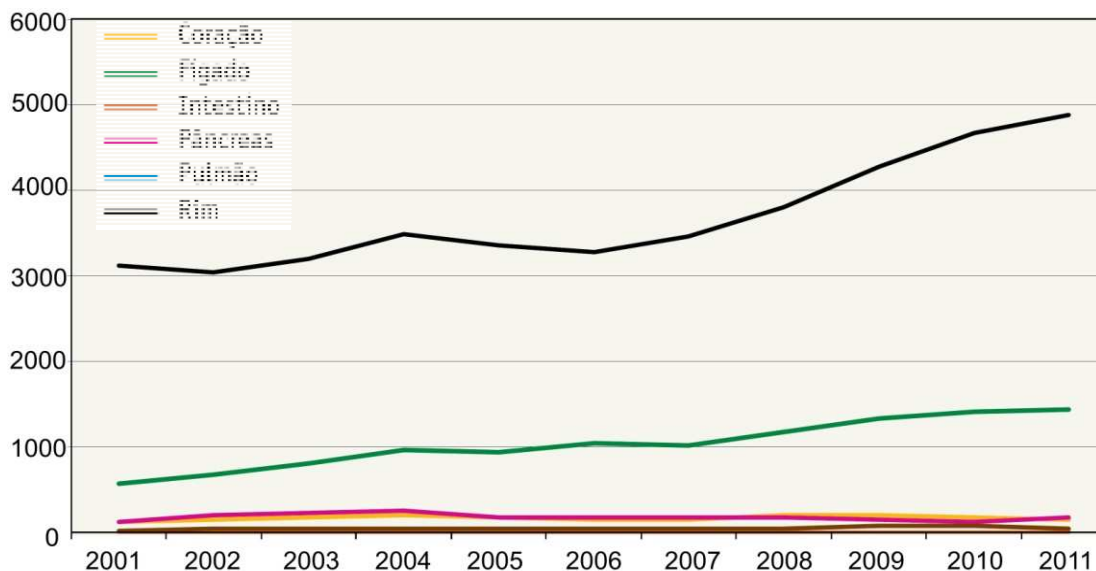


Figura 13 – Evolução anual dos transplantes de órgãos no Brasil, em número absoluto, de acordo com o Registro Brasileiro de Transplante (ABTO, 2011).

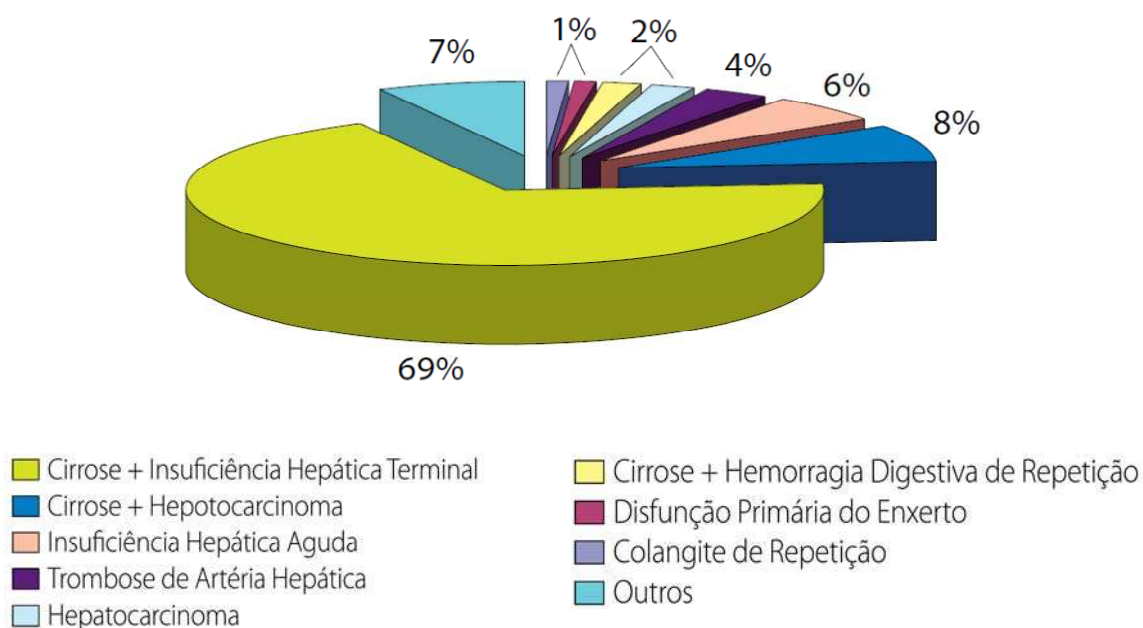


Figura 14 – Causas mais comuns das indicações de transplantes de fígado no Brasil, de acordo com a Associação Brasileira de Transplante de Órgão (ABTO, 2007).

2.4.4. Vias oncogênicas da hepatocarcinogênese

A hepatocarcinogênese envolve múltiplos oncogenes, fatores de crescimento e supressores tumorais. As vias oncogênicas comumente alteradas por mutações somáticas ou deleções homozigóticas são: via Wnt/ β -catenina, p53, via de sinalização fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K/Ras), remodelação da cromatina (BRUIX et. al., 2014; MA et. al., 2014; WANDS, KIM, 2014). Aneuploidias são eventos frequentes em hepatocarcinomas para *loci* cromossômicos 1p, 4q, 6q, 7p, 8p-q, 9p, 10q, 13q, 16p-q e 17p, ou deleções de p73, p53, Rb, APC, DLC-1; p16, GSTP1, PTEN, IGF-2, BRCA2, SOCS-1, Smad2-4, β -catenina, c-myc, gankirina e ciclina D1 e ampliações cromossômicas em 1q, 8q, 6p e 17q, superexpressão de ciclina D1 em 11q13 e do oncogene c-myc em 1q, 6p e 17q (JAGER et. al., 2011; FORNER et. al., 2012).

As vias de ativação oncogênica ocorrem geralmente em estágios tardios da hepatocarcinogênese como uma consequência da instabilidade cromossômica induzida pela redução dos telômeros e disfunção dos pontos de restrição das vias Rb e p53. As Figuras 15 e 16 apresentam as vias mais comuns ativadas durante o desenvolvimento do CHC, e os principais pontos, incluindo p53, Rb, p27 e fator de crescimento IGF-2R afetados em carcinomas hepatocelulares, e vias embrionárias de desenvolvimento, incluindo Akt, myc, β -catenina *hedgehog* e met (EL-SERAG e RUDOLPH, 2007).

O gene p53, provavelmente o alvo molecular mais comum envolvido em vários cânceres, é ativado em resposta a um dano no DNA, interrompendo o ciclo ou induzindo à apoptose. Alterações em p53 ocorrem em até 60% dos tumores de CHC e ocorre principalmente por mutações ou deleções alélicas no cromossomo 17p13, onde está localizado, podendo ser causadas pelo vírus da hepatite B (JAGER et. al., 2011; VINCENT et. al., 2011) ou em mais de 50% dos casos de hepatocarcinomas induzidos pela aflatoxina (JAGER et. al., 2011).

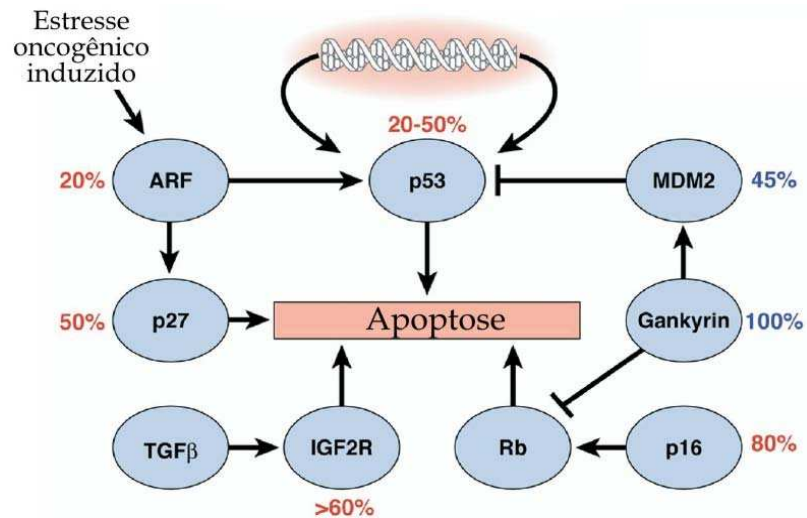


Figura 15 – Alterações mais frequentes nos pontos de restrição do ciclo celular e apoptose associados ao carcinoma hepatocelular. As vias mais comuns são afetadas em 60-100% dos casos incluindo as vias p53, Rb, p27 e transformação do fator de crescimento β IGF2R. Os números em vermelho indicam inativação e em azul, ativação (EL-SERAG e RUDOLPH, 2007).

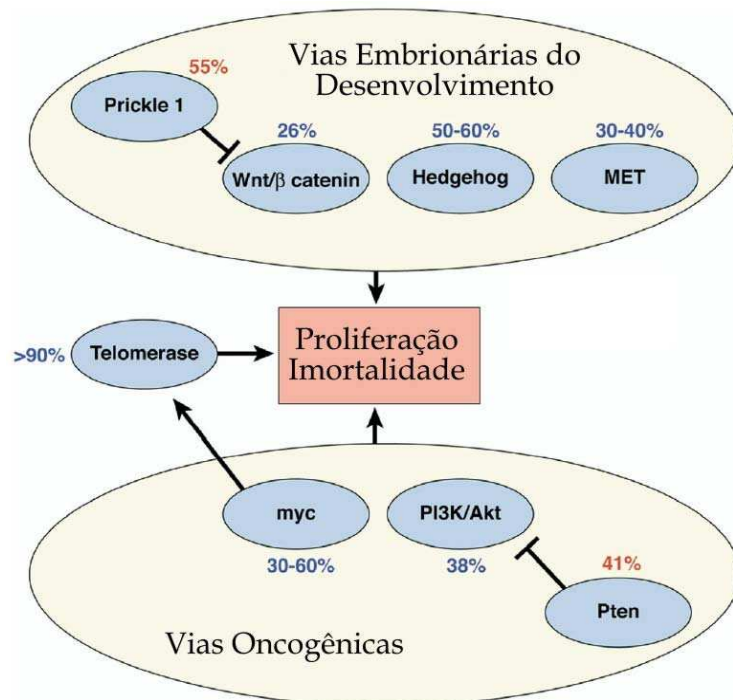


Figura 16 – Alterações nas vias de desenvolvimento embrionário associadas à hepatocarcinogênese. As vias mais comuns são ativadas em 20-60% do CHC incluindo Akt, myc, β -catenina, *hedgehog* e *met*. Mesmo não sendo um oncogene, a ativação da telomerase é muito comum e um passo essencial para a imortalização das células tumorais. Os números em vermelho indicam inativação e em azul, ativação (EL-SERAG e RUDOLPH, 2007).

A Figura 17 e a Tabela 5 apresentam as mudanças moleculares mais comuns envolvendo reguladores do ciclo celular e de vias bioquímicas durante a hepatocarcinogênese.

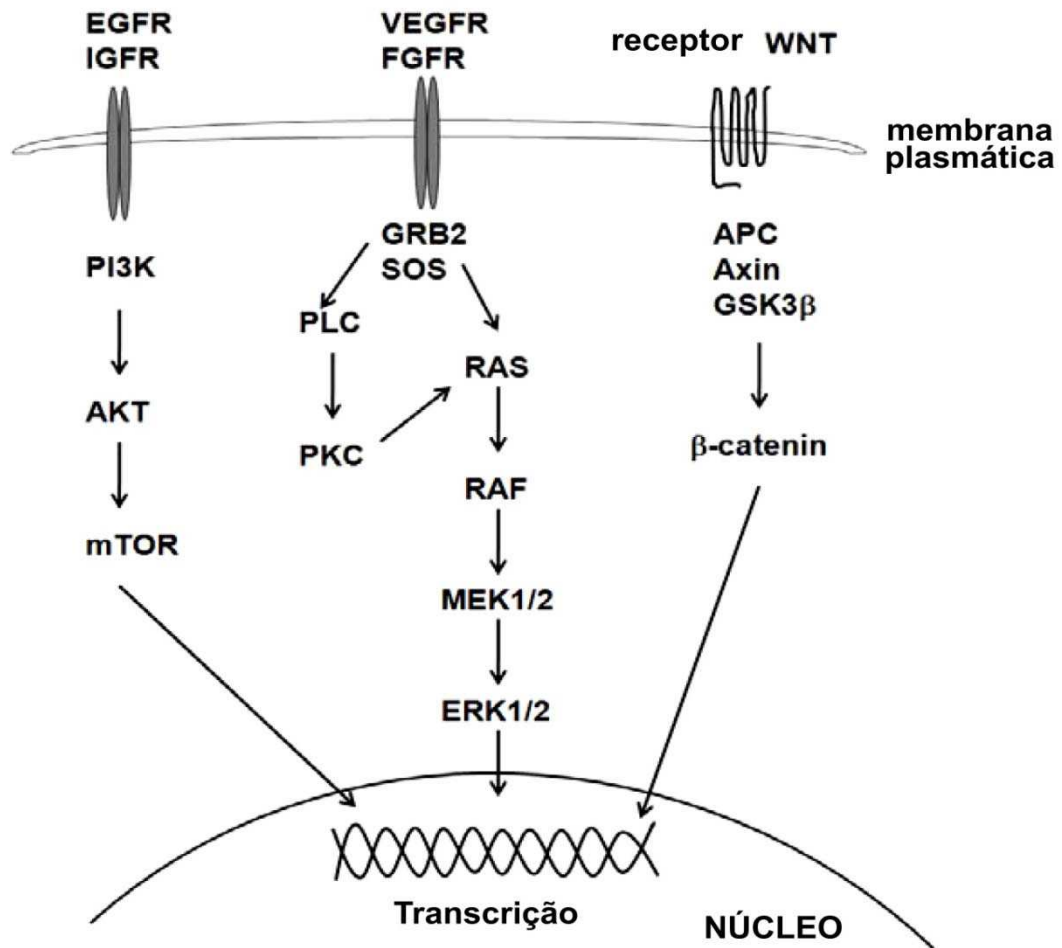


Figura 17 – Vias de sinalização celular mais comuns envolvidas no hepatocarcinoma celular. Abreviações: EGFR: epidermal growth factor receptor; IGFR: insulin-like growth factor receptor; PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase; AKT(PKB): serine-threonin kinase protein B; mTOR: mammalian target of rapamycin; VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor; FGFR: fibroblast growth factor receptor; GRB2/SOS: growth factor receptor-bound protein 2 / son of sevenless; PLC: Pleural lavage cytology; PKC: protein kinase C; RAF-MEK-ERK: extracellular signal-regulated kinases; WNT: wingles-type; APC-Axin: adenomatous polyposis coli; GSK3β/β-catenin: glycogen synthase kinase (WU, LI, 2012).

Tabela 5 – Expressão de genes regulatórios e vias bioquímicas em Carcinoma Hepatocelular.

GENES/VIAS	REGULAÇÃO DURANTE A HEPATOCARCINOGENESE	REFERÊNCIA
p53	Expressão aumentada, principalmente em hepatocarcinomas associados a processos cirróticos, e especialmente em estágios tardios da doença.	Bruix et. al., 2014. Tretiakova et. al., 2010. Jager et. al., 2011.
Wnt/ β-catenina	Expressão aumentada, principalmente em hepatocarcinomas associados a processos cirróticos.	Ma et. al., 2014. Shlomei et. al., 2014. Wands, Kim, 2014.
STAT3	Superexpressão em mais de 50% dos casos de CHC, envolvida com crescimento e proliferação celular, metástase, angiogênese e imunossupressão.	Subramaniam et. al., 2010.
Rb	Expressão aumentada, principalmente em hepatocarcinomas associados a processos cirróticos.	Tretiakova et. al., 2010.
Ciclina D1	Expressão aumentada de Ciclina D1, principalmente em hepatocarcinomas com maior grau de diferenciação, associados a processos cirróticos ou ao vírus da hepatite B e C.	Tretiakova et. al., 2010. Jager et. al., 2011.
p21^{Waf1/cip1}	Expressão aumentada, principalmente em hepatocarcinomas associados a processos não cirróticos; expressão intensificada principalmente em nódulos tumorais aumentados (> 50 mm).	Tretiakova et. al., 2010. Jager et. al., 2011.
p27^{Kip1}	Expressão aumentada, principalmente em hepatocarcinomas associados a processos cirróticos.	Tretiakova et. al., 2010.
p16^{Ink4}	Expressão intensificada principalmente em nódulos tumorais aumentados (> 50 mm).	Tretiakova et. al., 2010.
IGF-1R, 2R	Expressão intensificada inibindo apoptose celular tumoral; promoção de metástase hepática e angiogênese.	Zhang et. al., 2012. King et. al., 2012.
PKC/ Integrina	Ativação de proteínas Quinase-C (PKC) pela via integrina, modulada pelos níveis de espécies reativas de oxigênio, interferindo na fosforilação de enzimas da via ERK e migração metastásica de células hepatocarcinogênicas HepG2; ↓β-integrina.	Hu et. al., 2011. Zhang et. al., 2012a.
WT1	Intensificação da via WT1 favorece apoptose (↓Bcl-2; ↓caspase-3; ↑Bak) com efeitos antihepatocarcinogênicas em células HepG2.	Qin et. al., 2012.
LAPTMB	Superexpressão do gene <i>Lysosomal Associated Protein Transmembrane beta</i> desencadeia ↑ciclina D1, ↑ciclina E, ↑p-Rb, ↑c-Myc, ↓p-16, ↓p21, ↓p27, provocando desregulação proliferativa e metástase.	Zhou, 2012.
Ciclina G1 / P13-k/Akt	Super-regulação na expressão da ciclina G1, ↑Δp85 e ↓E-caderina, relacionando-se ao tamanho do tumor, a processos metastásicos e invasividade do hepatocarcinoma, recorrência e menor expectativa de vida.	Wen et. al., 2012. Shlomei et. al., 2014.

Os efeitos patológicos do alcoolismo, dos vírus da hepatite B e C sobre o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular provocam alterações nos genes envolvidos na via Rb (p16^{ink4a}, p15^{ink4b}, Rb1, CDK4 e ciclina D1), via p53 (p53, p^{14ARF} e MDM2) e via Wnt/ β -catenina. Em 100% dos casos houve perda na expressão Rb (metilação no promotor p16^{ink4a}) e superexpressão de ciclina D1; 48% dos pacientes exibiram mutações em p53 (ou metilação no promotor p^{14ARF}) e em 95% dos casos foram encontradas mutações de β -catenina (ARZUMANYAN et. al., 2013; WANDS, KIM, 2014).

2.5. A Química do Câncer

Metalômica é uma área científica integrante da proteômica funcional, da genômica estrutural e da metabolômica, com foco nos mecanismos moleculares dependentes de biometais.

Diferentes íons exercem papel crucial na carcinogênese, apoptose, metástase e angiogênese (AHIDOUCH, AHIDOUCH, 2013; ARIGONY et. al., 2013; BORTNER, CIDLOWSKI, 2014; LANG, STOURNARAS, 2014; PARDO, STUHMER, 2014; PREVARSKAYA et. al., 2010; YANG, BRACKENBURY, 2013) envolvendo modulação de canais iônicos anti- e pró-apoptóticos (Fig. 18) (HOFFMAN, LAMBERT, 2014) e organelas-chave como mitocôndrias, retículo endoplasmático, endossomos, núcleo, lisossomos (LEANZA et. al., 2013; PREVARSKAYA et. al., 2014). O fluxo de íons define o potencial das membranas celulares e organelas envolvidas em diversas vias bioquímicas de sinalização intra e intercelular ativando respostas metabólicas específicas ou eventos celulares básicos, como manutenção da homeostase, ciclo celular, estabilidade genômica, diferenciação e apoptose. Perda das condições homeostáticas pode provocar reações deletérias, como superprodução de espécies reativas de oxigênio, disfunções das organelas e danos a biomoléculas essenciais, como o DNA (MARTINEZ et. al., 2014; PEDERSEN, STOCK, 2013).

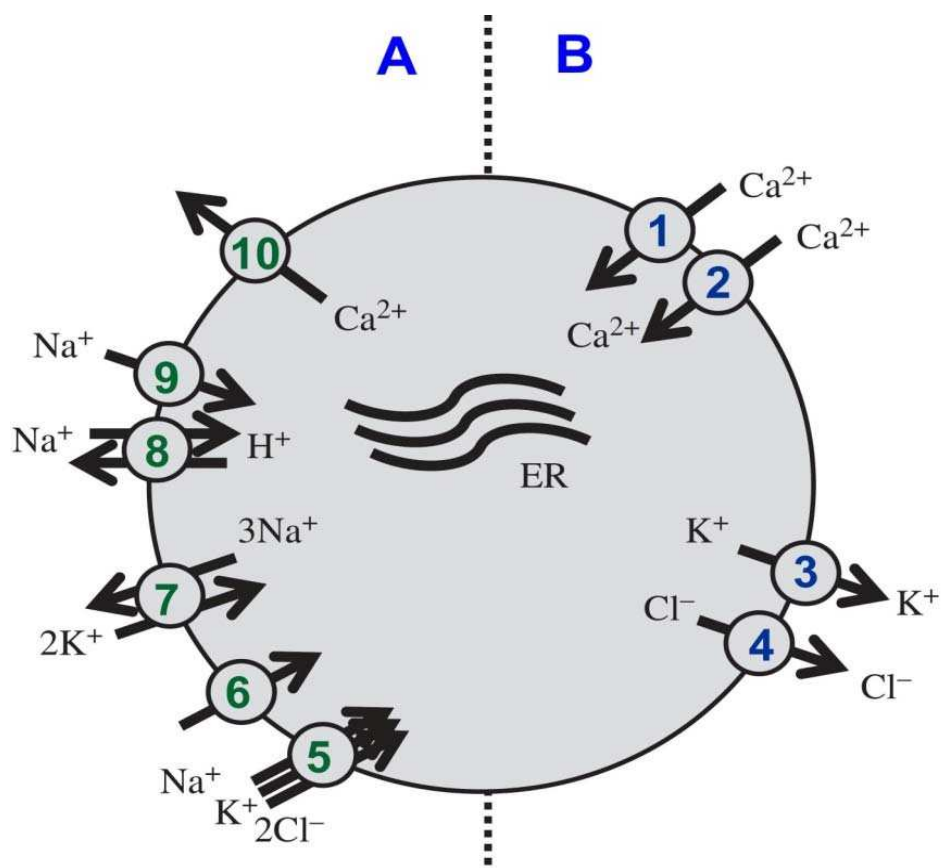


Figura 18. Transportadores de íons anti- (A) e pro-apoptóticos (B) ligados à membrana celular. **1,2.** Canais de Ca^{2+} ; **3.** Canais de K^+ ; **4.** Canais Cl^- ; **5.** Cotransportador $1\text{Na}^+/2\text{Cl}^-/1\text{K}^+$; **6.** Transportador de Na^+ dependente de Taurina; **7.** Na^+/K^+ - ATPase; **8.** Trocadores Na^+/H^+ ; **9.** Canais de cátions induzidos por hipertonicidade; **10.** Ca^{2+} - ATPase (HOFFMAN, LAMBERT, 2014).

Intensificam-se os estudos com metais compondo nanopartículas experimentais antitumorais (AHMED et. al., 2013; ALI et. al., 2014; ANITHA et. al., 2014; HUANG et. al., 2014a; PATRA et. al., 2014; TAN et. al., 2014; WAHAB et. al., 2014; ZENG et. al., 2014), mas pouco se sabe sobre os danos celulares genotóxicos e apoptóticos que podem desencadear. A toxicidade, neste caso, está ligada à dissolução do metal presente na estrutura das nanopartículas ou são resultado da ação das nanoesferas *per se*?

Zinco é um elemento traço essencial na modulação de sinais iônicos em organelas a nível intra e intercelular na regulação dos mecanismos de reparo do DNA, proliferação celular e apoptose; é considerado um potente

antioxidante atuando na expressão de genes envolvidos no processo, além de ser cofator de mais de 1000 proteínas, dentre estas, mais de 100 enzimas, muitas envolvidas na síntese proteica, o supressor tumoral p53 e **Cu/Zn**-superóxido desmutase (mais de 10% do proteoma contém **Zn**). Níveis intracelulares de **Zn** estão associados à estabilidade do DNA (cofator de enzima de reparo DNA glicosilases) e integridade de membranas em células hepáticas HepG2 quando expostas a agentes oxidantes (SHARIF et. al., 2012; ZHENG et. al., 2013). Células HepG2 expostas nanoexperimentalmente a **Zn** (> 20 µg/mL) exibiram toxicidade dose-tempo dependente, com redução significativa da atividade mitocondrial e viabilidade celular, pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e dano oxidativo, com elevação na expressão de genes apoptóticos (bax, p53, caspase-3) e supressão de genes anti-apoptóticos (bcl-2), vias intrínsecas mitocondriais (AHMED et. al., 2013; WAHAB et. al., 2014), Mapk-Jnk/p38 independente (SHARMA et. al., 2012).

Níquel é um dos mais potentes geradores de ERO (MARTINEZ et. al., 2014). Células HepG2 exibem, para o **Ni**, uma concentração efetiva EC50 = 304 µM (RUDZOK et. al., 2009).

Magnésio é o segundo cátion mais abundante em células de mamíferos, após o potássio. É essencial na replicação do DNA (cofator da DNA polimerase e ligases) e síntese de proteínas, muitas envolvidas no reparo do DNA e migração cromossômica no ciclo celular (ARIGONY, 2013). É um regulador chave na utilização intracelular de glicose pelos hepatócitos modulando o transporte de glicose-6-P através do retículo endoplasmático, sua hidrólise e oxidação via glicose-6-fosfatase e hexose-6-fosfato desidrogenase em células HepG2, como via alternativa à glicólise e síntese de glicogênio; regula, ainda, a concentração intrarreticular de NADPH favorecendo reações metabólicas como síntese de ácidos graxos e colesterol (VOMA et. al., 2014). **Mg²⁺**-ADP/ATP modulam a atividade de canais de **Cl⁻** na membrana de mitocôndrias e do retículo endoplasmático de hepatócitos em condições de estresse metabólico (ASHRAFPOUR et. al., 2012), sendo que íons **Cl⁻** são requeridos estequiometricamente para transporte de **Na⁺/Mg²⁺** através da membrana plasmática de hepatócitos mantendo o equilíbrio eletroquímico destes íons no citoplasma, núcleo e mitocôndrias (CEFARATTI, ROMANI, 2011).

Cálcio é um íon de sinalização celular universal, modula diversas vias bioquímicas intra e intercelular, ativando diferentes enzimas como quinases e fosfatases (Fig. 19). Muitas funções celulares hepáticas são reguladas pelo **Ca²⁺** citossólico, incluindo mobilização da glicose, secreção biliar, fisiologia oxidativa mitocondrial, regeneração celular e expressão genética (BARTLETT et. al., 2014), além de ser essencial na proliferação celular (fase G1), interferindo na desintegração nuclear, replicação do DNA (fase S) e condensação da cromatina durante o ciclo celular (CAPIOD, 2013; MACHACA, 2011; PREVARSKAYA et. al., 2010). A sinalização mediada por **Ca²⁺** é significativamente remodelada durante o câncer e é uma das maiores vias responsáveis pela carcinogenicidade e vantagem adaptativa das células malignas às condições microambientais do câncer (PREVARSKAYA et. al., 2014).

Íons **Ca²⁺** regulam a atividade de enzimas desidrogenases no ciclo de Krebs (VORONINA et. al., 2014) e também atuam no estresse oxidativo celular ao ativarem a síntese de substratos redutores (NADH) em hepatócitos, acelerando o transporte mitocondrial de elétrons (e produção de ATP citosólico e mitocondrial) e, conseqüentemente, elevando a produção de ERO, uma vantagem metabólica tumoral em relação às células normais (COSTA et. al., 2014). Assim, o controle no fluxo de **Ca²⁺** em células HepG2 atenua o efeito *feedback* positivo amplificante de ERO/**Ca²⁺**, vantajoso para a proliferação celular tumoral (BARTLETT et. al., 2014; BINGHAM et. al., 2014; QIN et. al., 2011). Efluxo de **Ca²⁺** mitocondrial ocorre via troca **Na⁺/Ca²⁺** e **H⁺/Ca²⁺** ou por canais uniportes mitocondriais (MCU) e seu acúmulo na matriz induz a abertura prolongada de poros de transição interferindo no potencial da membrana mitocondrial, provocando disfunções celulares irreversíveis, liberação de citocromo c (via poros de transição), ativação de caspases, apoptose e necrose (AKL et. al., 2014; BARTLETT et. al., 2014; VORONINA et. al., 2014). O bloqueio do influxo de **Ca²⁺** (por alteração nos níveis de expressão genética dos canais de **Ca²⁺**, por exemplo) favorece mecanismos anti-apoptóticos em células tumorais (CAPIOD, 2013; LANG, STOURNARAS, 2014; PREVARSKAYA et. al., 2010; 2014).

Sinalização intracelular por **Ca²⁺** originada do retículo endoplasmático envolve Bcl-2 (família de proteínas que regulam proliferação e morte celular) e receptores inositol trifosfato (IP3), um dos principais canais de liberação de

Ca^{2+} , modulando a sinalização, a proliferação celular e promovendo a resistência à apoptose (AKL et. al., 2014; PREVARSKAYA et. al., 2014).

Fosforilação da proteína retinoblastoma (por ciclina D/cdk4 e ciclina E/cdk2) é dependente de Ca^{2+} extracelular e calmodulina, interferindo na expressão de genes requeridos para progressão do ciclo celular (fase S) (MACHACA, 2011).

