

WANDER LOPES PEREIRA

**AÇÃO ANTITUMORAL *IN VITRO* DO EXTRATO DA FOLHA DE OLIVEIRA (*Olea europaea* L.) E DOS FLAVONOIDES MORINA, NARINGINA E RUTINA EM LINHAGENS DE CÉLULAS CARCINOGENÉTICAS**

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

P436a  
2014  
Pereira, Wander Lopes, 1972-  
Ação antitumoral *in vitro* do extrato da folha de  
oliveira (*Olea europaea L.*) e dos flavonoides  
morina, naringina e rutina em linhagens de células  
carcinogênicas / Wander Lopes Pereira. - Viçosa, MG, 2014.  
xv, 110f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Tânia Toledo de Oliveira.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.94-110.

1. Câncer. 2. Flavonoides. 3. Oliveira. 4. Plantas  
medicinais. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.  
Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola.  
II. Título.

CDD 22. ed. 616.994

WANDER LOPES PEREIRA

**AÇÃO ANTITUMORAL *IN VITRO* DO EXTRATO FOLHA DE OLIVEIRA  
(*Olea europaea L.*) E DOS FLAVONOIDES MORINA, NARINGINA E  
RUTINA EM LINHAGENS DE CÉLULAS CARCINOGENÉTICAS.**

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*.

APROVADA: 25 de julho de 2014.

---

Carla de Oliveira Barbosa Rosa

---

Angélica Alves Lima

---

Milton Masahiko Kanashiro  
(Coorientador)

---

Marisa Alves Nogueira Diaz  
(Coorientadora)

---

Tânia Toledo de Oliveira  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me proporcionado uma vida intensa e completa, das boas experiências que só vieram a somar e das ruins que se tornaram lições de profundo aprendizado.

Aos meus pais, Geraldo Lopes Francisco e Maria Januária Pereira Lopes, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Aos meus irmão Weberth Pereira Lopes pelo amor e presença em todos os momentos da minha vida e Edésio Elias Lopes pelo amor, carinho e alegria de viver.

Aos meus sobrinhos João Augusto e Marcos Antônio. Que seus caminhos sejam repletos de conhecimento, amor, respeito e responsabilidade.

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de aperfeiçoamento científico.

A Amiga, professora e orientadora Tânia Toledo de Oliveira pelo carinho, amizade, companheirismo e presença. Pela grandiosa contribuição em minha formação profissional e pessoal. A você minha eterna admiração.

Ao Professor Milton Kanashiro por contribuir de forma relevante em minha formação e pela preciosa amizade.

Ao Dr. Marcelo, pela revisão dos trabalhos e por contribuir estimulando meu pensamento crítico e científico;

Aos amigos Geisa e Marcelo pela contribuição e amizade.

Aos amigos do LBR, Franz, Thais e Marina, pela amizade, contribuição e excelentes momentos de descontração.

Aos técnicos de Laboratório, Jorge, Fernando, Núbia, Rita e Juliana da UENF sem os quais esse trabalho certamente não seria possível;

Por fim, agradeço aqueles que contribuíram para realização desse trabalho e a todos, que de certa forma me ajudaram, contribuindo com minha formação acadêmica, profissional e da vida.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS .....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA .....	3
2.1 Câncer: conceito e aspectos gerais .....	3
2.2 O ciclo celular e a carcinogênese .....	5
2.2.1 Controle bioquímico do ciclo celular .....	7
2.3 A origem do câncer .....	8
2.4 Alterações Bioquímicas no Câncer .....	10
2.4.1 Metabolismo de carboidratos em células carcinogênicas.....	10
2.4.2 Alterações nas mitocôndrias de células carcinogênicas.....	13
2.4.3 Via canônica da Wtn e câncer .....	17
2.5 Angiogênese .....	18
2.6 Mecanismos bioquímicos da Morte Celular Programada .....	19
2.6.1 Vias de sinalização em câncer: Autofagia e apoptose.....	20
2.6.2 Apoptose induzida pelo estresse do Retículo Endoplasmático Rugoso23	
2.7 Linhagens de células carcinogênicas testadas .....	23
2.7.1 Leucemias .....	23
2.7.2 Melanomas .....	25
2.7.3 Câncer de pulmão .....	27
2.7.4 Características das Linhagens de células cancerígenas testadas	29
2.8 Epidemiologia e etiologia do câncer no mundo e no Brasil. ....	29
2.8.1 Mecanismo bioquímico do tabaco na etiologia do câncer. ....	33
2.9 Flavonoides: estrutura química e características físico-químicas da molécula .....	34
2.9.1 Propriedades farmacológicas dos flavonoides .....	36
2.9.2 Atividade anticarcinogênica dos flavonoides .....	38
2.10 Botânica e descrição de planta de oliveira ( <i>Olea europaea L.</i> ).....	42
2.10.1 Histórico da olivicultura no mundo e no Brasil. ....	42
2.10.2 Botânica e descrição de planta de oliveira ( <i>Olea europaea L.</i> ) ...	44
2.10.3 Exigência climática e local de plantio .....	45
2.11. Composição química e Propriedades farmacológicas e anticarcinogênicas das folhas de oliveira.....	46