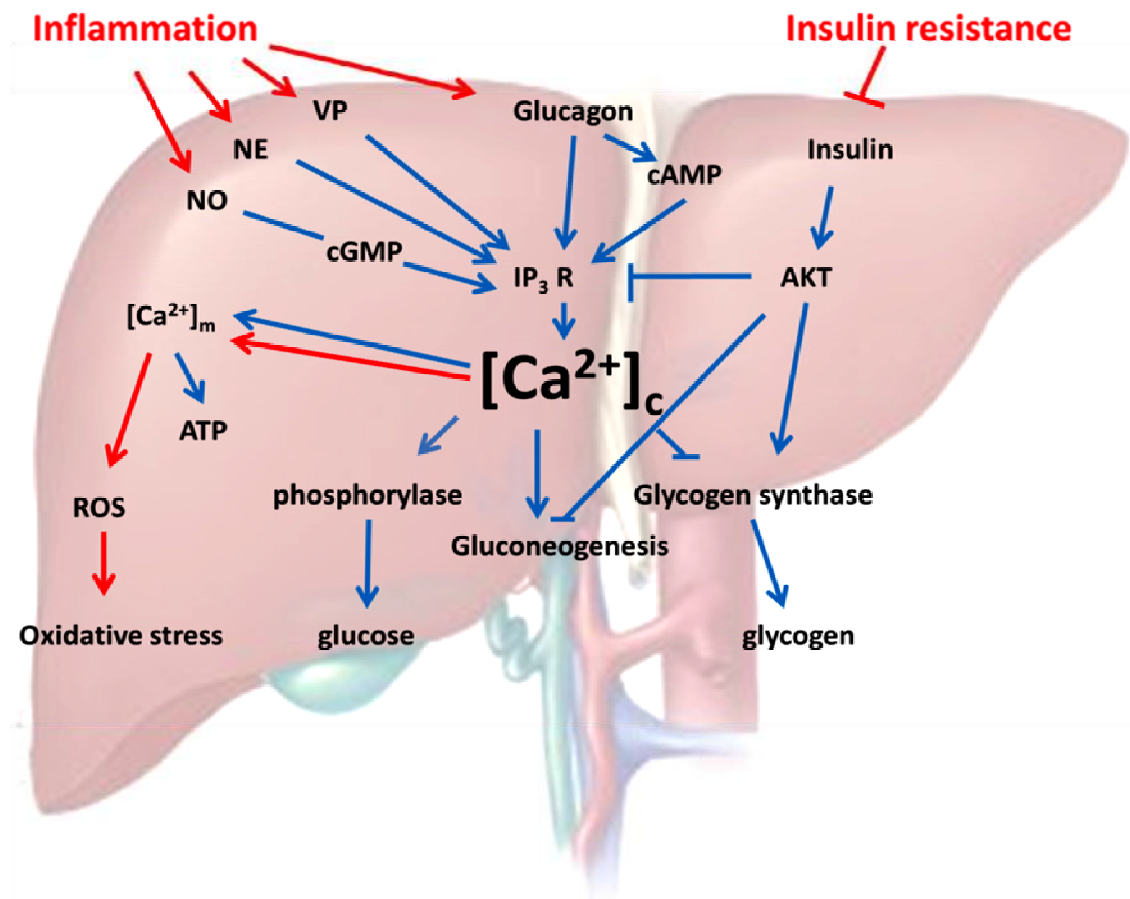


Figura 19 – Papel do cálcio no metabolismo hepático da glicose em condições fisiológicas (setas azuis) e patofisiológicas (setas vermelhas). VP: vasopressina; NE: noradrenalina; NO: óxido nítrico; $[\text{Ca}^{2+}]_c$: cálcio citosólico; $[\text{Ca}^{2+}]_m$: cálcio mitocondrial; ROS: espécies reativas de oxigênio (VORONINA et. al., 2014).

Cádmio pode, em função de sua concentração intracelular, interferir na fosforilação oxidativa mitocondrial, induzir estresse e dano oxidativo, desregulação de sinalização intracelular por **Ca**, danos ao DNA, disfunções

mitocondriais e apoptose. Células hepáticas expostas à doses elevadas de **Cd** exibem apoptose independente da ativação de caspases (NAIR et. al., 2013) por induzirem hipermetilação do DNA no promotor do gene caspase-8 (evento característico em carcinoma hepático), com perda na regulação da via apoptótica, favorecendo a proliferação tumoral (WANG et. al., 2012). O sistema NADPH-oxidase é a principal fonte de ERO em hepatócitos HepG2 expostos à Cd e MAPK/STAT3 exibem efeito citoprotetor via Hsp70 ao estresse oxidativo (SOUZA et. al., 2009). **Cd** exibe toxicidade em cultivos de células HepG2 (RUDZOK et. al., 2009), podendo afetar a regulação na expressão de diferentes famílias de genes, resultando em 536 genes de vias tumorais superregulados (de vias anti-estresse oxidativo) e 424 genes das funções hepáticas alterados (FABBRI et. al., 2012). Nanoexperimentalmente, células HepG2 expostas a **Cd** apresentaram estresse oxidativo e ativação da via apoptótica mitocondrial apenas em concentrações maiores que 8,9 μM , o que não foi observado para **selênio**, elemento essencial citotóxico apenas em concentrações intracelulares extremas (PENG et. al., 2013).

Potássio é essencial para o equilíbrio osmótico celular; o fluxo de K^+ , muitas vezes associado à $\text{Na}^{2+}/\text{H}^+$, Ca^{2+} Cl^- , contribui para regulação do pH intracelular, interfere no potencial de membrana plasmática durante o ciclo celular e a progressão tumoral (AHIDOUCHE, AHIDOUCHE, 2013; YANG, BRACKENBURY, 2013). Superexpressão de genes de canais de K^+ , elevando a força motriz do influxo de Ca^{2+} , é necessário para hiperpolarização intracelular durante a progressão do ciclo celular (Fig. 20) (AHIDOUCHE, AHIDOUCHE, 2013; PARDO, STUHMER, 2014). A resistência à apoptose apresentada por células tumorais pode ocorrer pela supressão no efluxo de K^+ (AMICO et. al., 2013; BORTNER, CIDLOWSKI, 2014; PEDERSEN, STOCK, 2013; PREVARSKAYA et. al., 2010). A inibição de canais de potássio cálcio-dependentes pode reduzir a proliferação de células HepG2 (FREISE et. al., 2013). Durante o ciclo celular, o bloqueio de canais de sódio K^+ durante a fase G1 está associado com a redução na expressão de ciclinas (D, E), CDKs (4, 2), superexpressão de CDKi ($p^{21\text{waf1/cip1}}$; $p^{27\text{kip1}}$) ativação pRb, e na fase G2/M exibe redução na expressão de ciclina B1 e alteração na fosforilação de CDK1 (AHIDOUCHE, AHIDOUCHE, 2013).

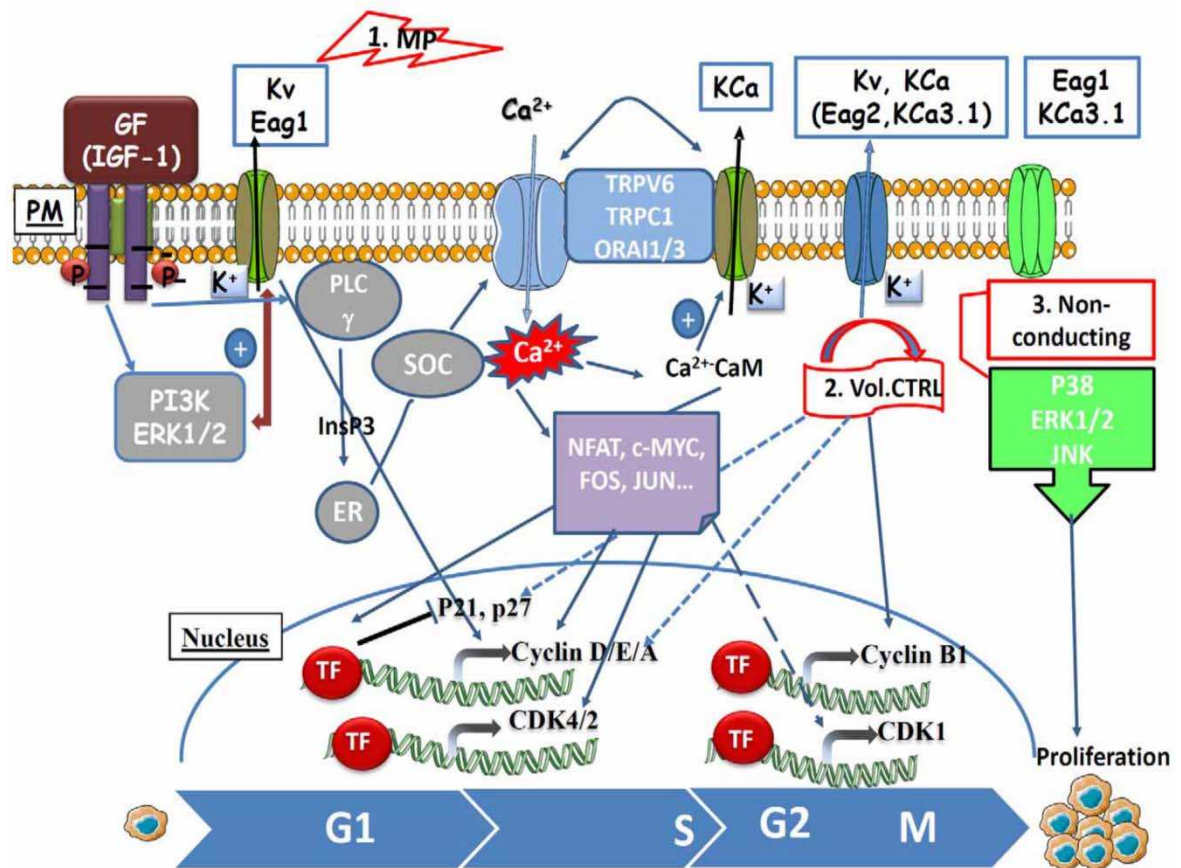


Figura 20 – Papel do potássio na progressão e proliferação durante o ciclo celular. Durante a progressão do ciclo celular, a membrana plasmática (PM) torna-se hiperpolarizada por ativação de canais Kv (Kv1.3, Eag1) na fase G1 e canais de $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}$ (KCa3.1) na fase G1/S. Fatores de crescimento (IGF-1) ativam efetores, como fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K), ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase*), que aumentam expressão e atividade de canais de K^{+} induzindo a hiperpolarização do potencial de membrana (MP). A ativação de fosfolipase C ($\text{PLC}\gamma$) liberando inositol-1,4,5 trifosfato (InsP3) e Ca^{2+} do retículo endoplasmático (ER); influxo de Ca^{2+} extracelular ocorre através de canais ORAI-1/ORA-3/TRPC1. A elevação citosólica nos níveis de Ca^{2+} modula a atividade de fatores de transcrição (TF), como FOS, JUN, NAFAT, C-MYC, intervindo na expressão de ciclinas (D,E,A) / CDKs (4,2) e inativação das proteínas inibidoras CDK (p27^{KIP1} , $\text{p21}^{\text{waf1/cip1}}$). Via MAPKinase-p38 pode ser utilizada na fase M para regular a expressão de ciclina B1 por canais EAG2 ou induzir a proliferação celular independentemente (p38 para EAG1, ERK1/2; JNK para KCa3.1) (AHIDOUCH, AHIDOUCH, 2013).

O **enxofre** é essencial na constituição de alguns aminoácidos. Muitos compostos orgânicos voláteis sulfurados são liberados por células HepG2 em cultivo, como o dimetil sulfureto, etil-metil sulfureto, tiofeno 3-metil, dentre outros, resultado do catabolismo de aminoácidos contendo **S** na estrutura (MOCHALSKI et. al., 2013).

Cobre é um elemento traço não disponibilizado na composição comercial de meios de cultivo celular (DMEM; soro fetal bovino). Cofator de várias enzimas, como a citocromo-c oxidase mitocondrial, em concentrações elevadas pode provocar danos ao DNA ($EC_{50} = 161 \mu\text{M}$) em cultivo de células HepG2 (RUDZOK et. al., 2009). Envolvido na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), células expostas a concentrações elevadas de **Cu** aumentam a expressão de enzimas antioxidativas Zn/Cu-dependentes, como a superóxido dismutase (ARIGONY et. al., 2013; LINDER, 2012; MARTINEZ et. al., 2014), efeito também observado em cultivos de células HepG2, exibindo, ainda produção da enzima lactato desidrogenase (LDH) proporcional às concentrações de **Cu** no meio (ARNAL et. al., 2013).

Ferro, cujo principal órgão de armazenamento é o fígado (como ferritina), é essencial na composição de várias proteínas e enzimas (peroxidases, hemoglobina, ferredoxina, complexos mitocondriais I, II, III, helicases), na síntese de DNA/RNA, regulação na expressão de genes e estabilidade genômica, proliferação e diferenciação celular. Como o **Cu**, participa de vias oxi-redutoras (cofator de peroxidases, como a catalase) podendo ser citotóxico ($>10 \mu\text{mol/L}$) gerando ERO ($-\text{OH}$ ou $\bullet\text{OH}$) e provocar dano oxidativo intracelular (ARIGONY, 2013, ARIGONY et. al., 2013). É transportado por proteínas transmembrana da família ZIP, das quais também participa da regulação na expressão genética, juntamente com outros íons metálicos como **Cd**, **Mn** e **Zn**. Células HepG2 expressam Zip14 (BYRNE et. al., 2013; NAM, KNUTSON, 2012).

Selênio é um elemento traço importante na integridade de membranas, metabolismo energético e proteção do DNA contra danos oxidativos, por atuar na regulação do estado redox celular, compondo estrutura de enzimas antioxidantes como glutatona peroxidase e redutase tioredoxina (ARIGONY et. al., 2013).

2.6. Plantas como fonte de agentes antitumorais

As ciências farmacêutica e nutricional estão cada vez mais unidas nos estudos do efeito sinérgico entre as terapias com medicamentos e a nutrição na luta contra várias doenças, incluindo o câncer (RAMALINGUM, MAHOMOODALLY, 2014). Produtos naturais são fontes importantes no desenvolvimento de drogas antitumorais (Fig. 21), e correspondem a mais de 60% dos medicamentos utilizados no tratamento do câncer (FERNANDO, RUPASINGHE, 2013; GREENLEE, 2012; LI et al., 2013; RAMALINGUM, MAHOMOODALLY, 2014).

Muitas substâncias isoladas a partir de plantas frequentemente podem não ser eficientes drogas antitumorais, mas tornam-se protótipos para a produção sintética de novos compostos que efetivamente serão utilizados como quimioterápicos. Moléculas isoladas de plantas e outros organismos são importantes fontes para o desenvolvimento de agentes ligantes que transportem moléculas citotóxicas diretamente ao sítio tumoral específico reduzindo efeitos colaterais em tecidos sadios. Com as descobertas cada vez maiores de substâncias reguladoras do ciclo celular, as investigações de fontes naturais em potencial para o desenvolvimento de novas drogas seletivas que agem sobre proteínas-chaves da proliferação celular são cada vez mais intensas (KUMAR, 2012; TALIB, 2011).

As primeiras substâncias químicas isoladas de plantas usadas para fins clínicos foram os alcaloides vimblastina e vincristina (Fig. 21), obtidos de *Catharanthus roseus* (*Apocynaceae*), muito utilizados no tratamento do câncer cujos análogos semi-sintéticos são representados pela vinorelbina e vindesina, primariamente usados em combinação com outras drogas quimioterápicas para o tratamento de uma variedade de neoplasias incluindo leucemias, linfomas, sarcoma de Kaposi, cânceres de testículo, mama e pulmão (CRAGG et al., 2009).

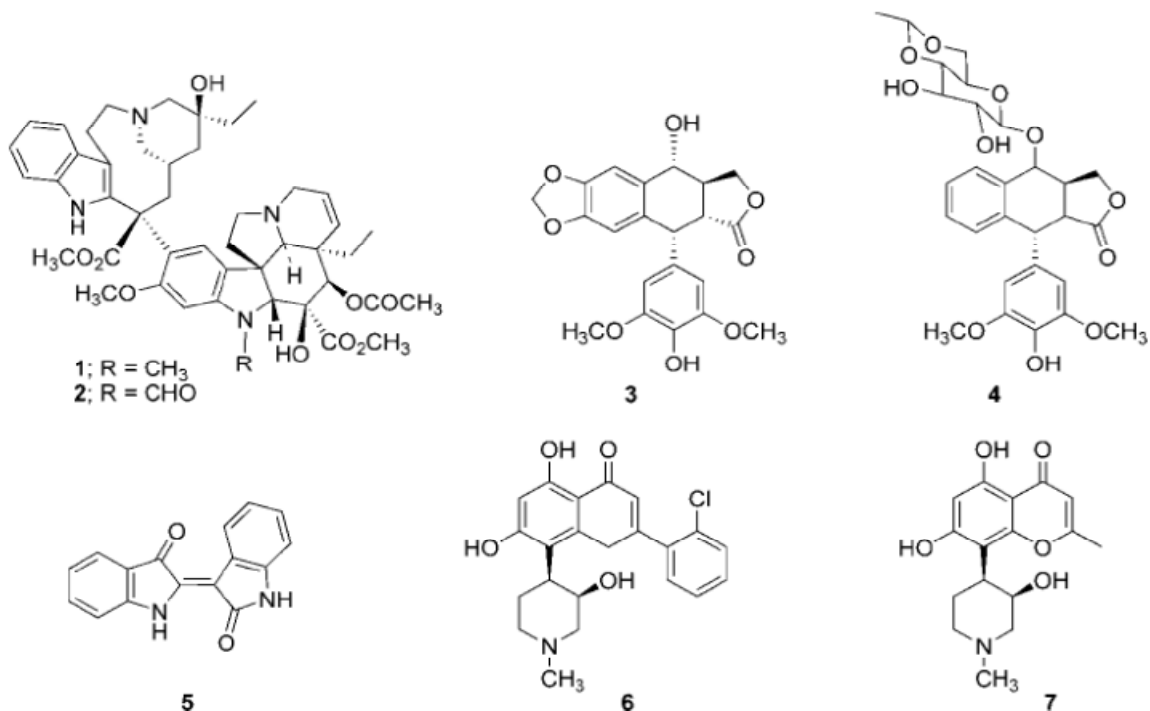


Figura 21 – Agentes antitumorais derivados de plantas utilizados pela medicina tradicional isoladas em várias partes do mundo. **1.** Vincristina (Madagascar); **2.** Vincristina (Madagascar); **3.** Podofilotoxina (EUA); **4.** Etoposide (semi-sintético); **5.** Indirubins (China); **6.** Flavopiridol (China); **7.** Rohitukina (Índia) (CRAGG et al., 2009).

A análise das fontes de drogas farmacológicas desenvolvidas até 2008 lista mais de 1024 moléculas, naturais, semi-sintéticas ou sintéticas. Considerando as categorias de patologias para as drogas químicas registradas pela FDA (Fig. 22) e classificadas como naturalmente derivadas ou inspiradas em fontes naturais, 79% são para o tratamento do câncer (CRAGG et al., 2009; NEWMAN, CRAGG, 2009). Os estudos confirmam a importância da natureza, não somente como fonte de agentes com potencial quimioterapêutico, mas também fonte de modelos químicos que se tornam base e inspiração para a semi-síntese ou síntese total de novas drogas efetivas antitumorais. A descoberta cada vez maior de novos agentes a partir das plantas para o tratamento do câncer pode ser atribuído, direta ou indiretamente, ao histórico da medicina tradicional.

Inúmeros princípios ativos com propriedades curativas obtidos de diversas plantas têm sido base para o desenvolvimento de drogas de grande interesse comercial, e são encontrados em plantas que contêm grande diversidade de constituintes químicos como fenóis, cumarinas, lignanas, óleos essenciais, monoterpenos, carotenoides, glicosídeos, flavonoides, ácidos orgânicos, alcaloides e xantinas (COSTA et al., 2013; MOREIRA et al., 2013; RAMALINGUM, MAHOMOODALLY, 2014).

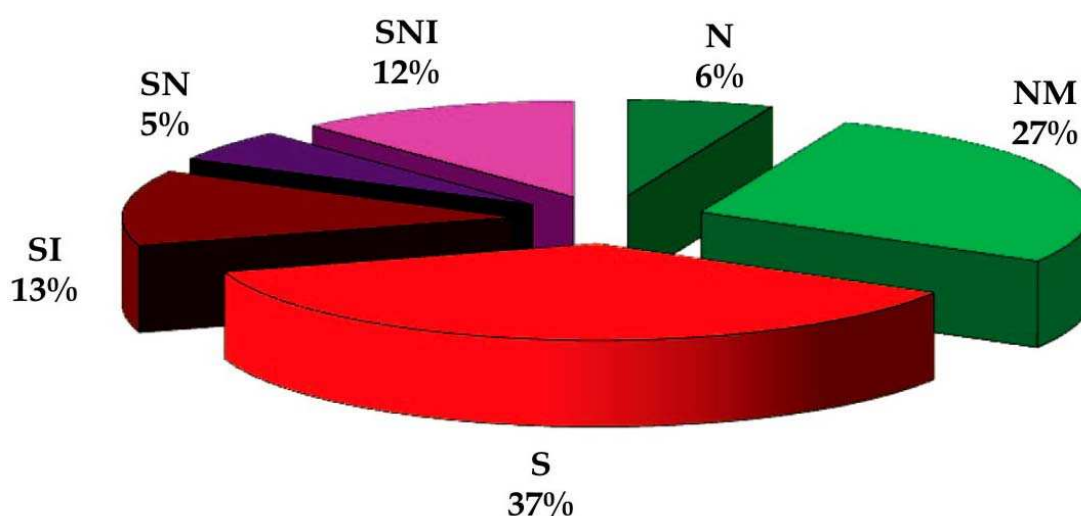


Figura 22 – Compostos químicos registrados pela FDA entre 1981 a 2008, num total de 1020 drogas químicas. N: produto natural sem modificação; NM: produto natural com modificação; S: produto totalmente sintético; SI: produto sintético inibidor da molécula-alvo de interesse, com inibição competitiva ao substrato do produto natural; SN: produto sintético com o farmacóforo do produto natural; SNI: produto sintético com o farmacóforo do produto natural apresentando inibição competitiva com o substrato do produto natural (CRAGG et al., 2009).

O Brasil possui a maior diversidade vegetal do mundo e muitas pesquisas estão sendo direcionadas neste sentido, sendo que o maior número de plantas investigadas nas últimas três décadas concentra-se nos biomas Caatinga (27,38%), Cerrado (25,0%) e Mata Atlântica (22,6%) com isolamento de cerca de 30 moléculas com atividade antitumoral (MELO et al., 2011). Mais de 400 diferentes extratos preparados a partir das folhas, flores, frutos, sementes ou ramos de 50 plantas do Cerrado brasileiro exibiram potencial citotóxico contra linhagens de células tumorais do carcinoma do cólon humano, melanoma e câncer de cérebro (MESQUITA et al., 2009). Um levantamento farmacológico etnobotânico desde a década de 80 revela o uso popular de mais de 80 espécies de plantas medicinais no combate ao câncer, número considerado muito baixo em relação à diversidade botânica havendo, ainda, forte escassez no estudo do potencial antineoplásico de Anonáceas no país (MELO et al., 2011).

2.7. *Annonaceae*

Em número de espécies, a família *Annonaceae* destaca-se na ordem *Magnoliales*, dentre as angiospermas mais primitivas, abrigando cerca de 135 gêneros e 2.500 espécies distribuídas principalmente nas zonas tropicais (AMINIMOGHADAMFAROUJ et al., 2011, LI et al., 2013a), com novas espécies ainda sendo conhecidas e descritas (DEROIN, LÖTTER, 2013; JOHNSON et al., 2013; LOPES et al., 2014; RODRIGUEZ et al., 2014) ou reclassificadas (COUVREUR, 2014) e novos fitoquímicos sendo descobertos em todos os órgãos da planta (MOREIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2014).

2.7.1. Acetogeninas

As acetogeninas compõem um grupo de metabólitos secundários exclusivo da família *Annonaceae*, formado pela via bioquímica policetídica do acetato e derivam-se de ácidos graxos C₃₅-C₃₇ combinados com unidades 2-propanol. A longa cadeia alifática hidrocarbônica (Fig. 23-III) pode exibir funções oxigenadas como hidroxilas, acetoxilas, cetonas, epóxidos, tetrahidrofuranos e tetrahidropiranos, podendo estar presentes

ligações duplas e triplas (Fig. 23-I). Há também de um a três anéis tetrahidrofuranos (THF) 2,5-dissubstituídos no interior da molécula (Figura 23-II), além de um radical terminal 4-metil γ -lactona α,β -insaturado, às vezes rearranjado à cetolactona (Fig. 23-IV) (GUPTA et. al., 2011; LEITE, 2009; LIAW et. al., 2010).

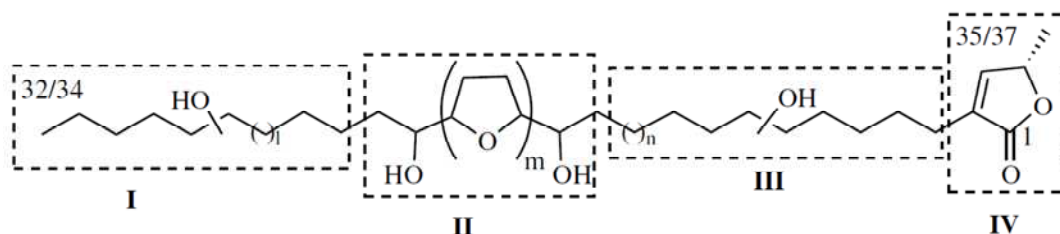
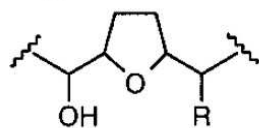


Figura 23 – Estrutura geral de Acetogeninas (BERMEJO, 2005; HU et. al., 2006).

Desde a descoberta da primeira acetogenina uvaricina (JOLAD et. al., 1982), já foram descritas mais de 500 outras moléculas. O interesse por essas plantas e pelas acetogeninas vem crescendo principalmente pela variada ação biológica que apresentam e por serem candidatas promissoras para uma geração de drogas contra tumores quimioterápico-resistentes. Podem ser isoladas de sementes, frutos, caules e folhas de Anonáceas e muitas delas com suas estruturas químicas já estabelecidas (CHAVAN et. al., 2014; CHEN et. al., 2012; CHEN et. al., 2012a,b; CONSOLACION et. al., 2012; LI et. al., 2013; MOREIRA et al., 2013; PEDRO et. al., 2013a; SUN et. al., 2014).

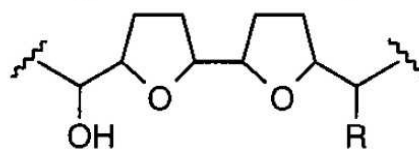
De acordo com a posição das funções químicas e estereoquímica que apresentam (Fig. 24), as acetogeninas podem ser classificadas com base no anel THF em compostos mono-tetrahidrofurano, bis-tetrahidrofurano adjacente, bis-tetrahidrofurano não-adjacente, anel não-tetrahidrofurano, tri-tetrahidrofurano e acetogeninas não-clássicas (tetrahidropiranos e compostos tetrahidrofuranos anel-hidroxilados), seguidos pela subclassificação de γ -lactona, γ -lactona substituída ou cetolactonas variantes (BERMEJO et. al., 2005; CHAVAN et. al., 2014; GUPTA et. al., 2011; LIN et. al., 2014; PEDRO et. al., 2013a).

Acetogeninas Mono-THF



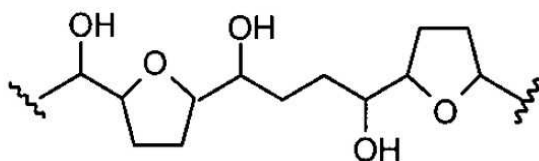
R = H, OH

Acetogeninas bis-THF Adjacente

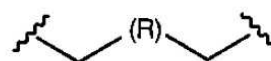


R = H, OH

Acetogeninas bis-THF Não-Adjacente

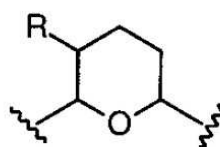


Acetogeninas sem Anel THF



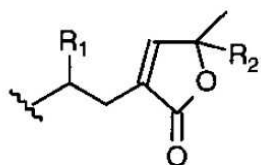
R = $-(\text{CH}_2)_n-$, epóxido, cetona, $-\text{CH}-\text{OH}$

Acetogeninas Não-Clássicas



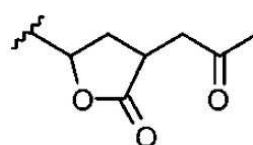
R = H, OH

Sub-tipos do Anel Terminal Lactona

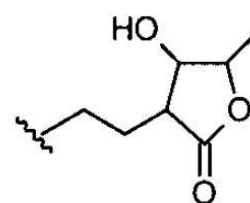


R₁ = H, OH

R₂ = H, OH



Cetolactona
cis ou *trans*



Anel hidroxilado
e reduzido

Figura 24 – Classificação de Acetogeninas Anonáceas com base no sistema tetrahydrofurano (THF), tetrahydropirano (não clássicas), epóxi e γ -lactona (ZAFRA-POLO et. al., 1996; ALALI et. al., 1999).

Anonáceas são amplamente utilizadas na medicina popular, exibindo ação conhecida contra diarreia, anti-bacteriana, anti-viral, anti-câncer, infertilidade, espasmos musculares, disenteria, úlceras, febre, insônia, reumatismo, artrite, hipertensão, sífilis, palpitação, hipertireoidismo, vermes, escorbuto e gripe (BIBA et. al., 2014; CHAVAN et. al., 2014; LI et. al., 2013a; RAMALINGUM, MAHOMOODALLY, 2014; SIVASANKARI et. al., 2014) e até analgésica e anti-inflamatória (SEANGPHAKDEE et. al., 2013; SINGH et. al., 2014a), controle da diabetes (FLORENCE et. al., 2014), contra malária (ANOSA et. al., 2014; KANG et. al., 2014), leishmaniose (SINGH et. al., 2014b) e insetos-praga (KRINSKI et. al., 2014; RIBEIRO et. al., 2014) ou vetores, como o *Aedes aegypti* (COSTA et. al., 2014a).

Fitoquímicos de folhas, frutos, sementes, raízes e caule de *Annonaceae* incluem compostos fenólicos e voláteis, alcaloides, flavonoides, triterpenoides, esteroides, saponinas, fitoesteróis, taninos, óleos essenciais e acetogeninas, dentre outros (BIBA et. al., 2014; COSTA et. al., 2013; CUEVAS et. al., 2014; ESQUINCA et. al., 2014; FERRAZ et. al., 2013; FERRAZ et. al., 2014; LAGE et. al., 2014; LI et. al., 2013; YAPI et. al., 2014; WOGUEN et. al., 2014). Devido à composição química constituinte, diferentes partes da planta podem apresentar propriedades antitumorais distintas (LI et al., 2013; FILHO et al., 2014).

2.7.2. Bioatividade antitumoral de Acetogeninas

Tem sido demonstrada a ação antitumoral seletiva *in vitro* das acetogeninas em diferentes linhagens tumorais (ASTIRIN et. al., 2013; BIBA et. al., 2014; CHEN et. al., 2012a,b; CHAVAN et. al., 2014; LI et. al., 2013, PEDRO et. al., 2013; PEDRO et. al., 2013a).

Inúmeros estudos *in vivo* (GUPTA et. al., 2011) demonstram efeitos fortemente antineoplásicos das acetogeninas uvaricina, rolinona, asimicina e bulatacina, com melhor tolerância ao tratamento, efeitos colaterais menos intensos e menor toxicidade, com resultados muito superiores quando comparados a quimioterápicos comerciais (Taxol, Cisplatina). Zeylenol, um ciclohexano polioxigenado extraído de caules de *Uvaria grandiflora* tem-se mostrado inibidor da proliferação de células HepG2, por ativar a cascata pró-apotótica de caspase-3 (SEANGPHAKDEE et. al. 2013).

Extratos de *Annona diversifolia* administrados (10 mg/kg) por 25 dias a modelos animais com implantes de células do câncer de mama humano, exibiram redução no tamanho e peso da neoplasia (LIAW et. al., 2010). Extratos das sementes de *A. squamosa* exibem efeito pró-apoptótico em células do carcinoma de mama, leucemia e carcinoma de cólon, por provocar perda de Bcl-2, elevação na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e redução dos níveis de glutathiona reduzida (PARDHASARADHI et. al., 2005). Extratos obtidos a partir da polpa de *A. cherimola* exibiram propriedades fortemente antioxidantes, decréscimo acentuado na peroxidação de lipídios e efeito citoprotetor contra fortes agentes oxidantes (BARRECA et. al., 2011; DANI et. al., 2010).

Estudos *in vivo* comprovam, através de análises bioquímicas e histopatológicas, o efeito hepatoprotetor de *Annona crassifolia* (DRAGANO et. al., 2010; ROESLER, 2011), *A. squamosa* (RAJ et. al., 2009; SALEEN et. al., 2008), principalmente se associada à silimarina, fármaco hepatoprotetor (UDUMAN et. al., 2011), como verificado pelo aumento ou manutenção da atividade das enzimas antioxidantes hepáticas, redução do estresse oxidativo com menores níveis de ERO, preservação do conteúdo de P450 e prevenção da peroxidação lipídica, aumento de equivalentes de glutathiona, decréscimo na atividade da catalase, redução nos níveis de indicadores de hepatotoxicidade como alfa-feto proteína, fosfatase alcalina, alanina e aspartato transaminases, γ -glutamil transpeptidase e bilirrubina em animais hepatoinjuriados.

No Brasil, há escassez em pesquisas do potencial antineoplásico das Anonáceas, segundo levantamento científico etnobotânicofarmacológico realizado nas últimas três décadas, sendo as famílias *Euphorbiaceae* e *Fabaceae* as mais frequentemente citadas (MELO et. al., 2011).

A Tabela 6 apresenta a bioatividade antitumoral de algumas acetogeninas com estrutura e função já descritas no meio científico.

Tabela 6 – Bioatividade de algumas acetogeninas de Anonáceas em diferentes tipos de tumores.

ACETOGENINAS/ EXTRATO	ANONÁCEA	AÇÃO	TUMOR (LINHAGEM CELULAR)	REFERÊNCIA
Extrato foliar	<i>Annona muricata</i>	↑ expressão p53 (pró-apoptótica); ↓ hsp70 (homeostase celular).	Linforma (Raji -CCL-86)	Astirin et. al., 2014.
Uvarigrandina Bulatacina Esquamostatina	<i>A. squamosa</i>	Citotoxicidade <i>in vitro</i> e efeito anti-tumoral <i>in vivo</i> .	Pulmão (A549) Carcinoma Cervical (HeLa) Carcinoma de Mama (MCF-7) Hepatocarcinoma (HepG2, SMMC-7721) Adenocarcinoma gástrico (MKN-45)	Chen et. al., 2011. Chen et. al., 2012b.
Esquamosamida	<i>A. glabra</i>	Forte atividade antioxidante (↓ ROS) e antiproliferativa; inibição da fosforilação de Akt e Rb; decréscimo na expressão de ciclinas D1, E e CDK2; ↑ expressão de p27 ^{kip1} .	Hepatocarcinoma (HepG2)	Qin et. al., 2011.
Muricina	<i>A. muricata</i>	Citotoxicidade e atividade antiproliferativa, com inibição do ciclo celular.	Câncer de Próstata (PC-3)	Sun et. al., 2014.
Anonacina	<i>A. muricata</i> <i>Asimina triloba</i>	Bloqueio do ciclo celular em G0/G1; indução à apoptose; intesificação das vias p21 ^{Waf1} p27 ^{Kip1} ; inibição na expressão da ciclina D1 e atividade de Bcl-2; decréscimo na fosforilação de ERK1/2, JNK e STATt3.	Carcinoma de Mama (MCF-7)	Ko et. al., 2011.
Esquamocina Anonina	<i>A. glabra</i>	Citotoxicidade.	Carcinoma de Pulmão (A549) Cólon (HT29) Carcinoma de Mama (MCF-7)	Lateff et. al., 2009.

Tabela 6 – Bioatividade de algumas acetogeninas de Anonáceas em diferentes tipos de tumores (continuação).

ACETOGENINAS/ EXTRATO	ANONÁCEA	AÇÃO	TUMOR (LINHAGEM CELULAR)	REFERÊNCIA
Anosquatina Anosquacina	<i>Annona squamosa</i>	Citotoxicidade: ↓ viabilidade celular.	Carcinoma de Mama (MCF-7) Carcinoma de Pulmão (A549) Carcinoma Cerival (Hela) Carcinoma Hepático (HepG2, SMMC)	Chen et. al., 2012a.
Cherimolina Motrilina Laherradurina Rolinianstatin	<i>A. cherimólia</i> <i>Rollinia mucosa</i>	Inibição do complexo I mitocondrial. ↓ $\Delta\psi_m$ mitocondrial; ↓ níveis de ATP. ↑ ROS/superóxidos. Efluxo de Ca^{2+} mitocondrial. ↑ Atividade de caspase-9; Apoptose.	Hepatocarcinoma (HepG2)	Pedro et. al., 2013.
Ximarginatina	<i>Xylopiya emarginata</i>	Inibição do transporte mitocondrial de elétrons em hepatócitos.	-	Saizarbitoria et al., 2009.
Cherimolina Laherradurina	<i>A. diversifolia</i>	Antiproliferação celular dose-dependente <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , com ação superior comparada ao quimioterápico doxorubicina.	Carcinoma Cervical (HeLa) Adenocarcinoma colorretal (SW-480)	Guzmán et. al., 2009.
Esquamocina	<i>Annona sp.</i>	Interrupção do ciclo celular (G1); Apoptose por ativação de vias extrínscas (↑ caspases -8) e intrínscas (↑ caspases-9); Redução nos níveis de fosforilação da histona H3 pela modulação de aurora B e pMSK1.	Glioblastoma (GBM-8401) Hepatoma (Huh-7) Cólon (SW-620)	Lee et. al., 2011.
Extrato de folhas	<i>A. muricata</i>	Antiproliferação: ↓ via PI3/J/Akt ↓ viabilidade. ↓ expressão de Glut1-4; ↓ exoquinase; ↓ LDH	Câncer pancreático (FG-357; CD18-HPAF)	Torres et. al., 2012.

Tabela 6 – Bioatividade de algumas acetogeninas de Anonáceas em diferentes tipos de tumores (continuação).

ACETOGENINAS/ EXTRATO	ANONÁCEA	AÇÃO ANTITUMORAL	TUMOR (LINHAGEM CELULAR)	REFERÊNCIA
Esquamostanina A Esquamostanina B	<i>Annona squamosa</i>	Citotoxicidade.	Adenocarcinoma Cólon (HCT) Carcinoma de Pulmão (A549) Carcinoma de Mama (MCF-7) Adenocarcinoma Próstata (PC-3)	Yang et. al., 2009a.
Extrato do fruto	<i>Annona cherimola</i>	Antioxidante.	Cólon (HT29) e Linfoma (Raji)	Elera et. al., 2011.
Desacetil Uvaricina	<i>Uvaria acuminata</i>	Inibição da proliferação celular; ↑ expressão de p53 e ↑ receptores de membrana TLR-4	Carcinoma Hepático (HepG-2215)	He et. al., 2011.
Extrato foliar	<i>A. muricata</i>	Apoptose.	Carcinoma Cervical (Hela)	Astirin et. al., 2013.
Extrato metano- lico de folhas	<i>Annona reticulata</i>	Inibição de caspase-6 e -9, citotoxicidade.	Hepatocarcinoma (HepG2) Adenocarcinoma Cólon (Caco-2) Carcinoma Renal (HEK)	Mondal et. al., 2007.
Óleo essencial de folhas	<i>Xylopiya frutescens</i>	Efeito anti-tumoral <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> sem efeitos tóxicos <i>in vivo</i> .	Adenocarcinoma ovariano (Ovcar-8) Carcinoma pulmonar (NCI-H358M) Carcinoma próstata (PC-3M)	Ferraz et. al., 2013.
Anonacina Glaucanetina	<i>Asimina triloba</i>	Inibição das vias de sinalização envolvendo o Fator Induzido por Hipoxia (HIF-1) e VEGF; antiangiogênese. Inibição do complexo I mitocondrial.	Mama (T47D, MDA_MB-231) Adenocarcinoma Próstata (PC-3, DU-145)	Coothankandaswamy et. al., 2010.
Extrato foliar	<i>Tryginae oblongiforme</i>	Antioxidante, citotoxicidade; ↑LDH.	Adenocarcinoma Cólon (Colo-205) Leucemia (U-937)	Pompilho, 2011.

Extratos radiculares alcoólicos e aquosos de *A. reticulata* exibem atividade antiproliferativa *in vitro* em células do câncer pulmonar, leucemia, câncer cervical e adenocarcinoma mamário, reforçando o seu potencial quimiopreventivo (SURESH et. al., 2011). Entretanto, NUNES et. al. (2011) relatam não haver interferência na viabilidade de células leucêmicas quando se usa extratos aquosos da polpa dos frutos de *A. muricata*, mas RIBEIRO et. al. (2010) acreditam que os efeitos antineoplásicos desta espécie podem ser explicados por sua atividade inibitória das metaloproteinasas-9, enzimas implicadas na progressão tumoral, envolvidas com a migração, invasividade, metástases e angiogênese de muitas malignidades humanas.

Acetogeninas como bulatacina, anonacina, isoanonacina, muricatocina, anomutacina, anomuricina, goniotalamicina, anossenegalina, esquamocina e motrilina apresentam efeitos antitumorais em diferentes linhagens celulares (CHAMPY et al., 2009; LI et al., 2010), inclusive em ensaios *in vivo*, exibindo até 78% de supressão de neoplasias hepáticas (LI et. al., 2010). Bulatacina interfere ainda nos níveis citoplasmáticos de cAMP e cGMP em células HepG2 (CHIU et. al., 2003), bloqueio na transferência de elétrons (e redução da ubiquinona) no complexo I mitocondrial em células bovinas (KAKUTANI et. al., 2010) e inibição da síntese de DNA (CHIH et. al., 2001), eventos com forte relação ao efeito citotóxico apoptótico.

Estudos envolvendo estrutura-atividade acetogênica apontam a relação entre estereoquímica e potencial citotóxico (LIN et. al., 2014). A modificação estrutural e a síntese de análogos de diversas acetogeninas têm sido empregadas com sucesso (CORTES 2014; et. al., FUJIOKA et. al., 2012; LIU et. al., 2014; YADAV et. al., 2014) e modificações químicas pontuais na estrutura das acetogeninas naturais podem elevar sua ação citotóxica seletiva sobre vários tipos de tumores, como o câncer gástrico, próstata, leucemia, cólon, mama e colorretal (AMINIMOGHADAMFAROUJ et. al., 2011; LIU et. al., 2014; SHI et. al., 2014; SUN et. al., 2014; XIAO et. al., 2011), muitas vezes com mínimos efeitos sobre células normais, alcançando até mesmo níveis de ação muito superiores se comparados a drogas comerciais utilizadas no tratamento de cânceres quimioterápico-resistentes.

Um sintético obtido a partir de uma esquamósida de *Annona glabra* apresenta forte efeito antiproliferativo em células hepatocarcinogênicas, com mínima citotoxicidade em células hepáticas normais; por interferir no fluxo intracelular de cálcio nas células tumorais, o sistema antioxidante glutatona foi intensificado, resultando na redução de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas células tumorais. ERO são constantemente produzidas e eliminadas, mantendo a integridade mitocondrial, com níveis bem menores em células normais, mas elevados em tumores, com vantagens proliferativas ao desenvolvimento neoplásico. Além disso, a esquamósida sintética bloqueou o ciclo celular, provocando a necrose, inibição da fosforilação de Rb, forte supressão da expressão de CDK2 e ciclina E, proteínas regulatórias que exercem papel essencial na progressão do ciclo celular em G0/G1 e fase S (PANDEY et. al., 2011, QIN et. al., 2011).

A seletividade de acetogeninas pode ser explicada por sua ação sobre a NADH oxidase, enzima altamente ativa presente na membrana plasmática - fonte de ERO, vantagem metabólica para células HepG2 (CUEVAS et. al., 2014; SOUZA et. al., 2009), bem como pelo seu efeito no aumento da permeabilidade da membrana à glicose e a elevada demanda de ATP eventos típicos no crescimento neoplásico descontrolado, principalmente aqueles quimiorresistentes, dependentes de bombas iônicas transmembranares (mediadas por proteínas-G). A ação acetogênica comprometeria a regeneração do NAD⁺ e as fosforilações na via glicolítica, levando as células tumorais à apoptose. Essa característica fornece potencial para o tratamento de tumores multidrogas resistentes ou mesmo a modificação química a partir destes compostos para o desenvolvimento de novos quimioterápicos mais potentes com perspectivas para uma medicina farmacologicamente seletiva e terapeuticamente ideal (LIAW et. al., 2010; AMINIMOGHADAMFAROUJ et. al., 2011, QIN et. al., 2011).

A bioatividade acetogênica também tem se mostrado com forte potencial inibidor do complexo I (mas não dos complexos II e III) da cadeia respiratória mitocondrial, ligando-se especialmente à subunidade hidrofóbica ND1 da enzima NADH:ubiquinona oxidoreductase, com alta especificidade (Val144-Glu192) e competitivamente ao sítio da ubiquinona (KAKUTANI et. al., 2010; LIN et. al., 2014; NAKANISH et. al., 2011). Há forte depleção de níveis de ATP

tendo como alvo a enzima NADH:ubiquinona oxidoreductase das células tumorais, resultando em processos apoptóticos (AMINIMOGHADAMFAROUJ et. al., 2011, PEDRO et. al., 2013). Diferentes acetogeninas têm atividades citotóxicas heterogêneas em seletividade e potencialidade sobre diferentes linhagens celulares tumorais (PEDRO et. al., 2013a), pouco afetando células não neoplásicas. Por exemplo, xymarginatina, uma acetogenina presente em Anonáceas do gênero *Xylopi*a, exibe IC₅₀ 1720 M e rotenona, um forte bloqueador da cadeia respiratória mitocondrial, exibe IC₅₀ 34,5 nM (SAIZARBITORIA et. al., 2009).

Estudos recentes associam doses elevadas de acetogeninas e doenças neurodegenerativas, como Parkinson (LIN et. al., 2014; YAMADA et. al., 2014), não, porém, reportados pelo site da Associação Brasil Parkinson (<<http://www.parkinson.org.br/firefox/index.html>>) ou pela National Parkinson Foudation – Florida/USA (<<http://www.parkinson.org>>) em sua publicação científica mais recente (NATIONAL PARKINSON FOUNDATION, 2014) nem confirmado por contato pessoal com essas instituições via correio eletrônico (recebido em 03 de Junho de 2014).

3. OBJETIVOS

No presente trabalho, foi investigado o efeito citotóxico *in vitro* do extrato de folhas de diferentes Anonáceas.

Para isso, os trabalhos experimentais foram desenvolvidos com os seguintes objetivos específicos:

1. Determinar o efeito citotóxico *in vitro* dos extratos foliares de 11 Anonáceas, em três períodos de tempo (24, 48 e 72 h) e quatro concentrações sobre células hepatocarcinogênicas HepG2 (ATCC HB-8065™).
2. Estabelecer ensaios comparativos *in vitro* entre os extratos vegetais e um fármaco comercial atualmente utilizado no tratamento do câncer hepático (5-Fluoruracil).
3. Avaliar a dinâmica química nos meios de cultivo (através da análise espectrométrica) e o metabolismo celular pela quantificação de marcadores tumorais das células expostas aos tratamentos.
4. Analisar o efeito apoptótico através da Citometria de Fluxo de dois extratos que exibirem efeitos citotóxicos, incluindo o quimioterápico 5-FLU.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes Gerais

Ácido acético glacial, água deionizada Milli-Q, amido seco, antibióticos (estreptomicina, penicilina), corante vermelho neutro (Vetec Química Fina Ltda), dimetil sulfóxido (DMSO), etanol, maltodextrina, Meio de Cultura Essencial Mínimo (MEM-Gibco™), Soro Fetal Bovino (Cultilab), tripsina, Tween® - 20 (Sigma), Kit Fitc-Anexina BD Pharmingen™. Isotiocianato de fluoresceína (FITC), Anexia-C, iodeto de propídio.

4.2. Equipamentos

Espectrômetro FAAS Optima 7300/DV PerkinElmer; Citômetro de Fluxo BD FACS Verse; Analisador de Química Clínica e Turbidimetria InVitro HumaStar 300; agitador de mesa Vertex Shaker® tipo VDRL modelo TS-2000; capela de Fluxo Laminar Telstar BioIIA (Terrasa); centrífuga refrigerada Jouan BR4i Multifunction Auto-Lock® (St. Herblain); Estufa de CO₂ Thermo Scientific HEPA Class 100 (EUA); leitor de microplacas Synergy HT - Biotek (USA); balança de precisão Gehara® 200; microscópio óptico invertido Leica acoplado a PC monitor modelo DFC295 (Watzlar); agitador Vortex Genie® 2-Si G560 (EUA); estufa de secagem.

4.3. Linhagens celulares

As células hepatocarcinogênicas HepG2 (ATCC HB-8065™), isoladas de um adolescente argentino em 1979, apresentam morfologia do parênquima hepático, além de manter a capacidade de sintetizar a maioria das proteínas plasmáticas características das células normais do fígado humano, além de marcadores tumorais (KNOWLES et. al., 1980; ATCC). A linhagem foi gentilmente cedida pela Professora Dra. Danielle Palma de Oliveira da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto.

4.4. Cultivo celular

- SOLUÇÕES:

. Tripsina:

Tripsina (10%) em PBS (pH 7), estéril (filtro 0,22 µm), armazenada em frasco estéril em geladeira.

. Meio de Cultura:

9,61 g de Meio Essencial Mínimo (DMEM-Gibco), suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino; L-glutamina (2 mM); penicilina (100 UI/mL), sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) e NaHCO₃, (2,2 g/L), pH 7,2, armazenado em frasco esterilizado em geladeira.

As células hepatocarcinogênicas humanas foram mantidas sob cultivo em meio DMEM suplementado e esterilizado (filtro 0,22 µm) e incubadas em estufa a 37 °C, sob atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Para isso foram utilizados frascos de cultivo estéreis (25 cm² - 50 mL ou 75 cm² - 250 mL), de poliestireno com tampa rosqueável (Sarstedt), onde as células cresceram aderidas em monocamada. O repique para subcultivos ocorreu a cada dois ou três dias, quando o crescimento celular apresentava confluência de 80-90%. Todos os procedimentos com as células foram realizados em fluxo laminar, com esterilização prévia do ambiente de trabalho com álcool 70% e radiação ultravioleta por 30 minutos.

4.5. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do Vermelho Neutro (*Neutral Red*)

- **SOLUÇÕES:**

. **Corante Vermelho Neutro (VN):**

250 $\mu\text{mol/mL}$ de solução estéril de VN, preparada a partir de 3 mg do corante em 1 mL de água destilada e esterilizada (filtro Millipore[®] 0,22 μm); diluição posterior de 240 μL do corante em 9,76 ml de meio de cultura;

. **Solução de lise:** 1% Ácido Acético Glacial, 50% Etanol e 49% de água destilada (v/v).

O teste do vermelho neutro (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina hidrocloreto) baseia-se na capacidade das células viáveis de incorporarem em lisossomos (BORENFREUND, PUERNER, 1984). Não tóxico e de natureza catiônica fraca, o corante VN atravessa passivamente as membranas. As células vivas, com a utilização continuada de ATP, mantêm um gradiente de pH entre o lisossomo ($\downarrow\text{pH}$) e o citoplasma, torna o VN protonado na matriz ácida da organela impedindo seu retorno passivo pela membrana lisossomal de volta ao citosol. A perda do gradiente de pH lisossômico, devido a danos em membranas e organelas ou lise celular, resultará em uma não retenção do corante. A integridade da membrana lisossomal está estreitamente relacionada com a viabilidade celular e a retenção diferencial do VN entre as células viáveis (que incorporam o corante conferindo maior sinal de leitura espectrofotométrico) e as células inviáveis, e fornecerá uma medida qualitativa e quantitativa da viabilidade celular (HARBELL et. al., 1997).

Após 24 horas de cultivo das células, em sextuplicatas nas placas de 96 poços, em procedimentos variáveis de acordo com os tratamentos, o sobrenadante foi removido adicionando-se, a seguir, 100 μL de solução estéril do corante VN (250 $\mu\text{mol/mL}$). Após cerca de 2 h de incubação em estufa (37 °C) para incorporação do corante, o sobrenadante foi cuidadosamente removido adicionando-se imediatamente 100 μL da solução de lise celular nos poços (para extração do VN de dentro dos lisossomos). A placa foi mantida em mesa de agitação (Vertex Shaker[®]) por 10 minutos e a

leitura da absorvância realizada em leitor de microplacas a 540 nm (BioTek, Synergy-HT, EUA). Os resultados são expressos em porcentagem de sobrevivência relativa ao grupo controle, de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{DO_{AM} - \Sigma DO_{C+}}{\Sigma DO_{C-} - \Sigma DO_{C+}} \times 100$$

Onde: **DO_{AM}**: densidade ótica da amostra;
Σ DO_{C+}: média das leituras óticas do controle positivo;
Σ DO_{C-}: média das leituras óticas do controle negativo.

4.6. Extratos de folhas de Anonáceas

Para manter o sigilo científico, os dados botânicos e georreferenciais das plantas utilizadas nesta pesquisa serão resguardados (Tabela 7). As 11 Anonáceas (9 espécies de 4 gêneros) originaram-se dos Estados de Minas Gerais (4), Amazonas (2), Espírito Santo (1), São Paulo (1) e Goiás (3). As espécies do AM foram gentilmente cedidas pelo Prof. José Ferreira da Silva e as de GO, pela Profa Michellia Pereira Soares. Todas foram oficialmente identificadas pela especialista em Botânica Sistemática de Anonáceas, Adriana Quintella Lobão, do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, em abril de 2012. Todos os espécimes foram herborizados e suas exsiccatas registradas em Herbário de Viçosa-MG (VIC-UFV) e Manaus-AM (RUAM-UFAM), credenciados no *Index Herbariorum*.

Logo após a coleta, as folhas das Anonáceas foram mantidas em estufa de circulação de ar forçado (37 °C) até a estabilização do peso. Os extratos secos foram formulados pela Indústria Farmacêutica Catedral Ltda, Belo Horizonte – MG, obtidos a partir da percolação de 5 kg de folhas de cada planta, submetidos à secagem por *spray-dryer*, incorporando 4 kg do excipiente maltodextrina como agente dessecante, padronizados na proporção 5:1. O certificado de análise físico-química e biológica de todos os extratos e o laudo microbiológico foram fornecidos pela empresa.

Todas as linhagens celulares foram submetidas inicialmente a quatro concentrações distintas dos extratos foliares, incluindo o quimioterápico 5-Fluoruracil, sob três períodos de tempo (24, 48 e 72 horas).

Tabela 7 – Origem e período de coleta das folhas das anonáceas utilizadas.

Anonáceas	Origem	Período de Coleta
a, f	Universidade de Rio Verde – GO	Fevereiro 2012
b	São Paulo – SP	Novembro 2011
c	Barbacena – MG	Novembro 2011
d, k	Universidade Federal de Manaus - AM	Janeiro 2013
e	Capitão Enéas - MG	Janeiro 2012
h, j	Viçosa - MG	Março 2012
g	Cachoeiro do Itapemirim - ES	Novembro 2011

4.6.1. Preparo das soluções com os extratos de Anonáceas

Soluções estoques dos extratos foliares das Anonáceas e do excipiente (maltodextrina) foram preparadas inicialmente na concentração máxima testada nos experimentos. O material vegetal foi totalmente dissolvido em meio de cultivo (DMEM + 5% SFB), com agitação (Vortex Genie®) e posteriormente filtrado (filtro Millipore® 0,22 µm), sob capela de fluxo laminar, em quantidade de meio suficiente para o número de placas de cultivo (96 poços) utilizado.

Para ensaios-controle, as células foram expostas somente ao meio de cultivo contendo o excipiente (maltodextrina) em dosagens equivalentes a cada concentração de extratos vegetais.

4.6.2. Avaliação do efeito citotóxico dos extratos de Anonáceas

As células foram incubadas na densidade pré-definida (1×10^4 células/poço), em três placas de 96 poços, em 100 μ L de meio de cultura (DMEM + 5% SFB), em atmosfera umidificada a 37 °C e 5% CO₂, por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por 100 μ L de um novo meio, em sextuplicata, contendo diferentes concentrações finais dos extratos, incluindo o quimioterápico 5-Fluoruracil (5-FLU); poços controles em sextuplicatas possuíam células cultivadas em Tween[®] 20 (controle positivo), meio de cultura DMEM + 5% SFB (controle negativo) e o excipiente do extrato (maltodextrina + meio de cultura + 5% SFB). Uma placa foi utilizada em cada período de tempo (24, 48 e 72 horas) para os ensaios de viabilidade celular como descrito no item 4.5.

4.7. Avaliação espectrométrica do efeito químico dos extratos

Para determinar o efeito dos tratamentos na dinâmica química de cultivo, as células HepG2 foram cultivadas em placas de 12 poços (10^5 células/poço), por 24 h. Após esse período, o meio de cultivo foi descartado e as células foram expostas, em triplicatas, a uma concentração maior inibitória e outra menor não inibitória para todos os 11 extratos foliares, incluindo o quimioterápico 5-FLU. Após 48 h, então, o sobrenadante foi coletado para determinação de Cálcio, Cádmiio, Cromo, Cobre, Ferro, Magnésio, Manganês, Níquel, Fósforo, Chumbo, Zinco, Alumínio, Cobalto, Molibidênio, Enxofre e Selênio, análises realizadas por Espectrometria de Emissão Atômica (ICP-OES Optima 8300 - WinLab-32^R Software ICP) no Departamento de Solos - UFV.

4.8. Avaliação dos marcadores celulares e tumorais

Para determinar o efeito dos tratamentos no metabolismo e integridade celular, as células HepG2 foram cultivadas em placas de 12 poços (10^5 células/poço) por 24 h. Após esse período, o meio de cultivo foi descartado e as células foram expostas, em triplicatas, a uma

concentração maior inibitória e outra menor não citotóxica para todos os 11 extratos foliares, incluindo o quimioterápico 5-FLU. Após 48 h, então, o sobrenadante (4 mL) foi coletado para determinação dos níveis de glicose, proteínas totais, albumina, lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-Glutamil transpeptidase (γ GT), resultados obtidos através do Analisador de Química Clínica e Turbidimetria *In Vitro* HumaStar 300, análises realizadas no Laboratório Clínico do Departamento de Veterinária – UFV.

4.9. Avaliação do efeito apoptótico dos extratos de Anonáceas

Para determinar o tipo de morte induzida, as células HepG2 foram cultivadas em placas de 12 poços (10^5 células/poço) e tratadas com dois dos extratos que exibiram resultados anti-proliferativos, incluindo o quimioterápico 5-FLU, em uma concentração maior citotóxica e outra menor não inibitória para cada ensaio. Após 24 h e 48 h, então, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e lavadas em solução PBS. Na concentração ajustada para 10^7 células/mL, foi realizado o teste Anexina V-FITC/Iodeto de Propídio para identificação de apoptose (anexina V^+/PI^-) e necrose (anexina V^+/PI^+) por citometria de fluxo (FACS BD Verse; FACS Suite Software), de acordo com as instruções do fabricante (Kit BD Pharmingen™). Debris celulares foram omitidos das análises em 20 mil eventos avaliados. As análises foram realizadas no Núcleo de Microscopia e Microanálise - UFV.

4.10. Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se o *software* estatístico GraphPad Prism, com as repetições ($n = 5$), desvios e tratamentos avaliados pela análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os tratamentos e o controle, e entre os tratamentos, foram comparadas pelo teste de Tukey, e consideradas estatisticamente significativas para $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeito do excipiente dos extratos sobre as células HepG2

Com o objetivo de avaliar o efeito celular do veículo maltodextrina contido na formulação padronizada dos extratos foliares, foram realizados cultivos paralelos somente com o excipiente, em concentrações específicas (1, 2, 4 e 8 mg/mL), e os resultados estão mostrados na Figura 26.

Observou-se que, em relação ao controle, não houve interferência inibitória no crescimento das células HepG2 pela maltodextrina em nenhuma das concentrações testadas nos períodos avaliados (24, 48 e 72 horas), o que confirma seu efeito não citotóxico sobre as células, em relação ao controle, destituído de maltodextrina (Fig. 25).

Sendo a maltodextrina um carboidrato energético (5-10 unidades de glicose), derivado do amido de milho, a maior oferta de energia disponível explica a intensa proliferação celular nos tratamentos em relação ao controle, em que apenas os nutrientes do meio de cultura (DMEM + SFB) estavam disponibilizados para a mesma quantidade de células.

A Fig. 26 apresenta as células da linhagem HepG2 cultivadas em tratamentos-controle (somente com DMEM) e em maltodextrina, e a Fig. 27 apresenta as células observadas durante o teste de viabilidade com o vermelho neutro.

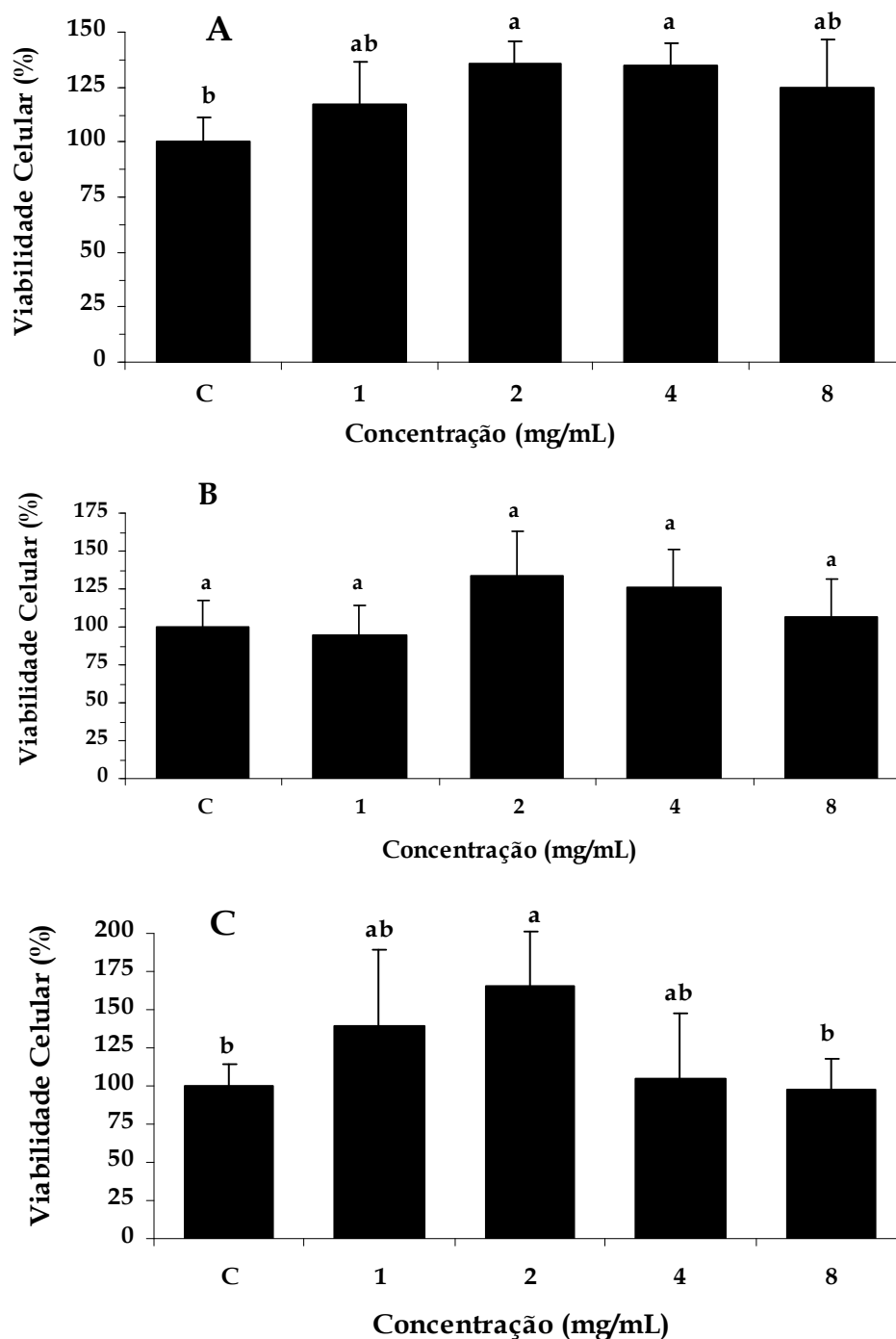


Figura 25 – Efeito do excipiente maltodextrina dos extratos Anonáceas sobre a viabilidade de células HepG2. Concentrações específicas (1, 2, 4 e 8 mg/mL) foram analisadas em relação ao controle (C), pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro, cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂, na quantidade de 1 x 10⁴ células em placas de 96 poços, no período de 24 (A), 48 (B) e 72 h (C). Os dados são de experimentos conduzidos em sextuplicatas, e barras com letras comuns não diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$) pelo teste Tukey.

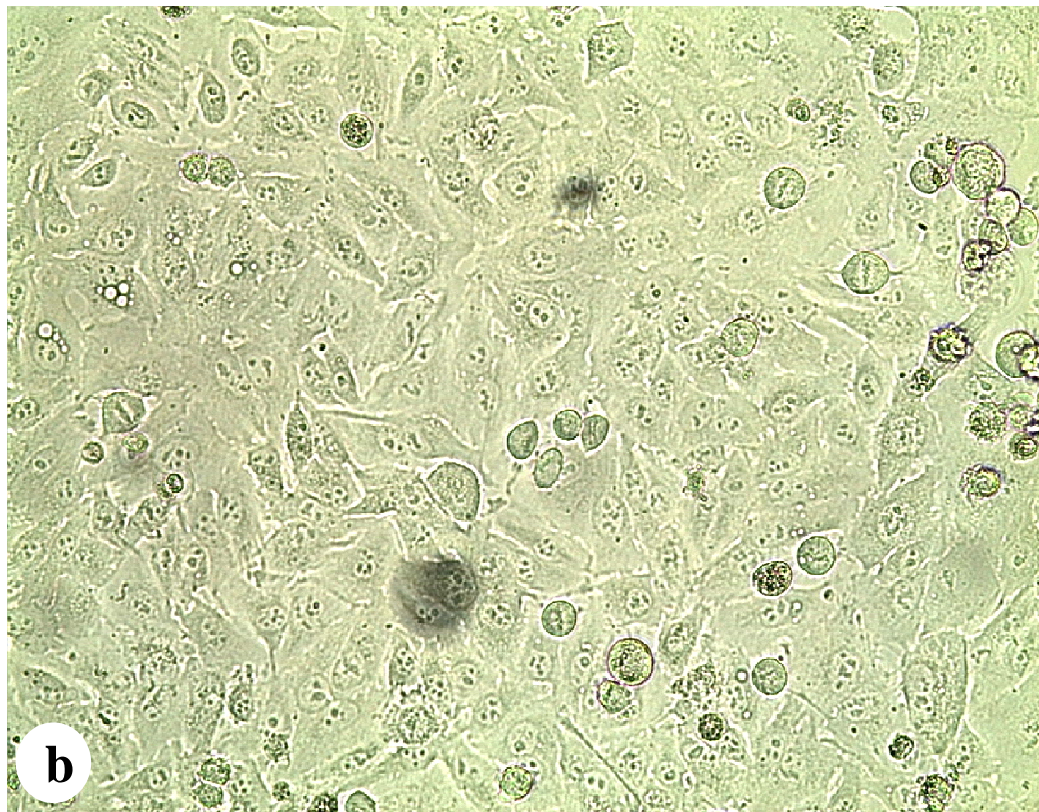
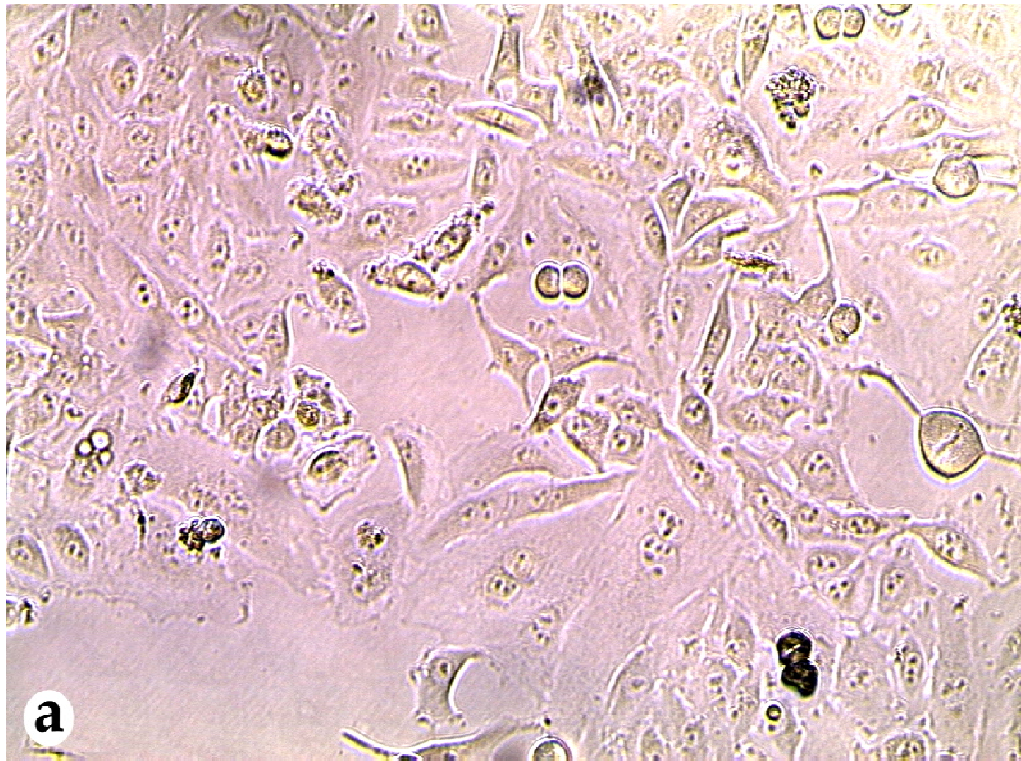


Figura 26 – Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 em um cultivo controle (a) e em cultivo com o excipiente maltodextrina (b). Os cultivos foram mantidos a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂, na concentração 8 mg/mL de maltodextrina, após 72 horas de exposição. Aumento de 200x.

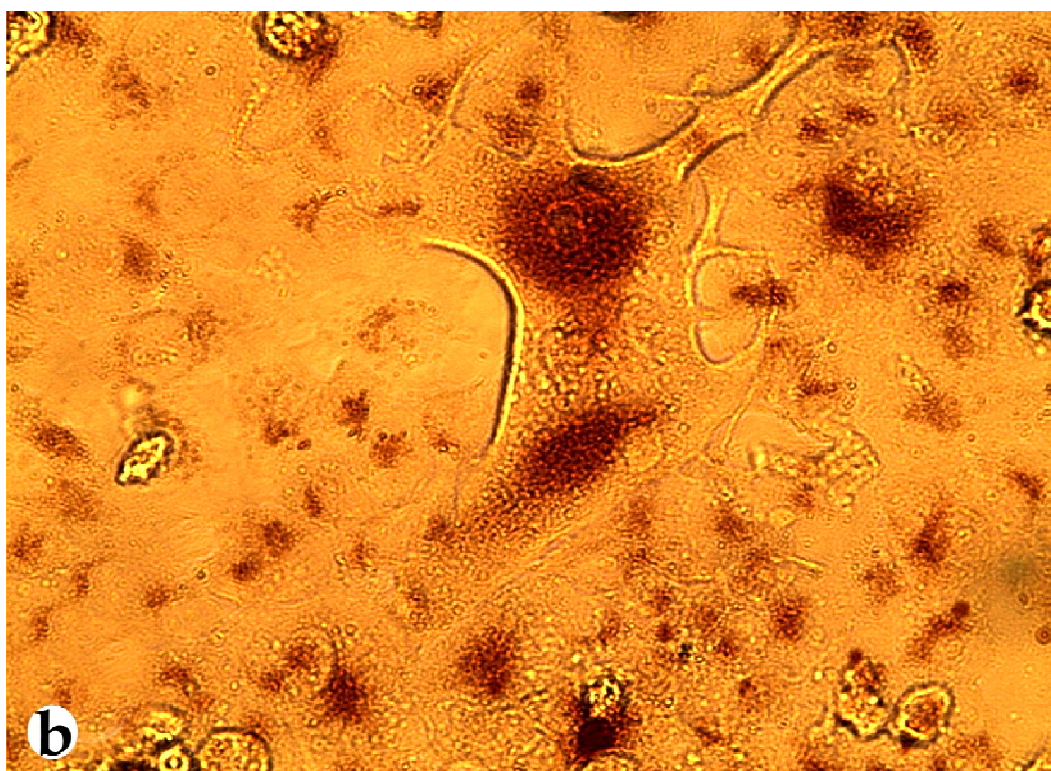
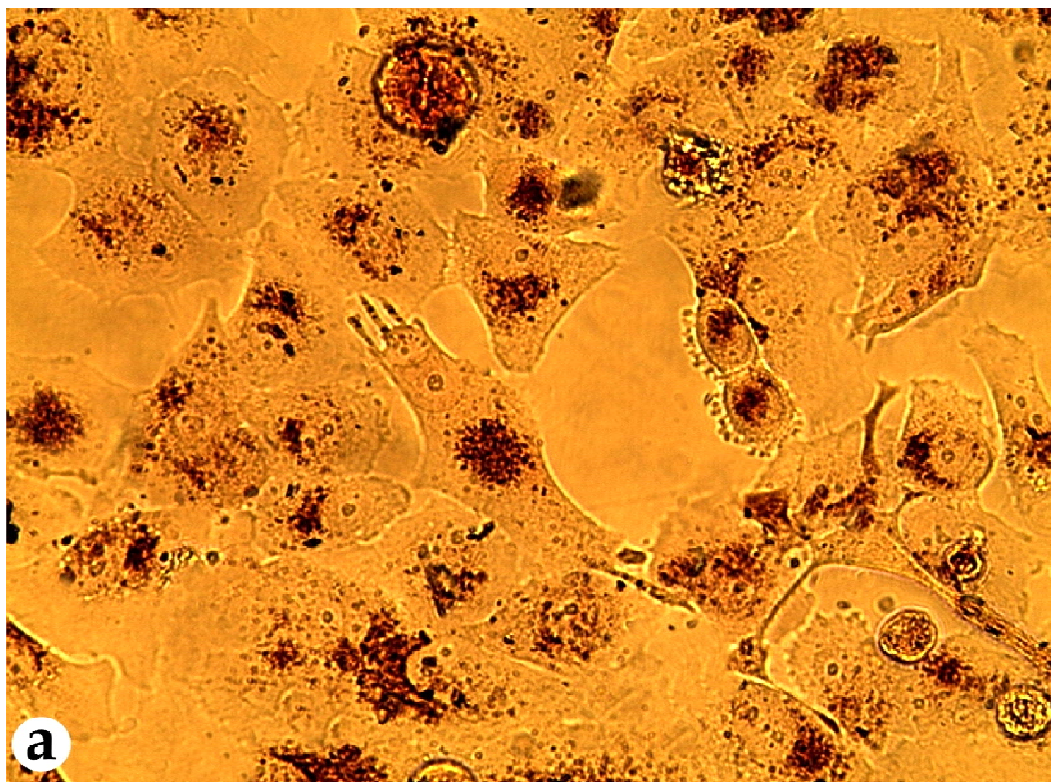


Figura 27 – Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 em cultivo após tratamento com vermelho neutro. Nota-se o acúmulo do corante no interior das células. Aumento de 200x (a) e 400x (b).

5.2. Efeito dos extratos de Anonáceas sobre as células HepG2

A exposição das células do carcinoma hepático às diferentes concentrações do quimioterápico 5-Fluoruracil (5-FLU) (0,12 a 8,0 mg/mL) e do extrato foliar de Anonáceas (0,01 a 16 mg/mL) durante os períodos de tempo avaliados (24, 48 e 72 h) resultou em decréscimo da viabilidade celular de modo dose e tempo dependente em todos os tratamentos quando comparados ao cultivo controle (0 mg/mL), como mostrado nas Fig. 28 a 30.

Logo nas primeiras 24 h de cultivo, a viabilidade celular foi fortemente reduzida (50% a 0%) pelas maiores concentrações (< 4 mg/mL) de 7 dos 11 extratos testados (Anonáceas (a), (b), (d), (f), (g), (h), (i) – Fig. 28 a 30), efeito superior ao exibido pelo quimioterápico 5-FLU (Fig. 28a), em todas as suas concentrações testadas (0,12 a 8,0 mg/mL).

Expostas aos tratamentos em 48 h de cultivo, três dos ensaios com Anonáceas (Fig. 28a, c e Fig. 30i) apresentaram maior efeito citotóxico (0,25 a 2 mg/mL) quando comparados ao quimioterápico, mesmo em sua maior concentração (8,0 mg/mL).

Após 72 h, duas Anonáceas (Fig. 28c e 30i) exibiram 100% de inibição da proliferação celular em todas as concentrações testadas (0,25 – 2,0 mg/mL), o que não ocorreu com o quimioterápico mesmo em sua maior concentração (8,0 mg/mL). Estes resultados mostram o forte efeito anti-tumoral dos extratos das plantas testadas sobre células hepáticas HepG2.

5-FLU (Fig. 31) é um potente anti-neoplásico que atua na via de biossíntese de pirimidinas. Inibidor da enzima timidilato sintase, promove um desequilíbrio intracelular de nucleotídeos, induzindo a incorporação de fluoronucleotídeos afetando, portanto, a síntese e reparação de DNA e os eventos pós-transcricionais (LONGLEY et. al., 2003; SHAABAN et. al., 2014; TAN et. al., 2014a).

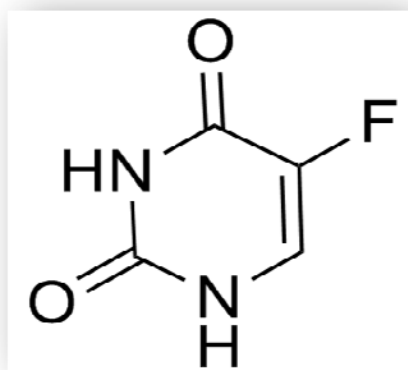


Figura 31 – Estrutura química do 5-Fluoruracil.

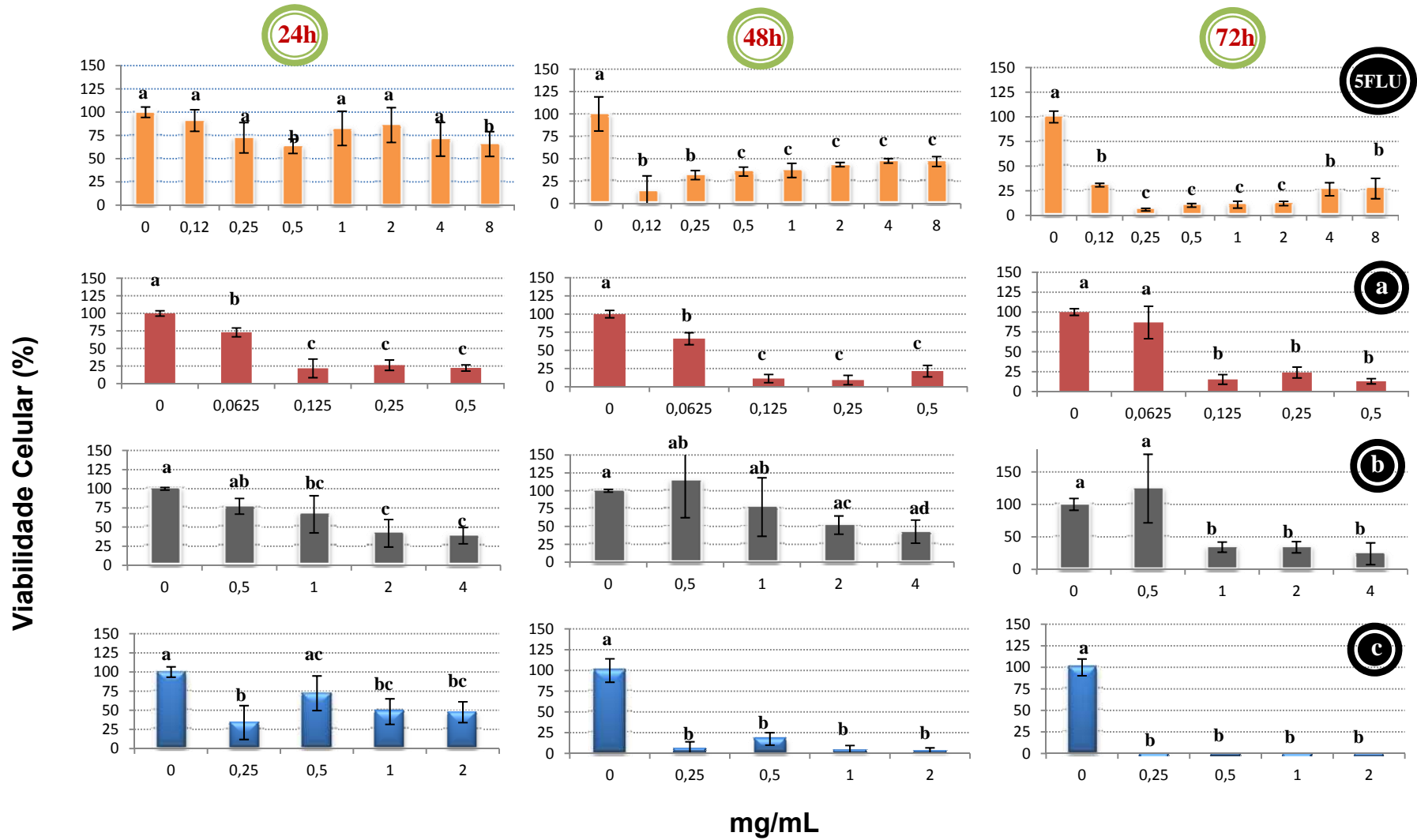


Figura 28 – Efeito do quimioterápico 5-Fluoruracil (5FLU) e dos extratos de folhas de diferentes Anonáceas (a, b, c) sobre a viabilidade de células HepG2 (1×10^4 células em placas de 96 poços), em cultivos a 37°C e 5% de CO₂. Concentrações específicas (mg/mL) de cada extrato foram analisadas em relação ao controle (0 mg/mL), no período de 24, 48 e 72 h, pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro. Os dados são de experimentos conduzidos em quintuplicatas, e barras com letras iguais não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$) pelo teste Tukey.

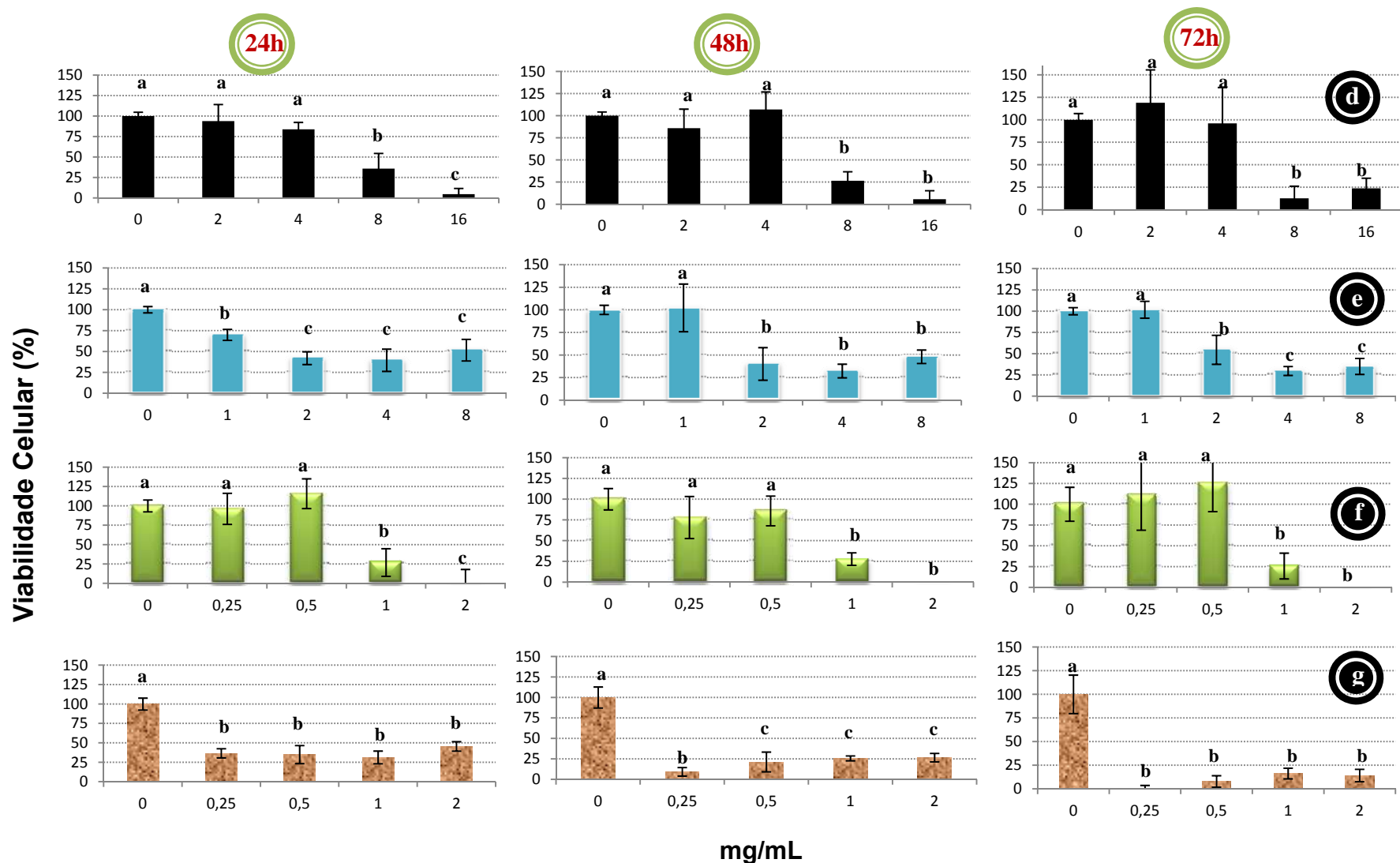


Figura 29 – Efeito dos extratos de folhas de diferentes Anonáceas (d, e, f, g) sobre a viabilidade de células HepG2 (1×10^4 células em placas de 96 poços), em cultivos a 37°C e 5% de CO_2 . Concentrações específicas (mg/mL) de cada extrato foram analisadas em relação ao controle (0 mg/mL), no período de 24, 48 e 72 h, pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro. Os dados são de experimentos conduzidos em quintuplicatas, e barras com letras iguais não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$) pelo teste Tukey.

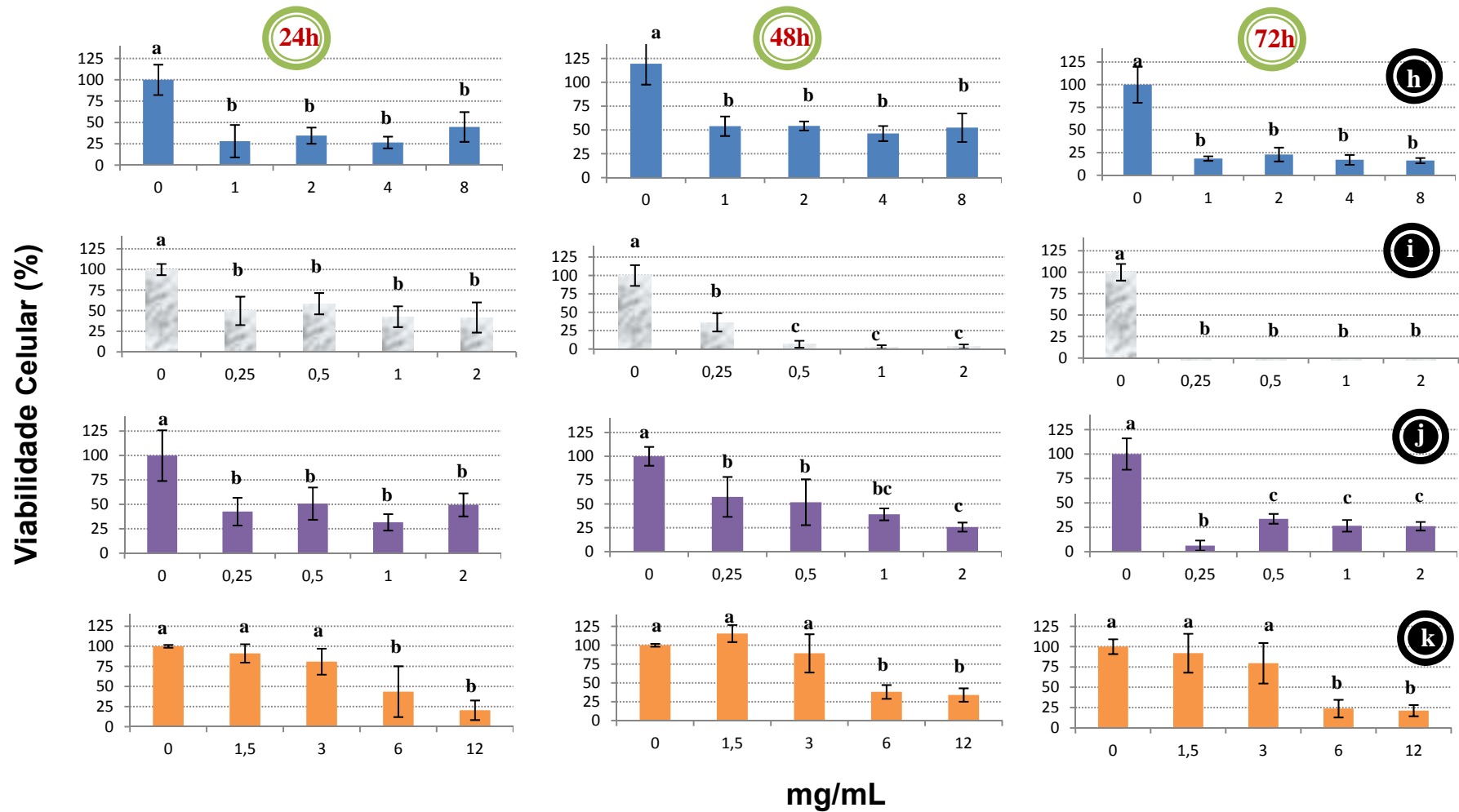


Figura 30 – Efeito dos extratos de folhas de diferentes Anonáceas (h, i, j, k) sobre a viabilidade de células HepG2 (1×10^4 células em placas de 96 poços), em cultivos a 37°C e 5% de CO_2 . Concentrações específicas (mg/mL) de cada extrato foram analisadas em relação ao controle (0 mg/mL), no período de 24, 48 e 72 h, pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro. Os dados são de experimentos conduzidos em quintuplicatas, e barras com letras iguais não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$) pelo teste Tukey.

Como o quimioterápico 5-Fluoruracil (5-FLU) possui um mecanismo de ação antimetabólico com efeito tardio, as células HepG2 ainda se mantêm viáveis por um tempo com seus estoques metabólicos, inclusive o glicogênio, o que permite a sobrevivência e retomada posterior na proliferação mitótica. As menores concentrações de 5-FLU foram as mais citotóxicas. Doses elevadas foram menos efetivas e ainda promoveram as divisões celulares (Fig. 28). 5-FLU eleva a expressão da timidilato sintase (seu próprio alvo inibitório), enzima responsável pela síntese de timidina monofosfato a partir da uridina monofosfato, passo importante na formação de DNA. Isto ocorre como resultado da inibição de um mecanismo *feedback* negativo em que a enzima timidilato sintase (TS) liga-se ao seu RNAm genitor e impede a tradução regulando sua concentração intracelular. Mas ligada ao 5-FLU, a enzima TS não é capaz de ligar ao (seu próprio) RNAm resultando em um aumento transcricional na expressão da enzima e a retomada das atividades de replicação genética e divisões celulares (LONGLEY et. al., 2003). Estes resultados são uma nítida evidência da quimiorresistência características do tumor hepático. Nenhum dos extratos foliares de Anonáceas testados exibiu resultado semelhante, isto é, não houve retomada do crescimento celular em quaisquer concentrações utilizadas durante os cultivos com as células tumorais (Fig. 28 a 30).

As Anonáceas (c), (h) e (j) foram coletadas em regiões e ambientes distintos (planta **c**: Barbacena-MG; planta **h**: Viçosa-MG/zona rural; planta **j**: Viçosa-MG/área urbana) e, embora pertençam à mesma espécie, apresentaram efeitos citotóxicos diferenciados (Fig. 31). Expostas a mudanças estacionais, fatores climáticos e ecológicos, as Anonáceas podem apresentar alterações na fisiologia da planta, no metabolismo secundário e na biodisponibilidade de seus metabólitos (CHACÓN et. al., 2013; MOORE et. al., 2014; MORENO et. al., 2013; VASQUEZ et. al., 2014).

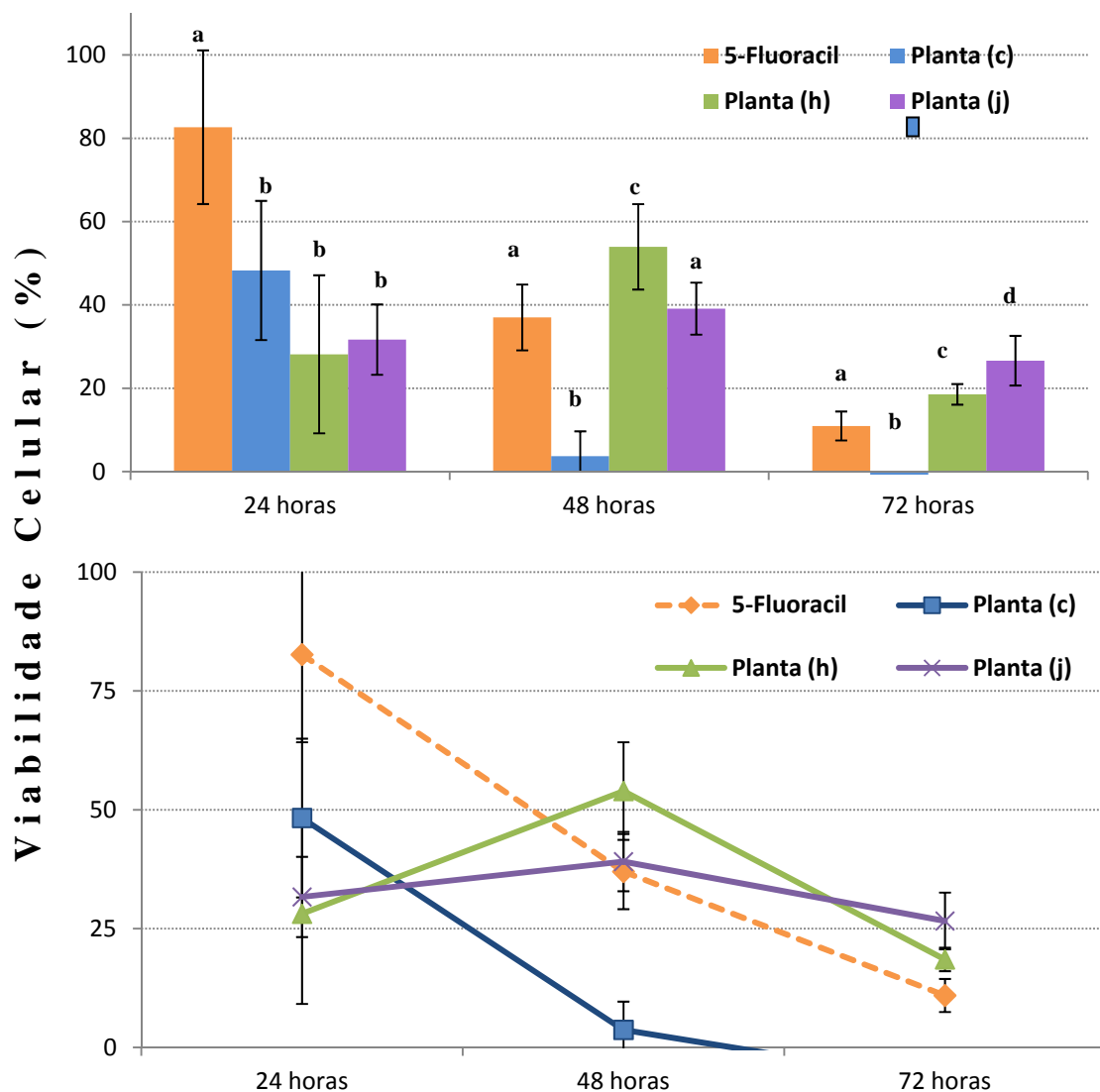


Figura 31 – Efeito comparativo entre o quimioterápico 5-Fluoruracil e os extratos foliares de três Anonáceas da mesma espécie (c, h, j), coletadas em locais e regiões distintas, sobre a viabilidade de células HepG2 (1×10^4 células em placas de 96 poços), em cultivos a 37°C e 5% de CO_2 , na concentração específica de 1mg/mL . Os dados são de experimentos conduzidos em quintuplicatas, e barras com letras comuns não diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$) pelo teste Tukey.

As Figuras 32 a 35 apresentam células HepG2 cultivadas em meio contendo a concentração citotóxica de todos os extratos foliares de Anonáceas, incluindo o quimioterápico 5-Fluoruracil.

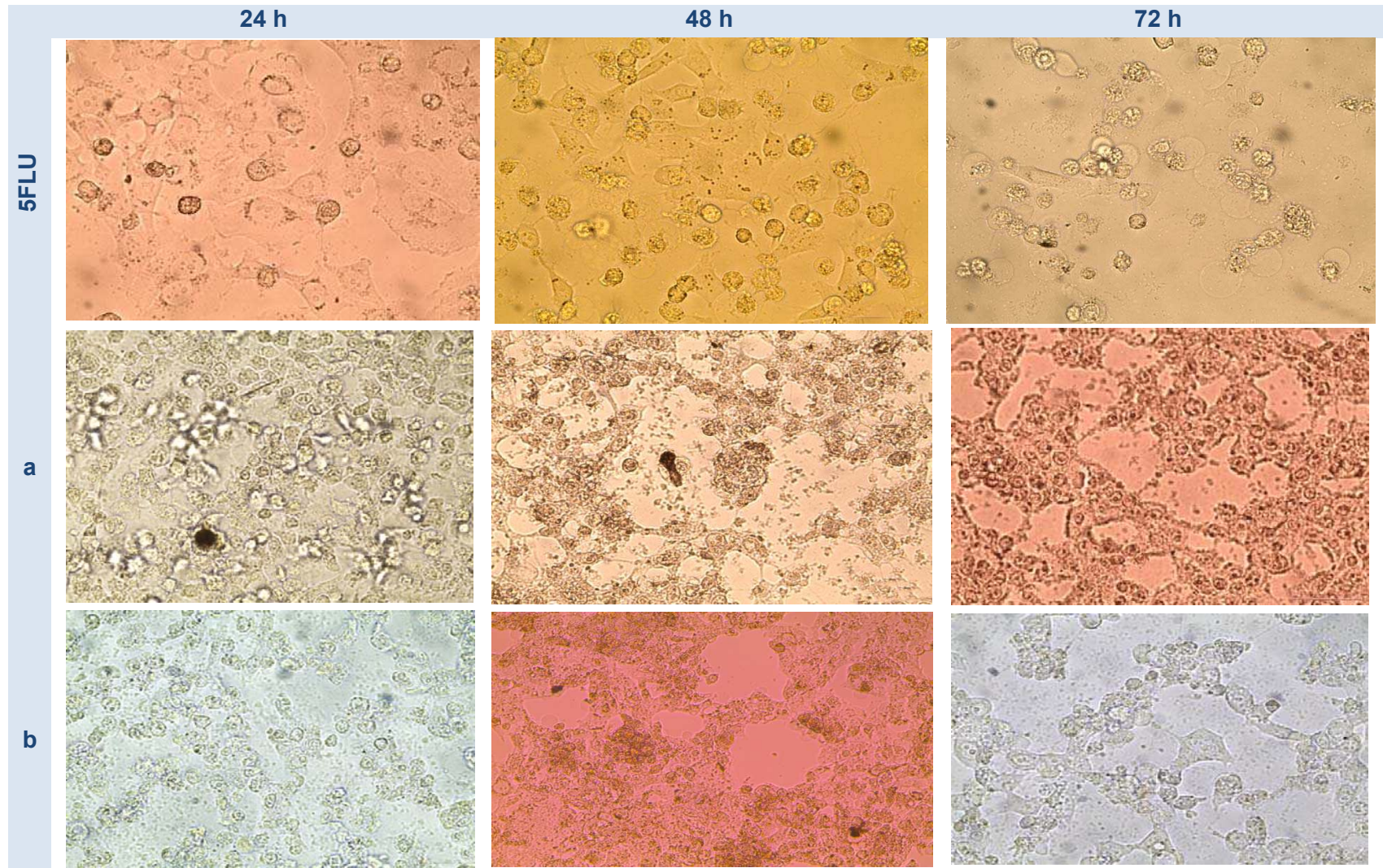


Figura 32 – Células hepatocarcinogênicas HepG2 cultivadas por 72 h em meio contendo concentração citotóxica do quimioterápico 5-Fluoruracil (5FLU: 8,0 mg/mL) e de extratos foliares de Anonáceas (a: 7,0 mg/mL; b: 4,0 mg/mL). Aumento de 200x.

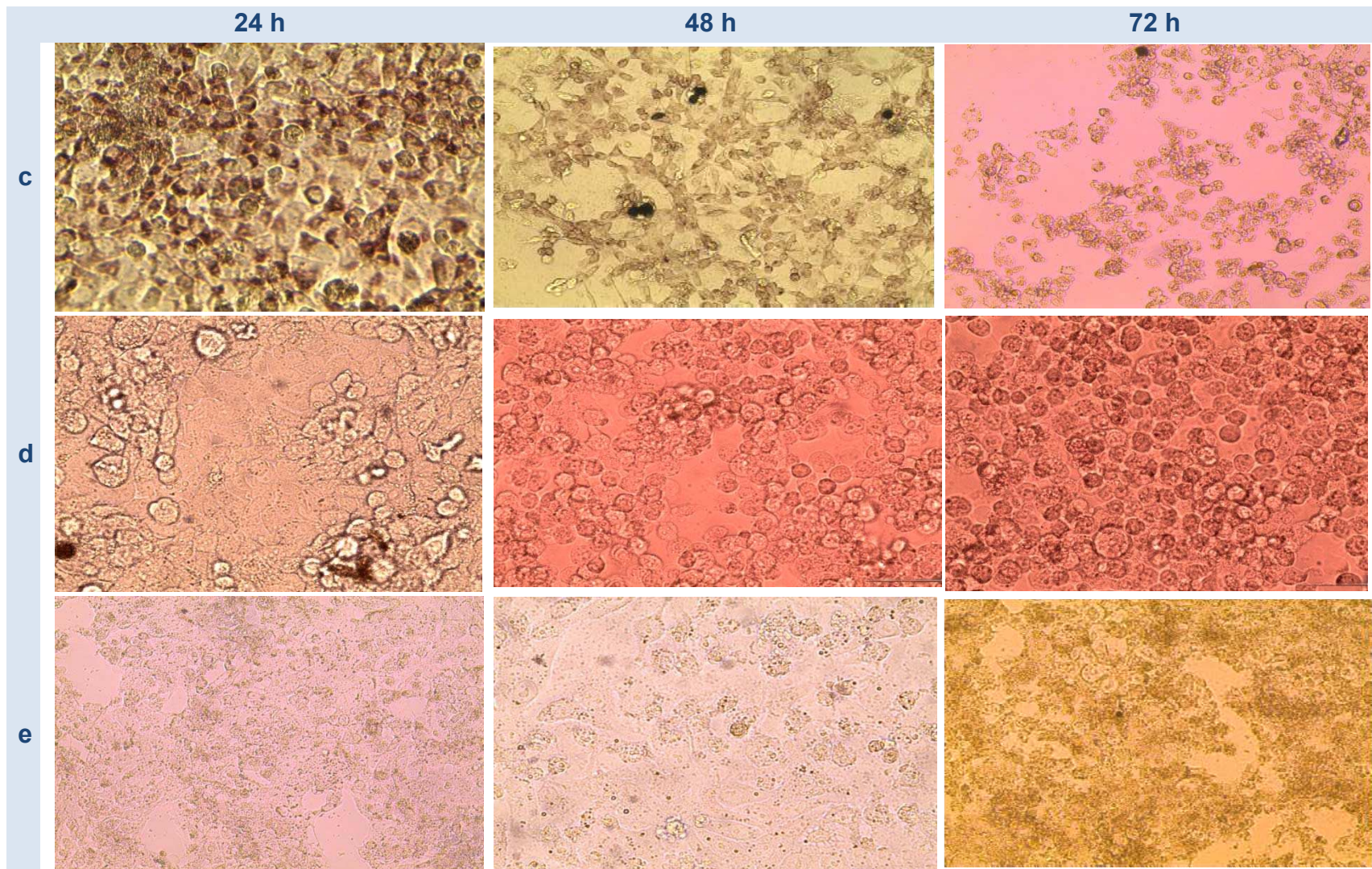


Figura 33 – Células hepatocarcinogênicas HepG2 cultivadas por 72 h em meio contendo concentração citotóxica de extratos foliares de Anonáceas (c: 3,0 mg/mL; d: 16,0 mg/mL; e: 6,0 mg/mL). Aumento de 200x.

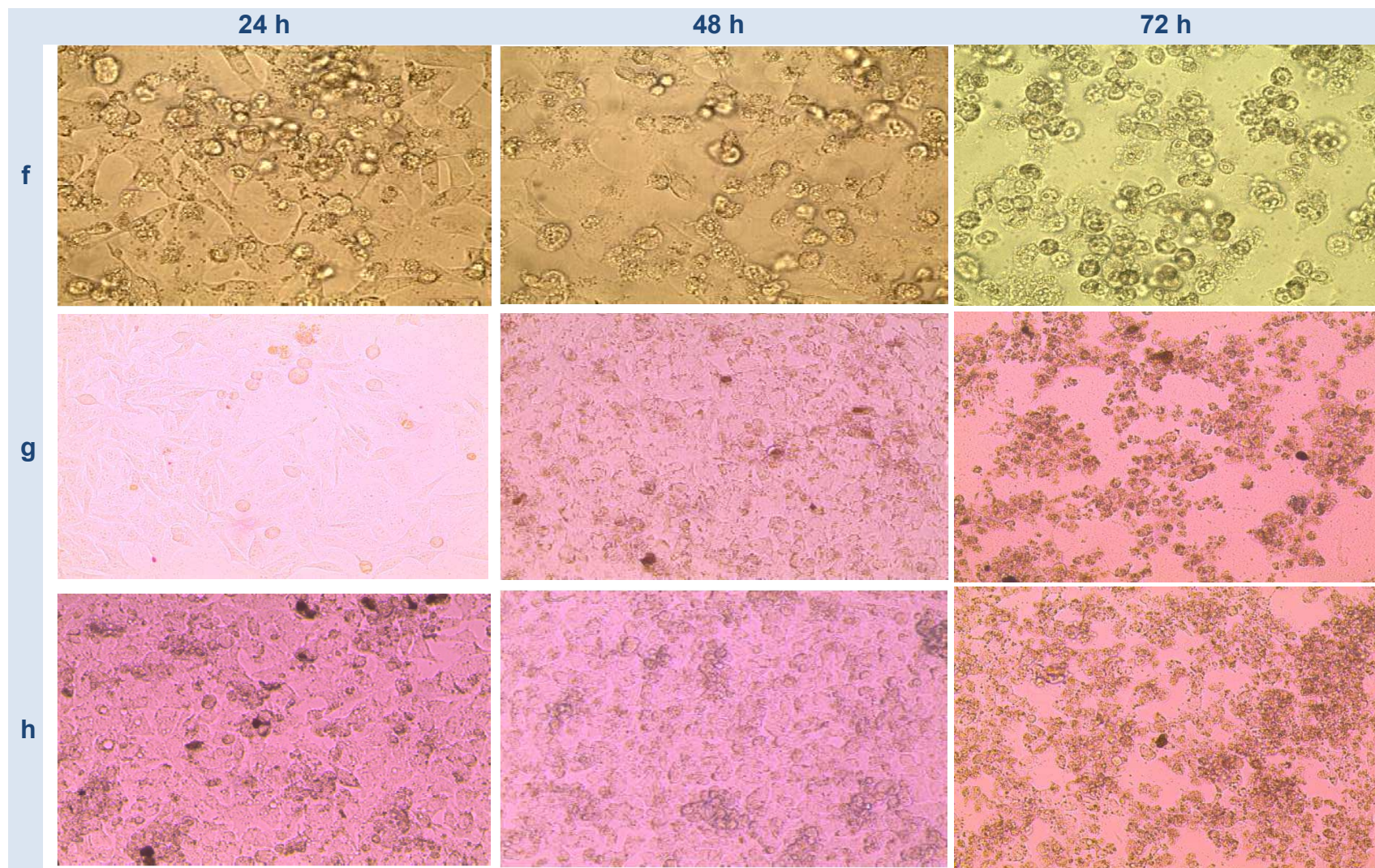


Figura 34 – Células hepatocarcinogênicas HepG2 cultivadas por 72 h em meio contendo concentração citotóxica de extratos foliares de Anonáceas (f: 6,0 mg/mL; g: 6,0 mg/mL; h: 6,0 mg/mL). Aumento de 200x.

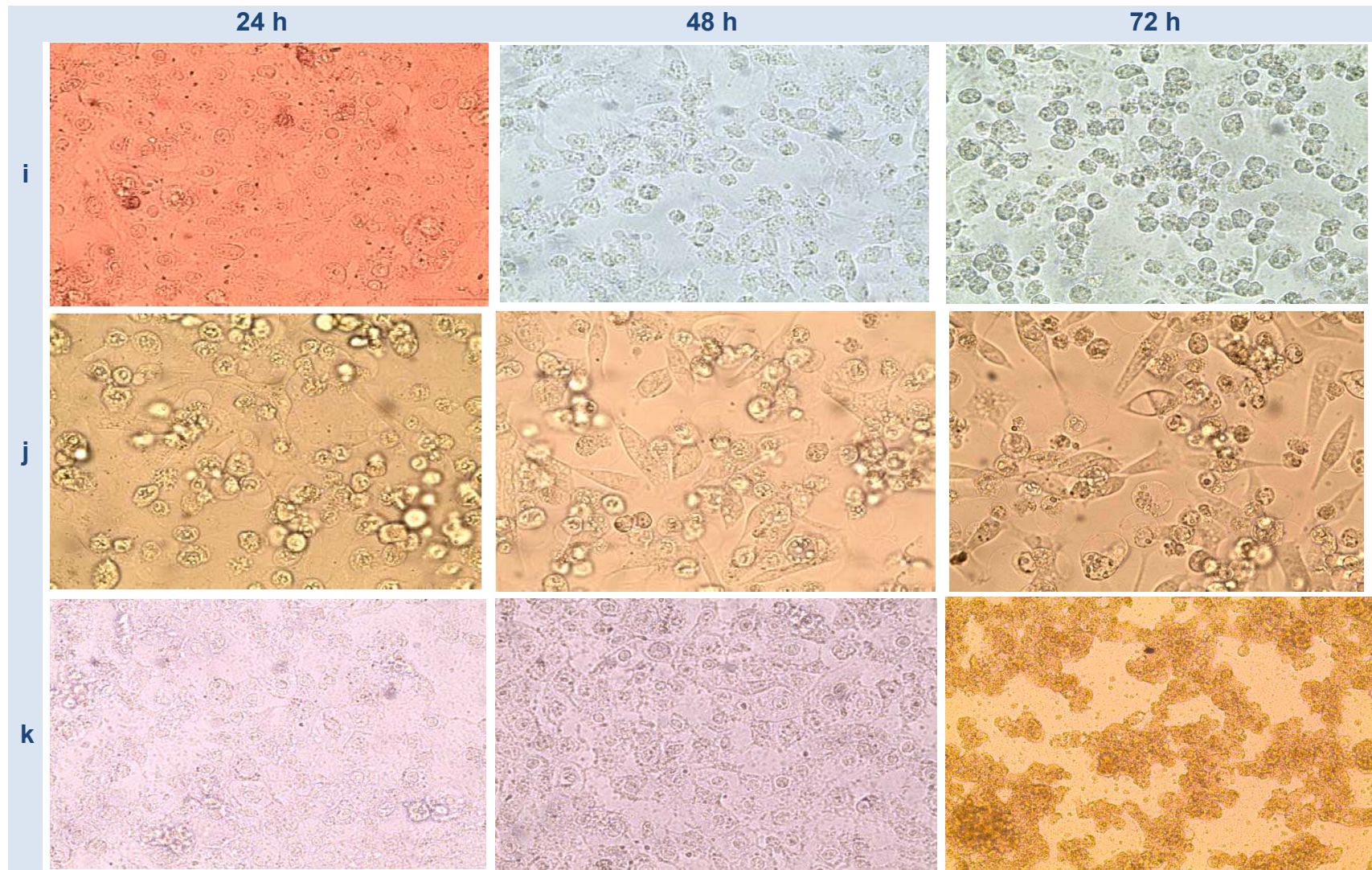


Figura 35 – Células hepatocarcinogênicas HepG2 cultivadas por 72 h em meio contendo concentração citotóxica de extratos foliares de Anonáceas (i: 8,0 mg/mL; j: 3,0 mg/mL; k: 4,0 mg/mL). Aumento de 200x.

5.3. Efeito dos extratos no fluxo iônico celular

O efeito dos extratos foliares de Anonáceas e do quimioterápico 5-Fluoruracil, em doses letais e doses não citotóxicas (Fig. 36), sobre a dinâmica química, foi avaliado e os dados obtidos através da Espectrometria de Emissão Atômica (ICP-OES Optima 8300 - WinLab-32^R Software ICP) são apresentados nas Fig. 37 e 38.

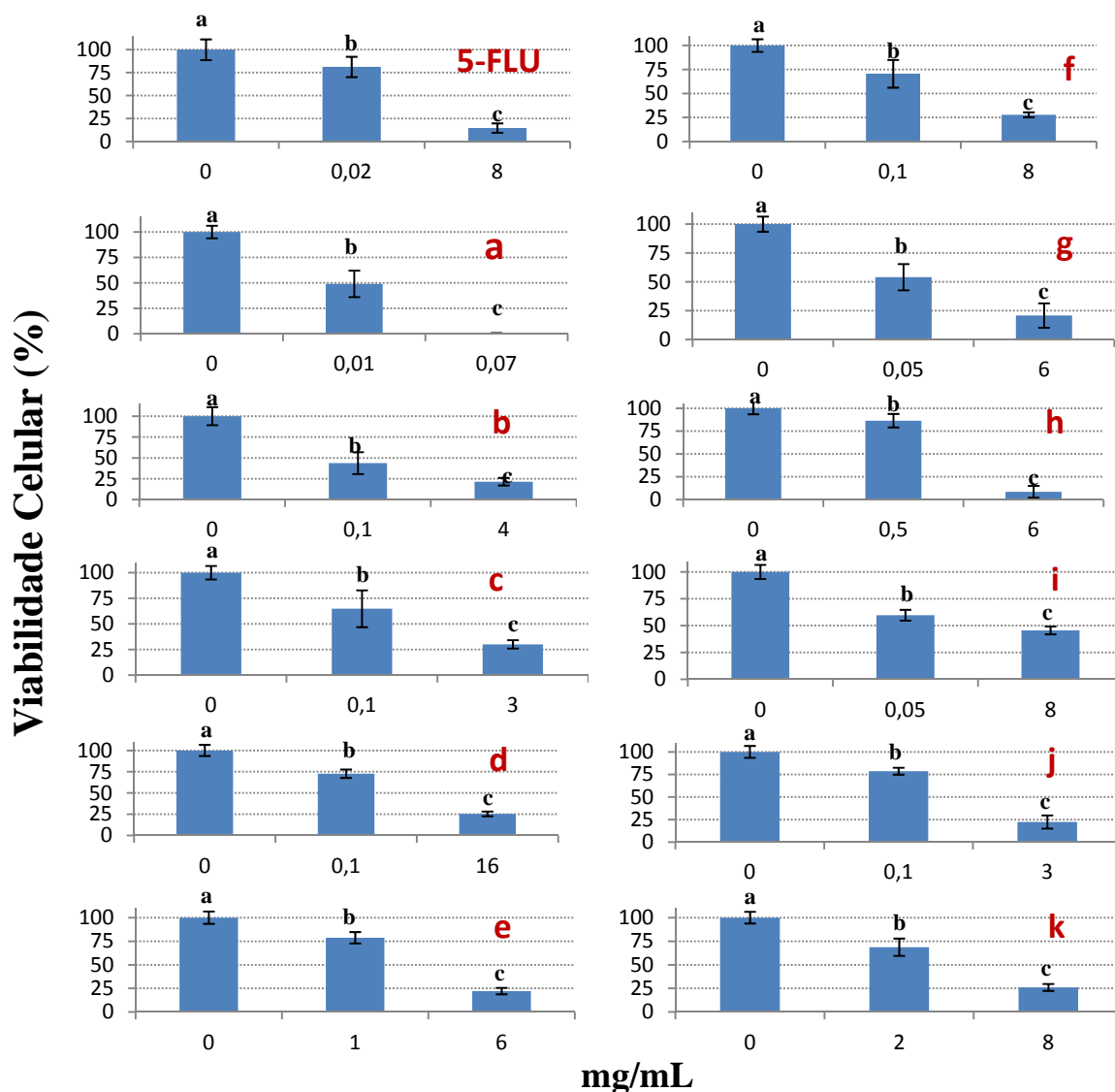


Figura 36 – Cultivo de células HepG2 (10^5 células em placas de 12 poços) sob duas concentrações (mg/mL) do quimioterápico 5-Fluoruracil (5-FLU) e dos extratos de folhas de diferentes Anonáceas (a - k), e controle (0 mg/mL), a 37°C e 5% de CO₂, no período de 48 h. Viabilidade celular (%) avaliada pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro. Os dados são de experimentos conduzidos em quintuplicatas, e barras com letras comuns não diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$) pelo teste Tukey.

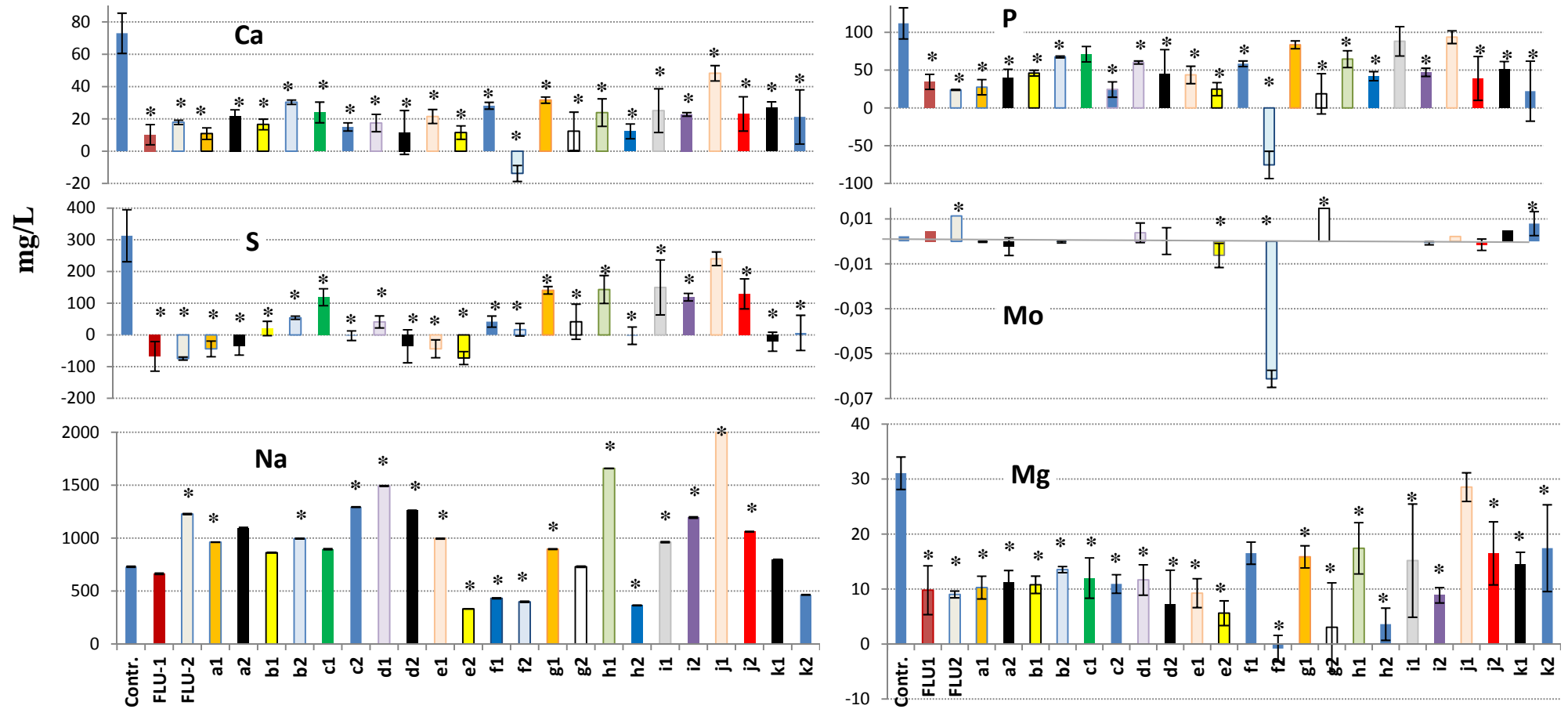


Figura 37 – Concentrações intracelulares (mg/mL) de espécies químicas (Ca, P, K, Na, S, Mg) em células HepG2 expostas a concentrações levemente inibitórias ($_1$) e doses letais ($_2$) do quimioterápico 5-Fluoruracil (FLU) e dos extratos foliares de Anonáceas (a1 a k2). Em mg/mL: Flu-1: 0,02; Flu-2: 8,0; a1: 0,02; a2: 7,0; b1: 0,02; b2: 4,0; c1: 0,1; c2: 3,0; d1: 0,1; d2: 16,0; e1: 1,0; e2: 6,0; f1: 0,1; f2: 6,0; g1: 0,05; g2: 6,0; h1: 0,5; h2: 6,0; i1: 0,05; i2: 8,0; j1: 0,1; j2: 3,0; k1: 0,2; k2: 4,0. Os dados são de experimentos conduzidos em quintuplicatas; (*) significância em relação ao controle (cont.): $p \leq 0,05$. Anova - teste Tukey.

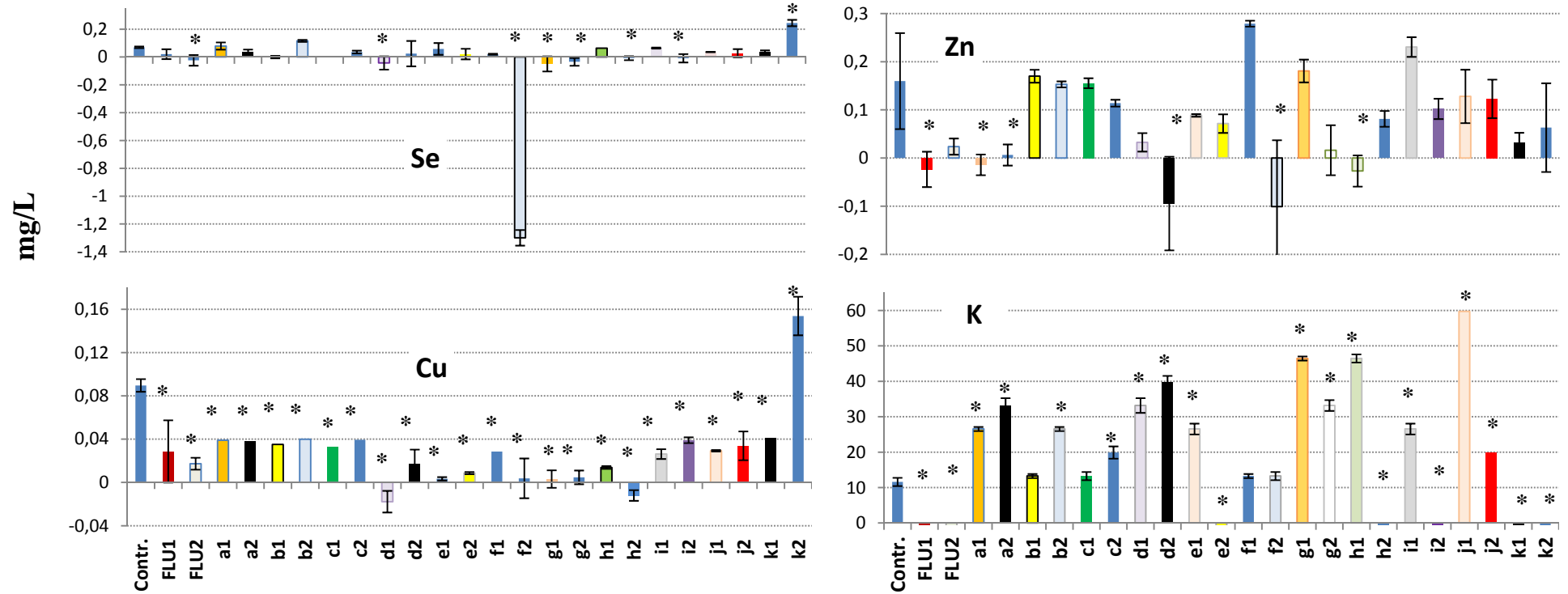


Figura 38 – Concentrações intracelulares (mg/L) de espécies químicas (Se, Cu, Cr, Zn, Mo) em células HepG2 expostas a concentrações não inibitórias (_1) e letais (_2) do quimioterápico 5-Fluoruracil (FLU) e dos extratos foliares de Anonáceas (a1 a k2). Em mg/mL: Flu-1: 0,02; Flu-2: 8,0; a1: 0,02; a2: 7,0; b1: 0,02; b2: 4,0; c1: 0,1; c2: 3,0; d1: 0,1; d2: 16,0; e1: 1,0; e2: 6,0; f1: 0,1; f2: 6,0; g1: 0,05; g2: 6,0; h1: 0,5; h2: 6,0; i1: 0,05; i2: 8,0; j1: 0,1; j2: 3,0; k1: 0,2; k2: 4,0. Os dados são de experimentos conduzidos em quintuplicatas; (*) significância em relação ao controle (contr.): $p \leq 0,05$. Anova - teste Tukey.

Os extratos vegetais, mesmo acrescentando nutrientes aos meios de cultura, interferiram na absorção celular de praticamente todos os íons analisados em relação ao controle e, exceto para **Na** e **K**, houve redução intracelular de todos os íons, incluindo os ensaios com o quimioterápico 5-FLU (Fig. 37 e 38). A alteração no equilíbrio químico justifica a baixa viabilidade das células HepG2 expostas aos extratos foliares e ao quimioterápico, indício da necessidade celular tumoral a estes íons, essenciais na manutenção de uma fisiologia de sobrevivência, mesmo na presença de dosagens não citotóxicas, mas interferentes metabolicamente. De modo geral, não houve um padrão no efeito sobre os íons em relação às doses citotóxicas e não citotóxicas entre as diversas espécies químicas, isto é, as células tumorais expostas aos extratos foliares e ao 5-FLU não exibiram efeito dose-dependente específico de inibição, depleção ou aumento no fluxo iônico em função da espécie ou gênero utilizados nos ensaios.

Como verificado também nos testes de viabilidade celular, Anonáceas que pertencem à mesma espécie (c, h, j), coletadas em regiões distintas (Viçosa-MG; Barbacena-MG) ou, por outro lado, espécies diferentes (d/k; a/f; h/i) coletadas na mesma área (Manaus-AM; Rio Verde-GO, Viçosa-MG), exibiram efeitos diferenciados entre si em pelo menos um dos íons, como mais claramente observado para **P**, **Ca**, **Cu**, **Na**, **K**.

Vários tratamentos exibiram depleção intracelular significativa para **Ca** (Fig. 37_f2), **S** (Fig. 37_FLU; a; c2; d; e1; k), **Zn** (Fig. 37_FLU1; a1; d2; f2; h1), **Se** (Fig. 38_a1; d1; f2; g2; h2; i2), **Cu** (Fig. 38_d1; h2). Ativação da via apoptótica pode estar relacionada com decréscimo nos níveis intracelulares de **Zn** (TAPIERO, TIEW, 2003). Haveria uma ação bloqueadora dos extratos sobre canais transmembrana destes íons específicos, interferência nas vias bioquímicas de recrutamento de proteínas que os constituem ou redução na expressão de genes relacionados?

Ca é um íon de sinalização universal e seus níveis intracelulares regulados atenuam os efeitos apoptóticos de espécies reativas de oxigênio (BARTLETT et. al., 2014; BINGHAM et. al., 2014). Todos os tratamentos exibiram redução na absorção deste íon, o que reflete na viabilidade celular reduzida das células tumorais aos tratamentos (Fig. 37 e 38). Por outro lado, a

resistência à apoptose pode ocorrer pela intensificação no influxo de **K⁺**, em células tumorais (AMICO et. al., 2013), inclusive em células HepG2 (FREISE et. al., 2013), como verificado para alguns tratamentos (e discutidos mais adiante).

Níveis citotóxicos de **Se**, associado a enzimas serina-treonina fosfatases, podem induzir apoptose em células HepG2 (CELIK et. al., 2007), o que não foi observado mesmo com adição dos extratos no meio de cultura em nenhum dos tratamentos, quando comparados ao controle (Fig. 38).

Os níveis intracelulares de **Fe** ficaram abaixo do limiar de detecção espectrométrica. Como há uma relação inversa para o fluxo de **Cu** e **Fe** em células HepG2, modulado a nível de transportador transmembrana (ARREDONDO et. al., 2008), a deficiência de **Fe** (na formulação original do meio de cultura) pode ter provocado o acúmulo intracelular de **Cu** no cultivo tratado com a anonácea (k) em sua concentração letal (Fig. 38_k), íon essencial na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase.

A anonácea (f) promoveu uma resposta diferenciada: além de reduzir a absorção ou depleção de alguns íons (**S**, **Na**) induziu também o efluxo de espécies químicas pelas células HepG2 (**Ca**, **Zn** e, mais fortemente, **Mo**, **Se** e **P**). No caso do **S**, a depleção e o efluxo em relação ao controle podem ser devido à perda excessiva de vários compostos sulfurados, alguns dos quais voláteis (MOCHALSKI et. al, 2013) induzidos pelos extratos.

Além do **Fe**, não foram detectados espectrometricamente os níveis de **Cr**, **Cd**, **Co**, **Fe**, **Mn**, **Al**, **Ní** e **Pb** em nenhum dos ensaios (dados não apresentados). Como compõem o grupo de micronutrientes, incluindo **B**, **Cl**, são requeridos pelas plantas em níveis muito baixos e, por isso, mesmo após a adição dos extratos foliares, não atingiram o limiar de leitura nos meios de cultivo metabolizados ou não.

5.4. Efeito dos extratos sobre os marcadores celulares e tumorais

A produção de marcadores químicos pelas células neoplásicas HepG2 foi avaliada a partir do cultivo celular em concentração letal e outra dose fracamente citotóxica (item 5.3) sobre os tratamentos sobre os níveis de glicose, proteínas totais, albumina, lactato desidrogenase (LDH),

aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama-glutamil transpeptidase (γ GT), parâmetros obtidos pelo Analisador de Química Clínica e Turbidimetria HumanStar InVitro. São indicadores celulares que podem auxiliar na compreensão do efeito metabólico dos tratamentos sobre as células tumorais (Fig. 39 e 40).

AST, **ALT**, γ **GT** e **LDH** são enzimas cujas alterações hepáticas em suas concentrações são marcadores clínicos de lesões por serem liberadas pelos hepatócitos quando há danos em membranas celulares afetando sua permeabilidade, enquanto que a síntese normal de **albumina** exclusivamente pelos hepatócitos reflete o metabolismo celular (WORETA, ALQAHTANI, 2014). Nos ensaios realizados, os níveis de γ **GT** (presente na membrana do hepatócito) e **albumina** não se alteraram em relação ao controle, mas **AST** (sintetizado principalmente nas mitocôndrias) e **ALT** (exclusivamente citoplasmático) tiveram seus níveis elevados pelo quimioterápico 5-FLU na concentração citotóxica (8,0 mg/mL), sem afetar, no entanto, **LDH** (Fig. 39 e 40).

Entre os extratos foliares, as Anonáceas (a), (b), (c), (d), (e) e (h) interferiram nos níveis dos marcadores **AST**, **ALT** e **LDH** em relação ao controle, principalmente em suas concentrações citotóxicas, indicando alteração no metabolismo e na integridade celular (Fig. 39).

A absorção de **glicose** pelos hepatócitos foi reduzida na presença do quimioterápico 5-FLU e de vários extratos foliares especialmente em suas concentrações citotóxicas (Fig. 40), o que sugere interferência na via glicolítica ou bloqueio de transportades transmembrana. Este efeito coincide com produção aumentada de **AST**, **ALT** e **LDH** para alguns dos tratamentos (Fig. 39 e 40_Flu2; _a2; _b2; _d2; _h2). O quimioterápico 5-FLU afetou apenas os níveis de **AST**, **ALT** e **glicose**, já que seu efeito metabólico sobre as células HepG2 parece não ser forte nas primeiras 48 h de cultivo [quando a célula ainda conta com um estoque de componentes metabólicos, inclusive o glicogênio], o que pode ser verificado pela produção de **albumina** e **proteínas totais** praticamente inalteradas e também pela viabilidade celular através da técnica do vermelho neutro (Fig. 28 e 37) ou pelas análises citométricas (a seguir).

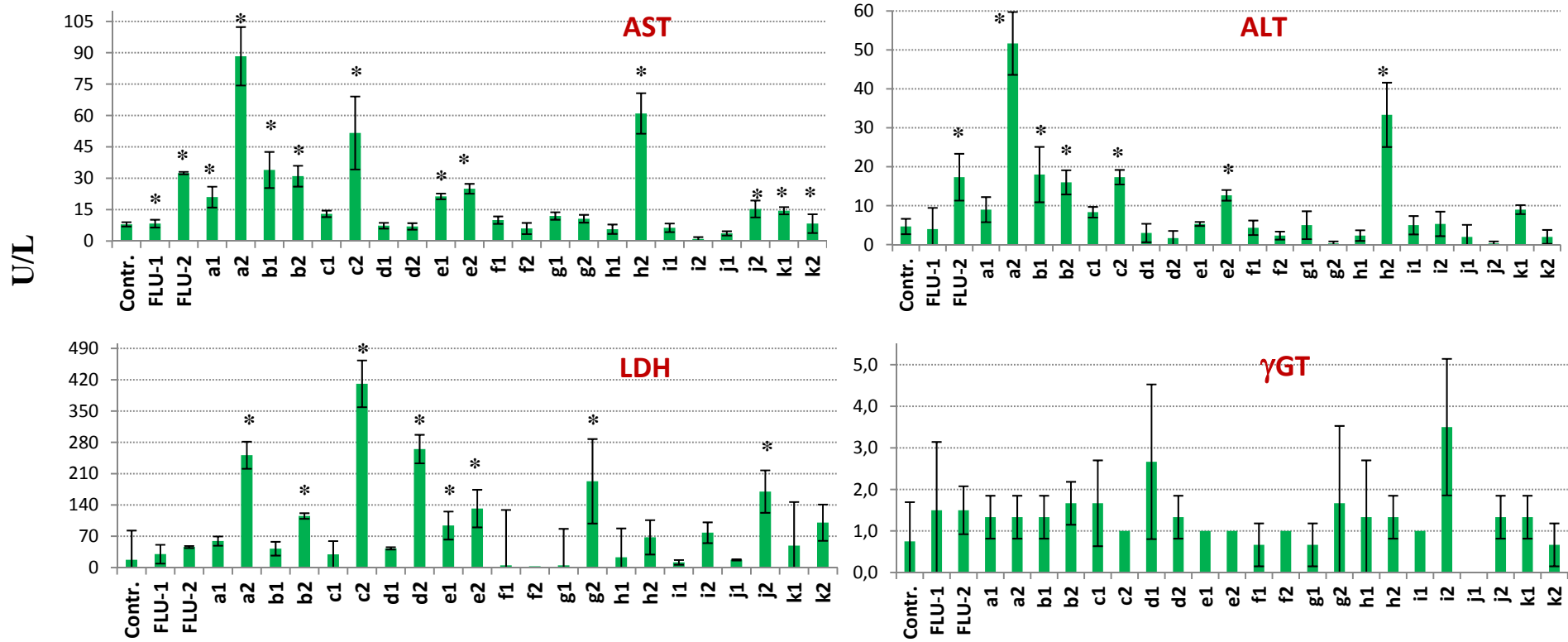


Figura 39 – Concentrações extracelulares (U/L) de marcadores tumorais aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), lactato desidrogenase (LDH) e gama-glutamil transpeptidase (γ GT) analisados em meio de cultivo em que células HepG2 foram expostas a concentrações não inibitórias (_1) e letais (_2) do quimioterápico 5-Fluoruracil (FLU) e dos extratos foliares de Anonáceas (a1 a k2). Em mg/mL: Flu-1: 0,02; Flu-2: 8,0; a1: 0,02; a2: 7,0; b1: 0,02; b2: 4,0; c1: 0,1; c2: 3,0; d1: 0,1; d2: 16,0; e1: 1,0; e2: 6,0; f1: 0,1; f2: 6,0; g1: 0,05; g2: 6,0; h1: 0,5; h2: 6,0; i1: 0,05; i2: 8,0; j1: 0,1; j2: 3,0; k1: 0,2; k2: 4,0. Os dados são de experimentos conduzidos em quintuplicatas; (*) significância em relação ao controle (contr.): $p \leq 0,05$. Anova - teste Tukey.

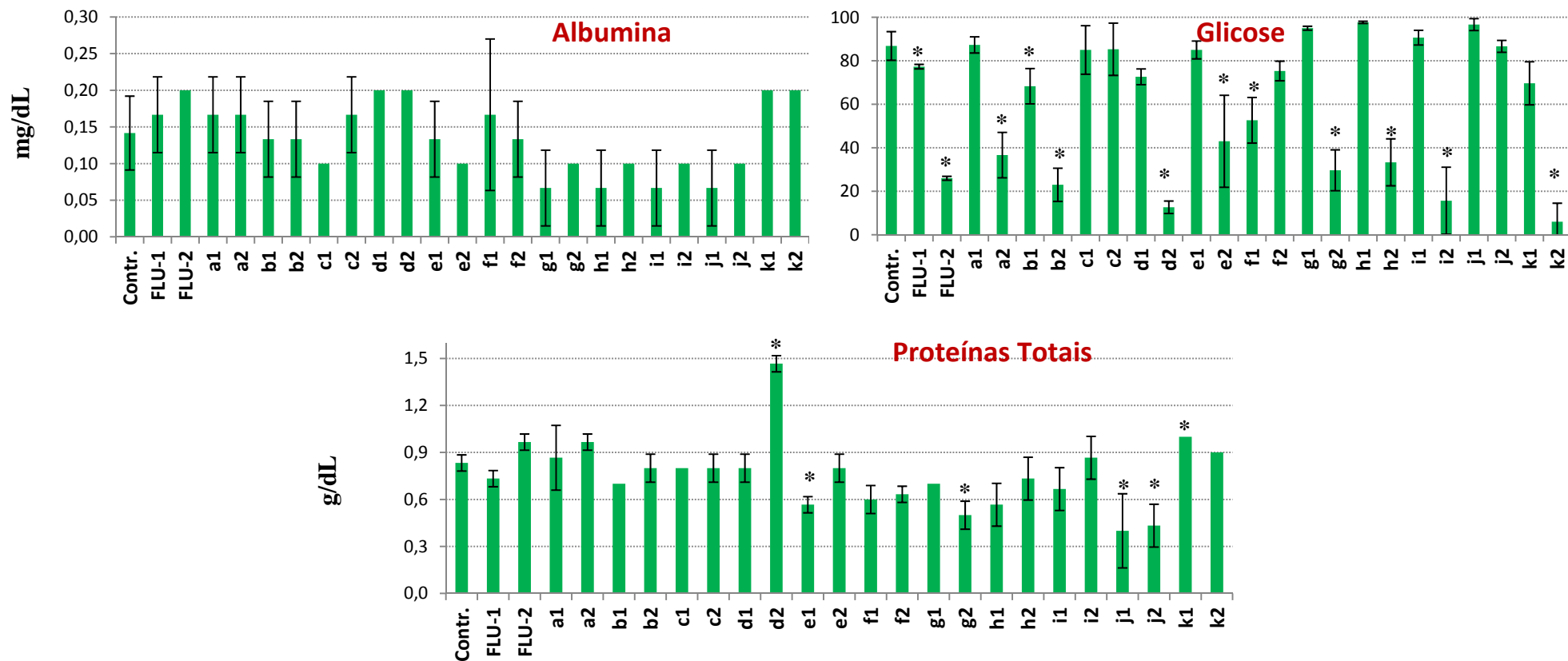


Figura 40 – Concentrações intracelulares de glicose (mg/dL) e níveis extracelulares de albumina (mg/dL) e proteínas totais (g/dL) em meio de cultura de células HepG2 expostas a concentrações não inibitórias ($_1$) e letais ($_2$) do quimioterápico 5-Fluoruracil (FLU) e dos extratos foliares de Anonáceas (a1 a k2). Em mg/mL: Flu-1: 0,02; Flu-2: 8,0; a1: 0,02; a2: 7,0; b1: 0,02; b2: 4,0; c1: 0,1; c2: 3,0; d1: 0,1; d2: 16,0; e1: 1,0; e2: 6,0; f1: 0,1; f2: 6,0; g1: 0,05; g2: 6,0; h1: 0,5; h2: 6,0; i1: 0,05; i2: 8,0; j1: 0,1; j2: 3,0; k1: 0,2; k2: 4,0. Os dados são de experimentos conduzidos em quintuplicatas, (*) significância em relação ao controle (contr.): $p \leq 0,05$. Anova - teste Tukey.

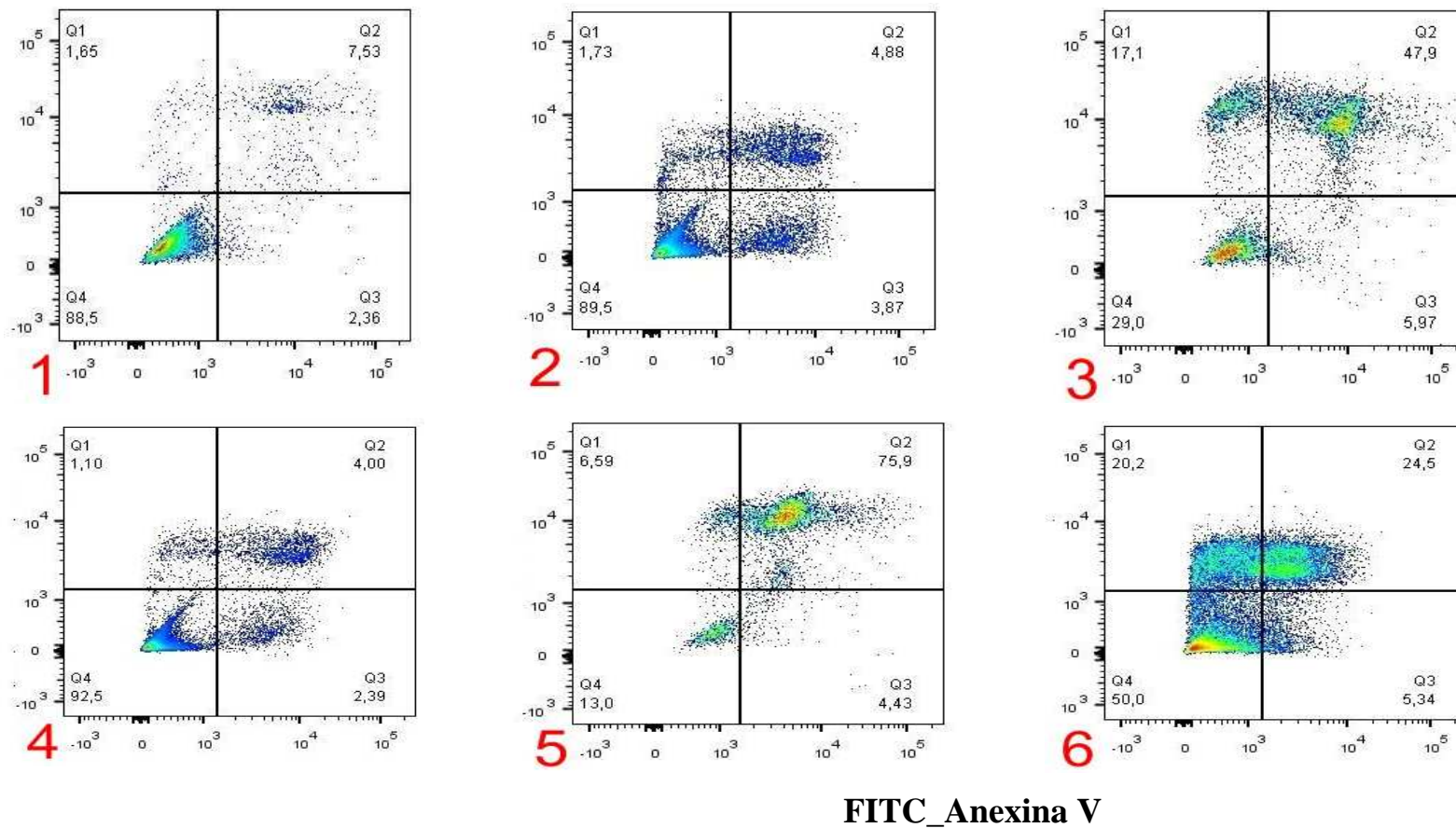
5.5. Efeito do potencial apoptótico das Anonáceas

O potencial efeito apoptótico de alguns dos extratos foliares (Anonáceas b e j) e do quimioterápico 5-FLU sobre as células HepG2 foi avaliado a partir do cultivo celular sob duas concentrações: uma dose letal e outra não citotóxica (item 5.3). O resultado, analisado por citometria de fluxo utilizando os marcadores Iodeto de Propídio x FITC (isotiocianato de fluoresceína), está apresentado na Figura 41.

Através da citometria de fluxo, é possível quantificar células viáveis (FITC_AnexinaV⁻/IP⁻), células em apoptose precoce (FITC_AnexinaV⁺/IP⁻) ou apoptose tardia/necrose (FITC_AnexinaV⁺/IP⁺) ou células necróticas (FITC_AnexinaV⁻/IP⁺). Células HepG2 tratadas por 24 h com o quimioterápico 5-FLU exibem baixos níveis de apoptose inicial (3,87%) ou apoptose tardia/necrose (4,88%), valores que se elevam com 36 h de cultivo (Fig. 41-3). Resultado superior foi obtido quando as células tumorais foram expostas ao extrato foliar da anonácea (j) por 36 horas de cultivo (Fig. 41-5; 75,9 % apoptose/necrose); maior ainda foi a ação da anonácea (b), levando à apoptose/necrose 24,5% das células tumorais já nas 24 h de cultivo. Uma análise comparativa está apresentada na Fig. 42.

A quimiorresistência de células HepG2 aos tratamentos com 5-FLU pode ser devido, por exemplo, a mutações no gene supressor tumoral pró-apoptótico p53 (LONGLEY et. al., 2003; SHAABAN et. al., 2014) ou à intensificação no influxo de K^+ , como observados em vários cultivos. Mas não houve um padrão de resposta aos tratamentos em relação ao **LDH** x **AST** x **ALT** x **Glicose**, isto é, nem todos os extratos foliares que induziram maiores níveis intracelulares de K^+ (Fig. 39_a; _b2; _c2; _d; _e1; _g; _h1; _j) protegeram as células do mecanismo apoptótico, como observado pelos marcadores de integridade celular (principalmente LDH, AST e ALT) e metabólico (glicose).

Iodeto de Propídio (IP)



FITC_Anexina V

Figura 41 – Quantificação do efeito antitumoral de extratos foliares de Anonáceas e do quimioterápico 5-Fluoruracil, após coloração dupla com FITC_AnexinaV conjugada (eixo horizontal) e iodeto de propídeo (eixo vertical) obtido por citometria de fluxo. Células HepG2 foram cultivadas em tratamento-controle (1), tratadas com o quimioterápico 5FLU (8 mg/mL) por 24h (2) e 36h (3), extrato da anonácea (j) (3 mg/mL) por 24h (4) e 36h (5), e anonácea (b) (4 mg/mL) por 24 h (6).

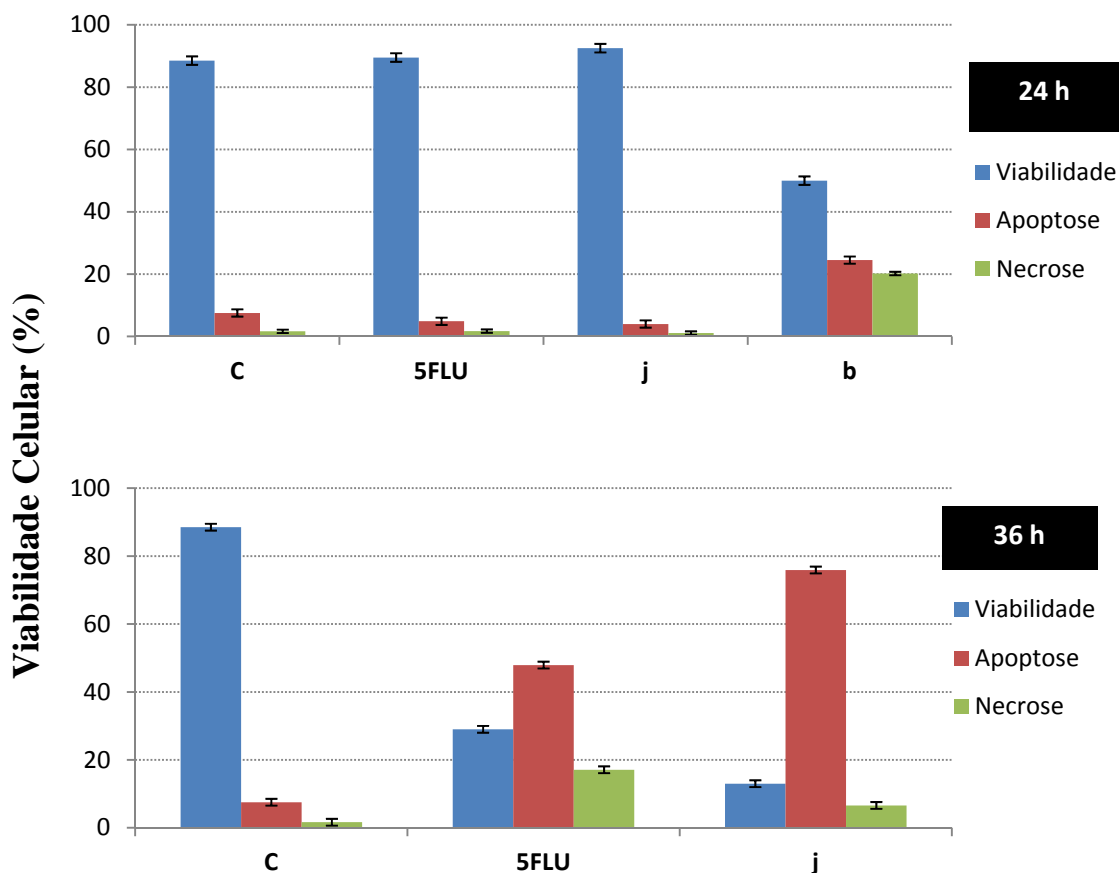


Figura 42 – Comparação da viabilidade celular entre o tratamento-controle (C) e concentrações citotóxicas do quimioterápico 5-FLU dos extratos foliares das Anonáceas (j) e (b), em 24 e 36 h de cultivo de células HepG2, após coloração dupla com FITC-anexina conjugada/iodeto de propídeo obtida por citometria de fluxo.

Nas primeiras 24 h de cultivo, o extrato foliar da anonácea (b) foi mais citotóxico quando comparado ao quimioterápico 5-FLU (Fig. 42) e à outra anonácea (j); 36 h após, observa-se forte efeito apoptótico do extrato da planta (j) quando ainda comparado ao 5-FLU. O efeito apoptótico tardio de 5-FLU (via caspase 3/7) pode ser devido à sua genotoxicidade (MATUO et. al., 2009), mas que permite a célula, ainda, manter-se viável por um tempo (24 h) com seus estoques metabólicos, inclusive o glicogênio, porém, sem divisões mitóticas (já que 5-FLU bloqueia fortemente o ciclo celular em G1/S).

A seguir (Tabela 8), um resumo dos resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 8 – Efeito dose-citotóxica do quimioterápico 5-Fluorouracil (5FLU) e dos extratos foliares das anonáceas (a – k), comparado ao controle, nos níveis intracelulares de espécies químicas (Ca – K), produção de marcadores tumorais aspartato amino-transferase (AST), alanina amino-transferase (ALT), lactato desidrogenase (LDH), gama glutamil-transferase (GGT), albumina (ALB), proteínas totais (PT) e absorção de glicose (GLIC) em células HepG2 (▲: influxo; ▼: depleção; (-) efluxo, (■) parâmetro inalterado, sem diferença quando comparado ao controle).

		E S P É C I E S Q U Í M I C A S								M A R C A D O R E S C E L U L A R E S							
		Ca	S	Na	P	Mo	Mg	Se	Cu	K	AST	ALT	LDH	GGT	ALB	PT	GLIC
	5FLU	▼	(-)	▲	▼	▲	▼	▼	▼	▼	▲	▲	■	■	■	■	▼
A N O N Á C E A S	a	▼	(-)	■	▼	■	▼	■	▼	▲	▲	▲	■	■	■	■	▼
	b	▼	▼	▲	▼	■	▼	■	▼	▲	▲	▲	■	■	■	■	▼
	c	▼	▼	▲	▼	■	▼	■	▼	▲	▲	▲	■	■	■	■	■
	d	▼	(-)	▲	▼	■	▼	■	▼	▲	■	■	▲	■	■	▲	▼
	e	▼	(-)	▼	▼	(-)	▼	■	▼	▼	▲	▲	▲	■	■	■	▼
	f	(-)	▼	▼	(-)	(-)	▼	(-)	▼	■	■	■	■	■	■	■	■
	g	▼	▼	■	▼	■	▼	(-)	▼	▲	■	■	▲	■	■	▼	▼
	h	▼	▼	▼	▼	■	▼	(-)	(-)	▼	▲	▲	■	■	■	■	▼
	i	▼	▼	▲	▼	■	▼	(-)	▼	▼	■	■	■	■	■	■	▼
	j	▼	▼	▲	▼	■	▼	■	▼	▲	▲	■	▲	■	■	▼	■
	k	▼	■	■	▼	▲	▼	▲	▲	▼	▲	■	■	■	■	▲	▼

5.6. Perspectivas

O que mais move a ciência são as perguntas, não as respostas.

- ❖ Pesquisas moleculares associadas ao efeito bioquímico dos extratos de Anonáceas em pontos-chave nos quais atuam na via hepatotumoral são essenciais para a compreensão dos resultados aqui obtidos, principalmente envolvendo células quimiorresistentes durante os cultivos. Que (onco)genes ou vias hepatocarcinogênicas são ativadas em células que sobreviveram após serem expostas aos tratamentos inclusive ao quimioterápico 5-Fluoracil (5-FLU)?
- ❖ Combinar ensaios dos extratos entre si e com o quimioterápico 5-FLU poderia fornecer informações sobre a sinergia e eficácia entre os tratamentos. Qual a melhor dose do quimioterápico associado ao extrato da anonácea que exibiu um melhor efeito citotóxico e que forneceria um resultado inibitório otimizado na proliferação das células neoplásicas?
- ❖ Ensaios *in vitro* com células hepáticas não tumorais são importantes para determinar o Índice de Seletividade (IS) dos extratos das Anonáceas, além de modelos *in vivo*, que poderão estimar as dosagens terapêuticamente ideais. As concentrações experimentais deste trabalho são atóxicas às células normais ou tecidos não neoplásicos?
- ❖ Estudos georreferenciais e ecológicos da região de origem das Anonáceas, ou até dados fisiológicos das plantas incluídas nesta pesquisa, poderiam contribuir para a compreensão dos efeitos variáveis. De que modo a idade da planta ou das folhas e os fatores edafoclimáticos influenciam na bioatividade antitumoral exibida pelas Anonáceas?

- ❖ Da mesma forma, um estudo entre espécimes poderia traçar um perfil de ação bioquímica. Plantas da mesma espécie ou não, ou Anonáceas de gêneros distintos, são bioativamente semelhantes?
- ❖ Investigar outros órgãos vegetais, como caule, casca, raízes, frutos e sementes, e que também podem exibir bioatividade diferencial àquela apresenta pelas folhas.
- ❖ Pesquisar nanopartículas envolvendo compostos químicos isolados de Anonáceas pode amplificar o efeito citotóxico seletivo.
- ❖ Isolar e identificar estrutural e funcionalmente acetogeninas dos extratos de Anonáceas fornecem a perspectiva de ampliar a compreensão científica da bioatividade destas plantas.
- ❖ Comparar o efeito de diferentes agentes anti-neoplásicos e de diferentes linhagens celulares tumorais.

6. CONCLUSÕES

- ❖ Todos os extratos foliares das Anonáceas (9 espécies de 4 gêneros) induzem à morte células hepatocarcinogênicas HepG2 com até 100% de citotoxicidade em 72 h de cultivo, como determinado pelo teste de viabilidade do vermelho neutro.
- ❖ Os efeitos citotóxicos são variáveis entre plantas da mesma espécie e plantas de diferentes gêneros, coletadas em uma mesma área/região geográfica ou não, sendo que não houve um padrão de resultados entre eles.
- ❖ A sensibilidade de células HepG2 aos tratamentos é dependente da concentração dos extratos foliares e do tempo de exposição.
- ❖ Das 11 Anonáceas, 9 exibem efeito citotóxico em doses muito menores (com até 1/8 de concentração) que as utilizadas para antineoplásico 5-Fluoruracil (5-FLU).

- ❖ O efeito na produção dos marcadores tumorais e no fluxo químico durante os cultivos celulares é variável entre os extratos de Anonáceas da mesma espécie ou do mesmo gênero, incluindo o antineoplásico 5-Fluoruracil (5-FLU).
- ❖ Células HepG2, quimiorresistentes ao 5-FLU, apresentam maior citotoxicidade aos extratos foliares de Anonáceas quando comparadas ao antineoplásico.
- ❖ Doses elevadas de 5-FLU (> 4 mg/mL) permitem a re proliferação celular neoplásica após 48 h de cultivo, e mais evidente após 72 h, nítido efeito de quimiorresistência tumoral, o que não foi observado em nenhum dos tratamentos com Anonáceas utilizados nesta pesquisa.
- ❖ Análises em citometria de fluxo confirmam a morte celular por apoptose de dois extratos de Anonáceas e 5-FLU.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABTO, Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. **Registro Brasileiro de Transplantes**, RBT, 10 anos. Análise Qualitativa, Dezembro, 2007, 99 p. Disponível: <<http://www.abto.org.br/abtov02/portugues/populacao/rbt/lista.aspx>>. Acesso em: 27/11/2009.

ABTO, Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. **Registro Brasileiro de Transplantes**, RBT, n. 3, Janeiro-Setembro, 2011, 45 p. Disponível em: <<http://www.abto.org.br/abtov02/portugues/populacao/rbt/lista.aspx>>. Acesso em: 02/02/2012.

ABTO, Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. **Registro Brasileiro de Transplantes**, RBT, Ano XX, n. 1, Janeiro-Março, 2014, 21p. Disponível em: <<http://www.abto.org.br/abtov02/portugues/populacao/rbt/lista.aspx>>. Acesso em: 02/06/2014.

AGARWAL, P.; KABIR, F.M.L.; DEINNOCENTES, P. et. al. Tumor suppressor gene p16/ink4a/cdkn2a and its role in cell cycle exit, differentiation, and determination of cell fate. In: **CHENG, Y.** (Ed.), **Tumor suppressor genes**, cap. 1, p.1-34, 2012. 332p.

AHIDOUCHE, H.O.; HIDOUCHE, A. K⁺ channels and cell cycle progression in tumor cells. **Frontiers in Physiology**, v. 4, p. 1-8, 2013.

AHMED, I.; LOBO, D.N. Malignant tumours of the liver. **Surgery**, v. 25, n. 1, p. 34-41, 2006.

AHAMED, M.; ALI, D.; ALHADLAQ, H.A et al. Nickel oxide nanoparticles exert cytotoxicity via oxidative stress and induce apoptotic response in human liver cells (HepG2). **Chemosphere**, v. 93, p.2514-2522, 2013.

AKL, H.; VERVLOESSEM, T.; KIVILUOTO, S.; BITTREMIEUX, M. et al. A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: Mitochondria versus endoplasmic reticulum. **Biophys. Acta**, 2014, <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.04.017>>

ALALI, F.Q.; LIU, X.; MCLAUGHLIN, J.L. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. **J. Nat. Prod.**, v. 62, p. 504-540, 1999.

ALEKSANDROVA, K.; BOEING, H.; NOTHLINGS, U. Inflammatory and Metabolic Biomarkers and Risk of Liver and Biliary Tract Cancer. **Hepatology**, 2014. <doi: 10.1002/hep.27016>

ALI, M.R.K.; PANIKKANVALAPPIL, S.R.; EL-SAYED, M.A. Enhancing the Efficiency of Gold Nanoparticles Treatment of Cancer by Increasing Their Rate of Endocytosis and Cell Accumulation Using Rifampicin. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 136, p. 4464-4467, 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Global Cancer Facts & Figures 2nd Edition*. Atlanta: American Cancer Society, 60 p., 2014.

AMICO, M.; GASPAROLI, L.; ARCANGELI, Potassium Channels: Novel Emerging Biomarkers and Targets for Therapy in Cancer. **Rec. Pat. AC Drug Disc.**, v. 8, p. 53-65, 2013.

AMINIMOGHADAMFAROUJ, N.; NEMATOLLAHI, A.; WIART, C. Annonaceae: bio-resource for tomorrow's drug discovery, **J. Asian Nat. Prod. Res.**, v. 13, n.05, p. 465-476, 2011.

ANITHA, A.; SREERANGANATHAN, M.; CHENNAZHI, K.P. et al. In vitro combinatorial anticancer effects of 5-fluorouracil and curcumin loaded N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles toward colon cancer and in vivo pharmacokinetic studies. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 45, p. 24-36, 2014.

ANOSA, G.N.; UDEGBUNAM, R.; OKORO, J. In vivo antimalarial activities of *Enantia polycarpa* stem bark against *Plasmodium bergheberghei* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, p. 531-534, 2014.

ARCHETTI, M. Evolutionary dynamics of the Warburg effect: Glycolysis as a collective action problem among cancer cells. **J. Theoretical Biology**, v. 341, p.1-8, 2014.

ARIGONY, A.L.V. The Effectt of Iron on Viability and Genomic Stability of Human Pulmonary Fibroblasts and Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cell Cultures. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 139p. 2013.

ARIGONY, A.L.V.; OLIVEIRA, I.M.; MACHADO, M. et al. The Influence of Micronutrients in Cell Culture: A Reflection on Viability and Genomic Stability. **BioMed Res. Internat.**, v. 12, p. 15-23, 2013.

ARNAL, N.; ALANIZ, M.J.T.; MARRA, C.A. Effect of copper overload on the survival of HepG2 and A-549 human-derived cells. **Human and Experimental Toxicology**, v. 32, n. 3, p. 299-315, 2013.

ARREDONDO, M.; CAMBIAZO, V., TAPIA, L. et. al. Copper overload affects copper and iron metabolism in Hep-G2 cells. **Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol.**, v. 287, p. 27-32, 2004.

ARZUMANYAN, A.; G. P. V. REIS, H.M.G.P.V. REIS.; FEITELSON, M.A. Pathogenic mechanisms in HBV-and HCV-associated hepatocellular carcinoma, **Nature Rev. Cancer**, v. 13, p. 123-136, 2013.

ASHRAFPOUR, M.; BABAEI, J.F.; SAGHIRI, R. Modulation of the hepatocyte rough endoplasmic reticulum single chloride channel by nucleotide–Mg²⁺ interaction. **Eur J Physiol**; v. 464, p. 175-182, 2012.

ASTIRIN, O.P.; ARTANTI, A.N.; FITRIA, M.S. *Annona muricata* Linn Leaf Induce Apoptosis in Cancer Cause Virus. **J. of Cancer Therapy**, v. 4, p. 1244-1250, 2013.

ASTIRIN, O.P.; PRAYITNO, A.; ARTANTI, A.N. et al. The expression of p53 and hsp70 proteins after treatment with *Annona muricata* Linn leaf for activating apoptotic and lead to homeostasis program of Raji cells. **Int. J. Cancer Ther Oncol.**, v. 2, n. 2, p. 20-28, 2014.

ATCC[®], The Global Bioresource Center™. <<https://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx>>. Acesso em 25 Junho 2014.

BARTLETT, P.J.; GASPERS, L.D.; PIEROBON, N. et al. Calcium-dependent regulation of glucose homeostasis in the liver. **Cell Calcium**, 2014. dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2014.02.007

BARRECA, D.V.; LLAGANÀ, G.; FICARRA, S. et al. Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). **Food Res. Int.**, v. 44, p. 2302-2310, 2011.

BAUMERT, T.F.; MEREDITH, L.; NI, Y.; FELMLEE, D.J. et al. Entry of hepatitis B and C viruses - recent progress and future impact. **Current Opinion in Virology**, v. 4, p. 58-65, 2014.

BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M.C. et. al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Nat. Prod. Rep.**, v. 22, n. 2, p. 269-303, 2005.

BERTRAM, J.S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 21, p. 167-223, 2001.

BIBA, V. S.; AMILY, A.; SANGEETHA S. et. al. Anticancer, antioxidant and antimicrobial activity of *Annonaceae* family. **World J. Pharm. Sc.**, v. 3, n. 3, p. 1595-1604, 2014.

BINGHAM, P.M.; STUART, S.D.; ZACHAR, Z. Cancer Metabolism: A Nexus of Matter, Energy, and Reactive Oxygen Species. **Cancer Drug Discovery and Development**, p. 7-27, 2014.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays. **J. Tissue Cult. Methods**, v. 9, p. 7-9, 1984.

BORTNER, C.D.; CIDLOWSKI, J.A. Ion channels and apoptosis in cancer. **Phil. Trans. R. Soc.**, v. 369, p. 1-10, 2014.

BRASIL. Mortalidade por doenças crônicas no Brasil: situação em 2009 e tendências de 1991 a 2009. In: _____ **Saude Brasil 2010: uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília-DF. Cap. 5, p. 117-134, 2011.

BRITTEN, C.; GOMES, A.S.; WAINBERG, Z.A. et. al. Transarterial chemo-embolization plus or minus intravenous bevacizumab in the treatment of hepatocellular cancer: a pilot study. **BMC Cancer**, v. 12, n. 16, p. 1-25, 2012.

BRUIX, J.; GORES, G.J.; MAZZAFERRO, V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. **Gut**, v. 63, p. 844-855, 2014.

BYRNE, S.L.; KRISHNAMURTHY, D.; RESNICK, M.W. Pharmacology of Iron Transport. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 53, 2013. <doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134648>

CAMMÀ, C.; CABIBBO, G.; PETTA, S. et. al. Cost-effectiveness of Sorafenib treatment in field practice for patients with hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 57, n. 3, 2013.

CANTWELL, M.M. The role of diet in cancer development and prevention. **Curr. Nutr. Rep.** v. 38, n. 51, p. 192-200, 2012.

CAPIOD, T. The Need for Calcium Channels in Cell Proliferation. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 8, n. 1, p. 4-17, 2013.

CEFARATTI, C.; ROMANI, A. Modulation of Na⁺/Mg²⁺ exchanger stoichiometry ratio by Cl⁻ ions in basolateral rat liver plasma membrane vesicles. **Mol. Cell Biochem.**, v. 351, p. 133-142, 2011.

CELIK, H.A.K.; KIRCELLI, F.; SAYDAM, G. et. al. Potential involvement of serine/threonine protein phosphatases in apoptosis of HepG2 cells during selenite treatment. **Biol. Trace Element Res.**, v. 117, p. 65-76, 1-3, 2007.

CHACÓN, I.C., SALDAÑA, C.A.R.; ESQUINCA, A.R.G. Secondary metabolites during early development in plants. **Phytochem Rev.**, v. 12, p. 47-64, 2013.

CHAMPY, P.; GUÉRINEAU, V.; LAPRÉVOTE, O. Maldil-Tof MS profiling of annonaceous acetogenins in *Annona muricata* products for human consumption. **Molecules**, v. 14, p. 5235-5246, 2009.

CHAVAN, S.S.; SHAMKUWAR, P.B.; DAMALE, M.G. A comprehensive review on annona reticulata. **Intern. J. Pharm. Sci. Res.**, v. 5, n. 1, p. 45-50, 2014.

CHEN, Y.; CHEN, J.W.; LI, X. Cytotoxic bistetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **J. Nat. Prod.**, v. 74, p. 2477-2481, 2011.

CHEN, Y.; CHEN, J.W.; XIANG LI, X. Monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Phytoch. Letters**, n. 5, p. 33-36, 2012.

CHEN, Y.; CHEN, J.W.; WANG, Y. et. al. Six cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* seeds. **Food Chemistry**, v. 135, p. 960-966, 2012a.

CHEN, Y.; SHAXU, S.; WEICHEN, J. Anti-tumor activity of *Annona squamosa* seeds extract containing annonaceous acetogenin compounds. **J. Ethnopharm.**, v. 142, p. 462-466, 2012b.

CHIH, H., CHIU, H.F.; TANG, K.S. et. al. Bullatacin, a potent antitumour annonaceous acetogenin, inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cell line 2.2.15 by apoptosis induction. **Life Sci.**, v. 69, p. 1321-31, 2001.

CHIU, H.F.; CHIH, T.T.; HSIAN, Y.M. et. al. Bullatacin, a potent antitumor Annonaceous acetogenin, induces apoptosis through a reduction of intracellular cAMP and cGMP levels in human hepatoma 2.2.15 cells. **Bioch. Pharm.**, v. 65, n. 3, p. 319-327, 2003.

CONSOLACION, Y.R.; GENEVEVE, S.; TORRES, O.B. et. al. Acetogenins from *Annona muricata*. **Phcog J.**, v. 4, n. 32, 2012.

COOTHANKANDASWAMY, V.; LIU, Y.; MAO, S.C. et. al. The alternative medicine pawpaw and its acetogenin constituents suppress tumor angiogenesis via the HIF-1/VEGF pathway. **J. Nat. Prod.**, v. 28, n. 73, p. 956-961, 2010.

CORTES, D.; MORENO, L.; PÁRRAGA, J. et. al. Nuevos fármacos inspirados en annonáceas. **V Congresso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae: do gene à exportação**, v. 36, p. 22-31, 2014.

COSTA, A.; DAHIREL, A.S.; GRIGORIOU, F.M. The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment. **Seminars in cancer Biology**, v. 25, p. 23-32, 2014.

COSTA, E.V.; DUTRA, L.M.; NEPEL, A. et. al. Isoquinoline alkaloids from the leaves of *Xylopia laevigata* (Annonaceae). **Bioch. Syst. Ecol.**, v. 51, 331-334, 2013.

COSTA, M.S.; COSSOLIN, J.F.S.; PEREIRA, M.J.B. Larvicidal and Cytotoxic Potential of Squamocin on the Midgut of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Toxins**, V. 6, p. 1169-1176, 2014a.

COUVREUR, T.L.P. Revision of the African genus *Uvariastrum* (Annonaceae). **PhytoKeys**, v. 33, p. 1-40, 2014.

CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P.G.; NEWMAN, D.J. Impact of natural products on developing new anticancer agents. **Chem. Rev.**, v. 109, p. 3012-3043, 2009.

CUEVAS, Y.Z.; SOBAC, R.D.; LUNA, C.A.V. et. al. The antioxidant activity of soursop decreases the expression of a member of the NADPH oxidase family. **Food Funct.**, v. 5, p. 303-309, 2014.

DANG, C.V.; HAMAKER, M.; SUN, P. et. al. Therapeutic targeting of cancer cell metabolism. **J. Mol. Med.**, v. 89, p. 205-212, 2011.

DANI, C.; AGINONI, J.C.; CALLONI, C. et. al. Viabilidade celular de cultura de linfócitos tratados com *Annona muricata* L. **Ciência em Movimento**, n. 24, p. 94-101, 2010.

DEROIN, T.; LÖTTER, M. A new *Uvaria* L. species (Annonaceae) from northern Mozambique. **Adansonia**, v. 35, n. 2, p. 227-234, 2013.

DRAGANO, N.R.V.; VENANCIO, V.P.; PAULA, F.B.A. et. al. Influence of Marolo (*Annona crassiflora*) pulp intake on the modulation of mutagenic and antimutagenic processes and its action on oxidative stress *in vivo*. **Plant Foods Hum. Nutr.**, v. 65, p. 319-325, 2010.

EL-ASHMAWY, N.E.; EL-BAHRAWY, H.A.; SHAMLOULA, M.M. et. al. Biochemical/metabolic changes associated with hepatocellular carcinoma development in mice. **Tumor Biol.** 2014. DOI <10.1007/s13277-014-1714-6>

EL-BAHRAWY, H.A.; EL-ASHMAWY, N.E.; SHAMLOULA, M.M. et. al. Effect of Diet Intake Imbalance in Hepatocellular Carcinoma Progression. **Internat. J. Biol.**, v. 6, n. 2, 2014.

EL-SERAG, H.B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 142, p. 1264-1273. 2012.

EL-SERAG, H.B. Obesity and Hepatocellular Carcinoma: Hype and Reality, **Hepatology**, 2014 <DOI: 10.1002/hep.27172>

EL-SERAG, H.B.; RUDOLPH, K.L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 132, n. 7, p. 2557-76, 2007.

ELERA, G.G.; GARRETT, A.R.; MARTINEZ, A. et. al. The antioxidant properties of the cherimoya (*Annona cherimola*) fruit. **Food Res. Intern.**, v. 44, p. 2205-2209, 2011.

ESCOTÉ, X.; FAJAS, L. Metabolic adaptation to cancer growth: from the cell to the organism. **Cancer Lett.** 2014. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.03.034>>

ESQUINCA, A.R.G.; CHACÓN, I.C.; MORENO, M.C. et. al. Alkaloids and acetogenins in annonaceae development: biological considerations. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 36, n. 1, 2014.

FABBRI, M.; URANI, C.; SACCO, M.G. et. al. Whole Genome Analysis and MicroRNAs Regulation in HepG2 Cells Exposed to Cadmium. **Altex**, v. 29, n. 12, 2012.

FARRELL, G. Insulin Resistance, Obesity, and Liver Cancer. **Clin. Gastr. and Hepatology**, v. 12, p. 117-119, 2014.

FERNANDO, W.; RUPASINGHE, H.P.V. Anticancer Properties of Phytochemicals Present in Medicinal Plants of North America. **Natural Drug Discovery in the 21st Century**, chap. 6, p. 159-181. 2013.

FERRAZ, R.P.C.; BOMFIM, D.S.; CARVALHO, N.C. et. al. Cytotoxic properties of the leaf essential oils of *Guatteria blepharophylla* and *Guatteria hispida* (*Annonaceae*). **Flavour Fragr. J.**, p. 1-5, 2014 < DOI 10.1002/ffj.3199>

FERRAZ, R.P.C.; CARDOSO, G.M.B.; SILVA, T.B. Antitumour properties of the leaf essential oil of *Xylopia frutescens* Aubl. (*Annonaceae*). **Food Chemistry**, v. 141, p. 196-200, 2013.

FILHO, J.R.B.; NAVES, R.V.; CHAVES, L.J. et. al. Caracterização física e físico-química de frutos de araticum (*Annona crassiflora* MART.), **Biosci. J.**, v. 30, n.1, p. 16-24, 2014.

FLORENCE, N.T.; BENOIT, M.Z.; JONAS, K. et. al. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (*Annonaceae*), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 784-790, 2014.

FORNER, A.; LLOVET, J.M.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 379, p.1245-55, 2012.

FORTMANN, S.P.; BURDA, B.U.; SENGER, C.A. et. al. Vitamin and mineral supplements in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: an updated systematic evidence review for the U.S. Preventive Services Task Force. **Ann Intern Med.**, v. 159, p. 824-834, 2013.

FREEDMAN, N.D.; CROSS, A.J.; McGLYNN, K.A. et. al. Association of meat and fat intake with liver disease and hepatocellular carcinoma in the NIH-AARP cohort. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 102, p. 1354-1365, 2010.

FREISE, C.; RUEHL, M.; SEEHOFER, D. et. al. The inhibitor of Ca²⁺-dependent K⁺ channels TRAM-34 blocks growth of hepatocellular carcinoma cells via downregulation of estrogen receptor alpha mRNA and nuclear factor-kappaB. **Invest New Drugs**, v. 31, p. 452-457, 2013.

FUJIOKA, H.; MAEHATA, R.; WAKAMATSU, S. et. al. Stereoselective Synthesis of cis-2, 5-Disubstituted THFs: Application to Adjacent Bis-THF Cores of Annonaceous Acetogenins. **Org. Lett.**, v. 14, n. 4, p. 1053-1057, 2012.

FUKS, D.; DOKMAK, S.; PARADIS, V. et. al. Benefit of initial resection of hepatocellular carcinoma followed by transplantation in case of recurrence: an intention-to-treat analysis. **Hepatology**, v. 55, n. 1, p. 132-140, 2012.

FUTREAL, P.A.; COIN, L.; MARSHALL, M. et. al. A census of human cancer genes. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 177-183, 2004.

GEURTS, F. **Annonaceous Fruits**. Royal Tropical Institute, Amsterdam, the Netherlands. 1981. 16 p.

GREENLEE, H. Natural Products for Cancer Prevention. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 28, n. 1, p. 29-44, 2012.

GUPTA, A.; PANDEY, S.; SHAH, D.R. et. al. Annonaceous acetogenins: The unrevealed area for cytotoxic and pesticidal activities. **Syst. Ver. Pharm.**, v. 2, n. 2, p. 104-109, 2011.

GUZMÁN, M.A.S; CARRANCA, A.G.; A.R.G. ESQUINCA. In vitro and in vivo antiproliferative activity of laherradurin and cherimolin-2 of *Annona diversifolia* saff. **Phyther. Res.**, n. 23, p. 1128-1133, 2009.

HARBELL, J.W.; KNOOTZ, S.W.; LEWIS, R. W.; LOVELL, D. Irag working group: cell cytotoxic assays. **Food Chem. Toxicol.**, 35, 79-126, 1997.

HE, H.B.; WU, X.L.; YU, B. et. al. The effect of desacetyluvaricin on the expression of TLR4 and P53 protein in Hepg 2.2.15. **Hepat Mon.**, v. 11, n. 5, p. 364-367, 2011.

HOFFMANN, E.K.; LAMBERT, I.H. Resistance in cancer cells Ion channels and transporters in the development of drug. **Phil. Trans. R. Soc.**, v. 369, p. 1-10, 2014.

HU, C.T.; WU, J.R.; CHENG, C.C. et. al. Reactive oxygen species-mediated PKC and integrin signaling promotes tumor progression of human hepatoma HepG2. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 28, p. 851-863, 2011.

HU, T.S.; WU, Y.L.; YAO, Z.J. et. al. Recent progress on the chemical synthesis of Annonaceous acetogenins and their structurally Modified mimics. In: Liang, X.T.; Fang, W.S. (Edts.). **Med. Chem. Bioact. Nat. Prod.**, cap. 10, p. 399-441, 2006. 477p.

HUANG, F.; YOU, M.; CHEN, T. et. al. Self-assembled hybrid nanoparticles for targeted co-delivery of two drugs into cancer cells, **Chem. Commun.**, v. 50, p. 3103-3105, 2014a.

HUANG, X.; HOLLINGER, F.B. Occult hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma: a systematic review. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 21, p. 153-162, 2014.

IARC, International Agency For Research On Cancer. **World Cancer Report 2008**, World Health Organization, Lyon, 2009.

IARC, International Agency For Research On Cancer. **Lastest World Cancer Statistics**, World Health Organization, n. 223, p. 1-3, 2013.

IELUZZI, D., COVOLO, L.; DONATO, F. et. al. Progression to cirrhosis, hepatocellular carcinoma and liver-related mortality in chronic hepatitis B patients in Italy. **Digestive and Liver Disease**, v. 46, p 427-432, 2014.

INCA, Instituto Nacional De Cancer. **Câncer da Criança e Adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade**. Instituto Nacional do Câncer. Rio de Janeiro, 2008, 220 p.

INCA, Instituto Nacional de Cancer. **Câncer de Fígado**. Brasil, Ministério da Saúde, 2009. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=330>. Acesso em 2 Jan 2010.

INCA, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigiancia. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 126 p. 2014.

JAGER, A.V. et. al. Biomarkers of aflatoxin exposure and its relationship with the hepatocellular carcinoma. In: González, R.G.G. (Ed.). **Aflatoxins: Biochemistry and Molecular Biology**, cap. 6, p.117-136, 2011. 478 p.

JAHAN, S.; ASHFAQ, U.A.; QASIM, M. et. al. Hepatitis C virus to hepatocellular carcinoma. **Infect. Ag. Cancer**, n. 7, n.2, p. 1750-78, 2012.

JOLAD, S.D.; HOFFMANN, J.J.; SCHRAM, K.H.; COLE, J.R. Uvaricin, a New Antitumor Agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). **J. Org. Chem.**, v. 47, p. 3151-3153, 1982.

JOHNSON, D. M.; MUNZINGER, J.; PETERSON, J. A. et. al. Taxonomy and biogeography of the New Caledonian species of *Xylopia* L. (Annonaceae). *Adansonia*, v. 35, n. 2, p. 207-226, 2013.

JOHNSON, P.J.; PIRRIE, S.J.; COX, T.F. et. al. The Detection of Hepatocellular Carcinoma Using a Prospectively Developed and Validated Model Based on Serological Biomarkers. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 23, p. 144-153, 2014.

- KANG, F.N.; ONGUÉNÉ, P.A.; LIFONGO, L.L. The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part II: a pharmacological evaluation of non-alkaloids and non-terpenoids. **Malaria Journal**, v. 13, n. 81, 2014.
- KAKUTANI, N.; MURAI, M.; SAKIYAMA, N. et. al. Exploring the binding site of Δ lactogenin in bovine heart mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase. **Biochemistry**, v. 49, p. 4794-4803, 2010.
- KAUSELMANN, G.; DOPAZO, A.; LINK, W. Identification of disease-relevant genes for molecularly-targeted drug discovery. **Curr. Can. Drug Targ.**, v. 12, p. 1-13, 2012.
- KEE, H.J.; CHEONG, J.H. Tumor bioenergetics: An emerging avenue for cancer metabolism targeted therapy. **BMB Rep.** v. 47, n. 3, p. 158-166, 2014.
- KING, E.R.; WONG, K.K. Insulin-like growth factor: current concepts and new developments in cancer therapy. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 7, p. 14-30, 2012.
- KNOWLES, B.B.; HOWE, C.C.; ADEN, D.P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. **Science**, v. 209, p. 497-499, 1980.
- KO, W.H.; CHIU, S.Y.H.; YANG, K.C. Diabetes, hepatitis virus infection, and hepatocellular carcinoma: a case-control study in hepatitis endemicity area. **Hepatology**, v. 42, p. 1-27, 2012.
- KO, Y.M.; WU, T.Y.; WU, Y.C. et. al. Annonacin induces cell cycle-dependent growth arrest and apoptosis in estrogen receptor-ex-related pathways in MCF-7 cells. **J. Ethnoph.**, v. 137, p. 1283–1290, 2011.
- KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Potencial inseticida de plantas da família annonaceae. **V Congresso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae: do gene à exportação**, v. 36, p. 225-242, 2014.
- KUMAR, A. A review on hepatoprotective herbal drugs. **Internat. J. Res. in Pharm. Chem.**, v. 2, n. 1, p. 92-102, 2012.
- KUMAR, V.; ABBAS; ASTER, J.C. **Robbins Basic Patology**, 9^a Ed., Elsevier Saunders, 2013. 881p.
- LAGE, G.A.; MEDEIROS, F.S.; FURTADO, W.L et. al. The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. **Nat Prod Res.**, v. 28, n. 11, p. 808-811, 2014.
- LAINO, C. Multi-Targeted Therapies Show Promise for HCC., **Oncology Times**, v. 30, n. 10, p. 9-13, 2008.
- LANG, F.; STOURNARAS, C. Ion channels in cancer: future perspectives and clinical potential. **Phil. Trans. R. Soc.**, v. 369, p. 1-9, 2014.
- LATEFF A.A.; EL-MENSHAWI, B.S., HAGGAG, M.Y. et al. Cytotoxic acetogenins from *Annona glabra* cultivated in Egypt. **Phcog. Res.**, v. 1, p. 130-5, 2009.

LEANZA, L.; BIASUTTO, L.; AMANAGÒ, A. et al. Intracellular ion channels and cancer. **Frontiers in Physiology**, v. 4, n. 227, 2013.

LEE, C.C.; LIN, Y.H.; CHANG, W.H. et al. Squamocin modulates histone H3 phosphorylation levels and induces G1 phase arrest and apoptosis in cancer cells. **BMC Cancer**, v. 11, n. 58, p. 1-9, 2011.

LEITE, J.P.V. Química dos Produtos Naturais: Uma Abordagem Biossintética. In: _____ (Ed.) **Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas**. Cap. 3, p. 47-97. Ed. Atheneu. 2009.

LI, F.; LIA, S.; LIA, H.B. et. al. Antiproliferative activity of peels, pulps and seeds of 61 fruits. **J Functional Foods**, v. 5, p. 1298-1309, 2013.

LI, H.T.; WU, H.M.; CHEN, H.L. et. al. The Pharmacological Activities of (-)-Anonaine, **Molecules**, v. 18, p. 8257-8263, 2013a.

LI, X.; LING, C.X., CHEN, J.W. et. al. Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Chem. Nat. Comp.**, vol. 46, n. 1, 2010.

LI, W.W.; LI, V.W.; HUTNIK, M. et. al. Tumor angiogenesis as a target for dietary cancer prevention. **J. Oncology**, v. 63, p. 221-236, 2011.

LIAW, C.C.; WU, T.Y.; CHANG, F.R. et. al. Historic Perspectives on Annonaceous Acetogenins from the Chemical Bench to Preclinical Trials. **Planta Med.**, v. 76, p. 1390-1404, 2010.

LIN, C.C.; PENG, J.Y.; TSENG, Y.H. Profiling mitochondrial complex I inhibitors by combining mitochondrial morphological features and maximum common chemical substructures. **Int. Symp. Bioel. Bioinf.**, p. 1-4, 2014.

LINDER, M.C. The relationship of copper to DNA damage and damage prevention in humans. **Mutation Research**, v. 733, p. 83-91, 2012.

LIU, Y.; LIU, Y.; LI, Z. et al. Identification of novel bivalent mimetics of annonaceous acetogenins via a scaffold-hopping strategy. **Bioorg. Med. Chem. Lett**, n. 24, p. 1650-1653, 2014.

LLOVET, J.M.; BURROUGHS, A.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 362, p. 1907-1917, 2003.

LONGLEY, D.B.; HARKIN, P.; JOHNSTON, P.G. 5-Fluoruracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Rev.**, v. 3, p. 330-339, 2003.

LOPES, J.C.; CHATROU, L.W.; SILVA, R.M. *Ephedranthus dimerus* (Annonaceae), a new species from the Atlantic Forest of Brazil, with a key to the species of *Ephedranthus*. **Brittonia**, v. 66, n. 1, p. 70-74, 2014.

LU, J.A.; TAN, M.B.; CAI, Q. The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. **Cancer Lett**. 2014. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.04.001>>

MA, L.; WEI, W.; CHUA, M.S. et. al. WNT/ β -catenin pathway activation in hepatocellular carcinoma: a clinical perspective. **Gastr. Cancer Targets and Therapy**, v. 4, p.49-63, 2014.

MACHACA, K. Ca²⁺ signaling, genes and the cell cycle. **Cell Calcium**, v. 49, p. 323-330, 2011.

MARTINEZ, C.A.; GOODMAN, C.; BRUMAGHIM, J. Metal-mediated DNA damage and cell death: mechanisms, detection methods, and cellular consequences. **Metallomics**. < doi: 10.1039/c4mt00057a> 2014.

MASGRAS, I.; CARRERA, S.; VERDIER, P.J. et. al. Reactive oxygen species and mitochondrial sensitivity to oxidative stress determine induction of cancer cell death BY p21. **Am. Soc. Bioch. Mol. Biol.**, n. 5, p. 1918-1922, 2012.

MATHERS, C.D; LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **PloS Med.**, v. 3. n. 11, 2006 (e442. doi:10.1371/journal.pmed.0030442).

MATUO, R.; SOUSA, F.G.; ESCARGUEIL, A.E. et. al. 5-Fluoruracil and its active metabolite FdUMP cause DNA damage in human SW620 colon adenocarcinoma cell line. **J. Appl. Toxicol.**, v. 29, p. 308-316, 2009.

MCLAUGHLIN, J.L. Paw Paw and cancer: annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. **J. Nat. Prod.**, v. 71, n. 7, p. 1311-1321, 2008.

MELO, J.G.; SANTOS, A.G.; AMORIM, E.L.C. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. **Evid. Bas. Complem. Altern. Medic.**, v. 12, p. 1-14, 2011.

MESQUITA, M.L.; PAULA, J.E.; PESSOA, C. et. al. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **J. Ethnop.**, v. 123, p. 439-445, 2009.

MOCHALSKI, P.; SPONRING, A.; KING, J. Release and uptake of volatile organic compounds by human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) in vitro. **Cancer Cell International**, v. 13, n. 72, p. 1-9, 2013.

MONDAL, S.K.; MONDAL, N.B.; MAZUMDER, U.K. et. al. In vitro cytotoxic and human recombinant caspase inhibitory effect of *Annona reticulata* leaves. **Indian J. Pharmacol.**, v. 39, n. 5, p. 252-254, 2007.

MOORE, B.D.; ANDREW, R.L.; K ULHEIM, C. et. al. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. **New Phytologist**, v. 201, p. 733-750, 2014.

MOREIRA, I.C.; ROQUEB, N.F.; VILEGASC, W. et. al. Genus *Xylopia* (Annonaceae): chemical and biological aspects. **Chem. Biodiv.**, v. 10, p. 1921-44, 2013.

MORENO, M.C.; JANGURE'N, C.L.T.; ORTEGA, M.R.C. et. al. Influence of seasonal variation on the phenology and liriodenine content of *Annona lutescens* (Annonaceae). **J. Plant Res.**, v. 126, p. 529-537, 2013.

NAIR, A.R.; DEGHESELLE, O.; SMEETS, K. et. al. Cadmium-Induced Pathologies: Where Is the oxidative balance lost (or not)? **Int. J. Mol. Sci.** 2013. <doi:10.3390/ijms14036116>

NAKANISHI, S.; ABE, M.; YAMAMOTO, S. et al. Bis-THF motif of acetogenin binds to the third matrix-side loop of ND1 subunit in mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase. **Bioch. Bioph. Acta**, n. 1807, p.1170-1176, 2011.

NAM, H.; KNUTSON, M.D. Effect of dietary iron deficiency and overload on the expression of ZIP metal-ion transporters in rat liver. **Biometals**, v. 25, p. 115-124, 2012.

NATIONAL PARKINSON FOUNDATION. Parkinson's Disease: What You and Your Family Should Know. Ed. KITTLE, G. Arizona. **National Parkinson Foundation**[®], 46 p., 2014.

NCI, National Cancer Institute. U.S. National Institutes of Health, US, **Liver (Hepatocellular) Cancer Screening**, 2009a. Disponível: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/screening/hepatocellular/HealthProfessional/Page2#Section_8>. Acesso em 2 Jun 2014.

NCI, National Cancer Institute. **Fact Sheet: Cancer Advances in Focus**. U.S. Department Of Health And Human Services, National Institutes of Health, 2010. Disponível em: <[http://www.cancer.gov/cancertopics/fact sheet/cancer-advances-in-focus/Fs12_1.pdf](http://www.cancer.gov/cancertopics/fact%20sheet/cancer-advances-in-focus/Fs12_1.pdf)>. Acesso em 2 Jun 2014.

NCI, National Cancer Institute. **Snapshot of Liver and Bile Duct Cancers**. U.S. Department Of Health And Human Services, National Institutes of Health, 2013. Disponível em: <[http://www.cancer.gov/aboutnci/ servingpeople/cancer-statistics/snapshotsl](http://www.cancer.gov/aboutnci/servingpeople/cancer-statistics/snapshotsl)>. Acesso: 02 Jun 2014.

NCI, National Cancer Institute. **Fact Sheet: Cancer Vaccines**. U.S. Department Of Health And Human Services, National Institutes of Health. 2011a. Disponível em: <[http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/ Therapy/Fs7_56.pdf](http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/Fs7_56.pdf)>. Acesso em 02 Jun 2014.

NCI, National Cancer Institute. **Fact Sheet: Tumor Markers**. U.S. Department Of Health And Human Services, National Institutes of Health. 2011b. Disponível em: <[http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/ detection/Fs5_18.pdf](http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/Fs5_18.pdf)>. Acesso em 02 Jun 2014.

NCI, National Cancer Institute. **What You Need to Know About™ Liver Cancer**. U.S. Department Of Health And Human Services, National Institutes of Health, 2012. Disponível em: <[http://www.cancer.gov/ cancetopics/wyntk/liver.pdf](http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/liver.pdf)>. Acesso: 2 Jun 2014.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 461-477, 2009.

NUNES, C.R.; WILLIAM RODRIGUES FREITAS, W.R.; VENTURA, T.L. Inibição da produção de óxido nítrico e efeito citotóxico de extrato aquoso de *Annona muricata*. **Persp. Online**, v. 1, n. 2, p. 1-8, 2011.

PANDEY, N.; BARVE, D. Phytochemical and Pharmacological Review on *Annona squamosa* Linn. **Int. J. Res. Pharm. Biom. Sci.**, vol. 2, n. 4, 2011.

PARDHASARADHI, B.V.V.; REDDY, M.; ALI, A.M. et. al. Differential cytotoxic effects of *Annona squamosa* seed extracts on human tumour cell lines: Role of reactive oxygen species and glutathione. **J. Biosci**, v. 30, p. 237-244, 2005.

PARDO, L.A.; STÜHMER, W. The roles of K⁺ channels in cancer. **Nat. Rev. Can.**, v. 14, p. 39-49, 2014.

PATRA, H.K.; TURNER, A.P.F. The potential legacy of cancer nanotechnology: cellular selection. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 1123-1239, 2014.

PEDERSEN. S.F.; STOCK, C. Ion Channels and Transporters in Cancer: Pathophysiology, Regulation, and Clinical Potential. **Cancer Res.**, v. 73, n. 6, 2013.

PEDRO, N.; CAUTAIN, B.; MELGUIZO, A. et. al. Mitochondrial complex I inhibitors, acetogenins, induce HepG2 cell death through the induction of the complete apoptotic mitochondrial pathway. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 45, p. 153-164, 2013.

PEDRO, N.; CAUTAIN, B.; MELGUIZO, A. et. al. Analysis of cytotoxic activity at short incubation times reveals profound differences among Annonaceus acetogenins, inhibitors of mitochondrial Complex I. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 45, p. 145-152, 2013a.

PENG L.; HE M.; CHEN B. Cellular uptake, elimination and toxicity of CdSe/ZnS quantum dots in HepG2 cells. **Biomaterials**, v. 34, p. 9545-9558, 2013.

PIMENTA, J.R.; MASSABKI, P.S. Carcinoma hepatocelular: um panorama clínico. **Ver. Bras. Clin. Med.**, v. 8, p. 59-67, 2010.

POMPILHO, W.M. Avaliação *in vitro* da atividade antitumoral de três espécies vegetais nativas da floresta atlântica. Universidade Federal de Viçosa. 142p. 2011.

PORT, G.Z.; OLIVEIRA, K; SOLDERA, J. et. al. Biochemical nutritional profile of liver cirrhosis patients with hepatocellular carcinoma. **Arq. Gastroent.**, v. 51, n. 1, p. 10-16, 2014.

PREVARSKAYA, N.; AHIDOUCHE, H.O.; SKRYMA, R. et. al. Remodelling of Ca²⁺ transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks? **Phil. Trans. R. Soc.**, v. 369, p. 1-11, 2014.

PREVARSKAYA, N.; SKRYMA, R.; SHUBA, Y. et. al. Ion channels and the hallmarks of cancer. **Molecular Medicine**, vol.16, n. 3, 2010.

QIN, Q.; LIN, Y.W.; ZHENG, X.Y.; et. al. RNAa-mediated overexpression of WT1 induces apoptosis in HepG2 cells. **World J. Surg. Oncol.**, v. 10, n. 11, p. 1-8, 2012.

QIN, Y.; PAN, X.; TIAN, T. et. al. Anti-proliferative effects of the novel squamosamide derivative (FLZ) on HepG2 human hepatoma cells by regulating the cell cycle-related proteins are associated with decreased Ca²⁺/ROS levels. **Chem. Biol. Inter.**, v. 193, p 246-253, 2011.

RAJ, D.S.; VENNILA, J.J.; AIYAVU, C. et al. The hepatoprotective effect of alcoholic extract of *Annona squamosa* leaves on experimentally induced liver injury in swiss albino mice. **Int. J. Integr. Biol.**, v. 5, n.3, p. 182-186, 2009.

RAMALINGUM, N.; MAHOMOODALLY, M.F. The Therapeutic Potential of Medicinal Foods. **Ad. Pharm. Sc.**, p.1-18, 2014. <<http://dx.doi.org/101155/2014/354264>>

RAOUL, J.L. Natural History of Hepatocellular Carcinoma and Current Treatment Options, **Sem. in Nucl. Med.**, v. 38, n. 2, p. 13-18, 2008.

RASHED, K. N. Medicinal plants as a safe target for treatment of cancer. **Nat. Prod. Chem. Res.**, v.2, n. 2, p. 100-106, 2014.

RBT, Registro Brasileiro de Transplantes, **Associação Brasileira de Transplante de Órgãos** - ABTO. Ano XV, n. 1, 2008, 25p. Disponível em: <www.abto.org.br> Acesso em 13 Jan 2010.

RIBEIRO, L.P.; AKHTAR, Y.; VENDRAMIM, J.D. et. al. Comparative bioactivity of selected seed extracts from Brazilian *Annona* species and an acetogenin-based commercial bioinsecticide against *Trichoplusia ni* and *Myzus persicae*. **Crop Protection**, v. 62, p. 100-106, 2014.

RIBEIRO, R.I.M.A.; KURIBAYASHI, J.S.; JÚNIOR, P.C.B. et. al. Inibição de metaloproteínas por extratos aquosos de *Aloe vera*, *Annona muricata* e chá preto. **Biosci. J.**, v. 26, n. 1, p. 121-127, 2010.

RODRIGUEZ1, A.E.O.; SCHATZ, G.E., VERA, Y.L. et. al. A new species of *stenanona* (annonaceae) endemic to Chiapas, Mexico. **Botanical Sciences**, v. 92, n. 1, p. 37-41, 2014.

ROESLER, R. Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl₄-induced liver damage in rats. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 31, n. 1, p. 93-100, 2011.

RUDZOK, S.; KREJC, S.; GRAEBSCH, C. et. al. Toxicity Profiles of Four Metals and 17 Xenobiotics in the Human Hepatoma Cell Line HepG2 and the Protozoa *Tetrahymena pyriformis*: a Comparison. **Environmental Toxicology**, p. 1-16, 2009. <DOI 10.1002/tox.>

SAIZARBITORIA, I.C.; MONTILLA, L.; RODRIGUEZ, M. et al. Xymarginatin: a new acetogenin inhibitor of mitochondrial electron transport from *Xylopiya emarginata* Mart., Annonaceae. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 19, n. 4, 2009.

SALEEM, M.T.S.; CHRISTINA, A.J.M.; CHIDAMBARANATHAN, N.; et al. Hepatoprotective activity of *Annona squamosa* Linn. on experimental animal model. **Int. J. App. Res. Nat. Prod.**, v.1, n. 3, p. 1-7, 2008.

SALLES, T.D.; FEDIRKO, V.; STEPIEN, M. Dairy products and risk of hepatocellular carcinoma: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. **Int. J. Cancer**, p. 1-11, 2014.

SANTARIUS, T.; SHIPLEY, J.; BREWER, D. et. al. Supplementary Information of a survey of amplified and overexpressed genes in human cancer. **Nature Reviews Cancer.**, v. 10, p. 59-64, 2010.

SEANGPHAKDEEA, P.; POMPIMONA, W.; MEEPOWPAN, P. Anti-inflammatory and anticancer activities of (-)-zeyleanol from stems of *Uvaria grandiflora*. **ScienceAsia**, v. 39, p. 610-614, 2013.

SHAABAN, S.; NEGM, A.; IBRAHIM, E.E. Hepatocellular carcinoma chemotherapeutic agents: efficacy and mode of action. **Oncol. Rev.**, p. 1-43, 2014 <doi: 10.4081/oncol.2014.246>

SHARIF, R.; THOMASA, P.; ZALEWSKIB, P.; FENECHA, M. The role of zinc in genomic stability. **Mutation Research**, 733, p. 111– 121, 2012.

- SHARMA, V.; ANDERSON, D.; DHAWAN, A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). **Apoptosis**, v.17, p. 852-870, 2012.
- SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. et. al. Cancer Statistics, 2014. **CA Cancer J. Clin.**, v. 64, p. 9-29, 2014.
- SHI, J.F.; WU, P.; JIANG, Z.H. et. al. Synthesis and tumor cell growth inhibitory activity of biotinylated annonaceous acetogenins. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 71, p. 219-228, 2014.
- SHLOMAI, A; JONGA, Y.P; RICEA, B.C.M. Virus associated malignancies: The role of viral hepatitis in hepatocellular carcinoma. **Semin Cancer Biol.** 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.01.004>
- SINGH, N.; MISHRA, B.B.; BAJPAI, S. et. al. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 22, p. 18-45, 2014b.
- SINGH, S.; SINGH, P.P.; ROBERTS, L.R. et. al. Chemopreventive strategies in hepatocellular carcinoma. **Nat. Rev. Gastr. Hepat.**, v. 11, p. 45-55, 2014.
- SINGH, T.P.; SINGH, R.K.; MALIK, P. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Annona squamosa* Linn bark. **J. Sci. Innov. Res.**, v. 3, n. 1, p. 60-64, 2014a.
- SIVASANKARI, B.; ANANDHARA, M.; GUNASEKARAN, P. An ethnobotanical study of indigenous knowledge on medicinal plants used by the village peoples of Thoppampatti, Dindigul district, Tamilnadu, India. **J Ethnoph.**, v. 153, p. 408-423, 2014.
- SONG, T.J.; IP, E.W.K.; FONG, Y. Hepatocellular carcinoma: Current surgical management. **Gastroent.**, v. 127, p. S248-S260, 2004.
- SOUSA, E.A.; SILVA, A.A.C.A.; CAVALHEIRO, A.J. A New Flavonoid Derivative from Leaves of *Oxandra sessiliflora* R. E. Fries . **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 25, n. 4, p. 704-708, 2014.
- SOUZA, V.M.A.; ESCOBAR, D.C.; BUCIO, L. et. al. NADPH oxidase and ERK1/2 are involved in cadmium induced-STAT3 activation in HepG2 cells. **Toxicology Letters**, v. 187, p.180-186, 2009.
- STEWART, B.W.; KLEIHUES, P. (Eds): World Cancer Report. **The Global Burden of Cancer**, Cap. 1, p. 12-19. IARC Press, Lyon, 231p. 2003.
- SUBRAMANIAM, A.; SHANMUGAM, M.K.; PERUMAL, E. et. al. Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1835, p. 46-60, 2013.
- SUN, S.; LIU, J.; KADOUH, H. et. al. Three new anti-proliferative Annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*). **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 24, p. 2773-2776, 2014.
- SURESH, H.M.; SHIVAKUMAR, B.; HEMALATHA, K. et. al. In vitro antiproliferative activity of *Annona reticulata* roots on human cancer cell lines. **Pharm. Res.**, v. 3, n. 1, p. 9-12, 2011.

TALIB, W.H. Anticancer and Antimicrobial Potential of Plant-Derived Natural Products. In: Rasooli, A. (Ed.), **Phytochemicals – bioactivities and impact on health**, cap. 6, p. 141-158, 2011, 388p.

TAN, G.R.; FENG, S.S.; LEONG, D.T. The reduction of anti-cancer drug antagonism by the spatial protection of drugs with PLAE/TPGS nanoparticles. **Biomaterials**, v. 35, p. 3044-3051, 2014.

TAN, Y.; QIN, S.; HOU, X.; QIAN, X. et. al. Proteomic-based analysis for identification of proteins involved in 5-fluoruracil resistance in hepatocellular carcinoma. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, p. 81-87, 2014a.

TAPIERO, T.; TEW, K.D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, p. 399-411, 2003.

TORRES, M.P.; RACHAGANI, S.; PUROHIT, V. et. al. Graviola: a novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo through altering cell metabolism. **Cancer Letters**, v. 323, 29-40, 2012.

TRETIAKOVA, M.S.; SHABANI-RAD, M.T.; GUGGISBERG, K. et. al. Genomic and immunophenotypical differences between hepatocellular carcinoma with and without cirrhosis. **Histopath.**, v. 56, p. 683-693, 2010.

TURATI, F.; GALEONE, C.; ROTA, M. et. al. Alcohol and liver cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. **Annals of Oncology**, v. 10, p. 1-10, 2014.

UDUMAN, M.S.T.A.S.; SUNDARAPANDIAN, R.; MUTHUMANIKKAM, A. et. al. Protective effect of methanolic extract of *Annona squamosa* linn in isoniazid-rifampicin induced hepatotoxicity in rats. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v. 24, n.2, p.129-134, 2011.

VANNI, E.; BUGIANESI, E. Obesity and Liver Cancer. **Clin. Liver Dis.**, v. 18, p. 191-203, 2014.

VANNI, E.; MEZZABOTTA, L; BUGIANESI, E. NAFLD and Hepatocellular Carcinoma: How Big a Problem is This Really? **Curr. Hepatology Rep.**, v. 13, p. 113-118, 2014.

VÁZQUEZ, M.M.; REYES, R.E. Secondary metabolites in annonaceae: potential source of drugs. **V Congresso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae: do gene à exportação**, v. 36, p. 141-146, 2014.

VINCENT, F.C.; LOS, M.J. New potential instrument to fight hepatocellular cancer by restoring p53. **Hepat. Mon.**, v. 11, n. 5, p. 331-332, 2011.

VOGELZANG, N.J.; BENOWITZ, S.I.; ADAMS, S. et. al. Clinical Cancer Advances 2011: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 1, p. 88-109, 2012.

VOMA, C.; BARFELL, A.; CRONIGER, C. Reduced cellular Mg²⁺ content enhances hexose 6-phosphate dehydrogenase activity and expression in HepG2 and HL-60 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 548, p.11-19. 2014.

- VORONINA, S.; OKEKE, E.; PARKER, T. et. al. How to win ATP and influence Ca²⁺ signaling. **Cell Calcium**, 2014. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2014.02.010>>
- WAHAB, R.; SIDDIQUI, M.A.; SAQUIB, Q. et. al. ZnO nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis in HepG2 and MCF-7 cancer cells and their antibacterial activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 267–276, 2014.
- WANDS, J.R.; KIM, M. Wnt/β-catenin signaling and hepatocellular carcinoma, **Hepatology**, p. 1-7, 2014. <DOI: 10.1002/hep.27081>
- WANG, B.; LI, Y.; TAN, Y. et. al. Low-Dose Cd induces Hepatic Gene Hypermethylation, along with the Persistent Reduction of Cell Death and Increase of Cell Proliferation in Rats and Mice. **PLoS One**, v. 7, n. 3, 2012.
- WARBURG, O. On the Origin of Cancer Cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309-314, 1956.
- WEN, W.; DING, J.; SUN, W. et. al. Cyclin G1-mediated epithelial-mesenchymal transition via PI3-K/Akt signaling facilitates liver cancer progression. **Hepatology**, v. 55, p. 1-47, 2012.
- WHO, World Health Organization. **World Health Statistics 2008**. Department of Measurement and Health Information Systems, Geneva, 2008.
- WHO, World Health Organization. **World Cancer Report, 2008**. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2008a.
- WHO, World Health Organization. Global Health Risks. **Mortality and burden of disease attributable to selected major risks**. Geneva, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/global_health_risks/en/index.html> Acesso em 05 Jun 2014.
- WHO, World Health Organization. **Global Cancer Facts and Figures**, 2nd. ed. American Cancer Society. Atlanta, 2011.
- WHO, World Health Organization. **Noncommunicable Diseases Country Profiles**, 2009p, 2011a.
- WHO, World Health Organization. **Cancer Facts and Figures**. American Cancer Society. Atlanta, 2012. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf>>. Acesso em 5/Fev/2014.
- WHO, World Health Organization. Media Centre. **Cancer Fact Sheet**, n. 297, 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso: 3/Junho/2014.
- WOGUEN, V.; FOGANG, H.P.D.; MAGGI, F. et. al. Volatile oil from striped African pepper (*Xylopiya parviflora*, Annonaceae) possesses notable chemopreventive, anti-inflammatory and antimicrobial potential. **Food Chem.**, v. 149, p. 183-189, 2014.
- WORETA, T.A.; ALQAHTANI, S.A. Evaluation of Abnormal Liver Tests. **Med. Clin. N. Am.**, v. 98, p. 1-16, 2014.

WU, X.; LI, Y. Signaling pathways in liver cancer. In: JULIANOV, A. (Ed.), **Liver Tumors**, cap. 3, p.37-58. 2012. 200p.

XIAO, Q.; LIU, Y.; QIU, Y. et. al. Design, synthesis of symmetrical bivalent mimetics of annonaceous acetogenins and their cytotoxicities. **Bioorg. Med. Chem. Letters**, v. 21, p. 3613-3615, 2011.

YADAV, J.S., REDDY, U.V.S., REDDY, B.V.S. Stereoselective synthesis of tetrahydropyran-tetrahydrofuran (THP-THF) core of (+)-muconin *via* Prins cyclization, **Tetrahedron Letters**, v. 16, p. 1-7, 2014.

YAMADA, E.S.; RESPONDEK, G.; MÜSSNER, S. et. al. Annonacin, a natural lipophilic mitochondrial complex I inhibitor, increases phosphorylation of tau in the brain of FTDP-17 transgenic mice. **Experimental Neurology**, v. 253, p. 113-125, 2014.

YANG, M.; BRACKENBURY, W.J. Membrane potential and cancer progression. **Frontiers in Physiology**, v 4, n. 185, 2013.

YAO, H.; XU, W.; SHI, X. et. al. Dietary Flavonoids as Cancer Prevention Agents. **J. Environm. Sci. Health**, v. 29, n. 1, p.31, 2011.

YAPI, T.A.; BOTIB, J.B.; TONZIBOB, Z.F.L. et. al. Chemical Variability of *Xylopia quintasii* Engl. & Diels Leaf Oil from Côte d'Ivoire, **Chem, & Biod.**, v. 11, 2014.

ZAFRA-POLO, M.C.; GONZALEZ, M.C.; ESTORNELL, E. et. al. Acetogenins from annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. **Phytochem.**, v. 42, n. 2, p. 253-271, 1996.

ZENG, X.; MORGENSTERN, R.; NYSTRÖM, A.M. Nanoparticle-directed sub-cellular localization of doxorubicin and the sensitization breast cancer cells by circumventing GST-Mediated drug resistance. **Biomaterials**, v. 35, p. 1227-1239, 2014.

ZHANG, D.Y.; FRIEDMAN, S.L. Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. **Hepatology**, v. 55, p. 1-22, 2012a.

ZHANG, Y.W.; YAN, D.L.; WANG, W. et. al. Knockdown of insulin-like growth factor I receptor inhibits the growth and enhances chemo-sensitivity of liver cancer cells. **Current Cancer Drug Targets**, v. 12, p. 74-84, 2012.

ZHENG, J.; ZHANG, Y; XU, W. Zinc protects HepG2 cells against the oxidative damage and DNA damage induced by ochratoxin A. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, p. 123–131, 2013.

ZHOU, R.L. Laptm4B: a novel diagnostic biomarker and therapeutic target for hepatocellular carcinoma. In: LAU, W.Y. (Ed.), **Hepatocellular carcinoma - basic research**, cap. 1, p.3-34, 2012. 402p.