2.12.	Farmacologia antineoplásica .....	50
2.12.1	Cisplatina .....	51
2.12.2	Vincristina .....	52
3.	OBJETIVOS .....	54
3.1	Objetivo Geral .....	54
3.2	Objetivos específicos .....	54
4.	MATERIAIS E MÉTODOS. ....	55
4.1	Área de coleta do material botânico .....	55
4.2	Material Botânico .....	55
4.2.1	Coleta .....	55
4.2.2	Preparação do Extrato Vegetal.....	56
4.3	Experimento in vitro.....	56
4.3.1	Cultura da linhagem de célula de origem tumoral.....	57
4.3.2	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade biológica dos extratos contra as células tumorais .....	57
4.3.3	Avaliação do efeito citotóxico dos extratos contra às células tumorais .....	57
4.3.4	Quantificação da Lactato Desidrogenase (LDH) liberada pelas células após incubação com os extratos.....	58
4.3.5	Avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência .....	59
4.3.6	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo (JC-1).....	60
4.3.7	Avaliação das caspases .....	61
4.3.8	Análise estatística .....	62
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	63
5.1	Avaliações do efeito dos compostos na viabilidade celular por MTT ..	63
5.2	Avaliações da viabilidade celular pela liberação de lactato desidrogenase .....	68
5.3	Avaliação do tipo de morte celular .....	71
5.3.1	Microscopia de Fluorescência .....	71
5.4	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM) .....	79
5.5	Avaliação da atividade de caspases-3 e -6 .....	91
6.	CONCLUSÃO .....	94
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Protooncogenes são genes que sintetizam proteínas que regulam o ciclo celular.....	<b>3</b>
<b>Figura 2.</b> Visão esquemática do processo de carcinogênese (VOLP <i>et al.</i> , 2008).....	<b>5</b>
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo das fases do ciclo celular.....	<b>7</b>
<b>Figura 4.</b> Modificação dos centríolos no ciclo de divisão e mitose em células normais.....	<b>9</b>
<b>Figura 5.</b> Atividade anormal de centríolos em mitoses levando a aneuploidias.....	<b>10</b>
<b>Figura 6.</b> Fluxo de produção de energia e biossíntese de compostos em processos de diferenciação celular, proliferação celular e câncer..	<b>14</b>
<b>Figura 7.</b> Mitocôndria como um alvo para múltiplos eventos de transformação metabólica: .....	<b>16</b>
<b>Figura 8.</b> Tipo I de morte celular programada (MCP) ou apoptose. Outras formas alternativas de MCP incluem tipo II (autofagia) e tipo III (Necrose) (FERREIRA <i>et. al</i> , 2004).....	<b>19</b>
<b>Figura 9.</b> Modelo sobre a via de sinalização da apoptose..	<b>22</b>
<b>Figura 10.</b> Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas). .....	<b>30</b>
<b>Figura 11.</b> Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas). .....	<b>30</b>
<b>Figura 12.</b> Papel da SHh no desenvolvimento das vias de sinalização da tumorigênese.....	<b>34</b>
<b>Figura 13.</b> Estrutura do flovonoide morina (AMADO <i>et.al</i> , 2011). .....	<b>36</b>
<b>Figura 14.</b> (A) estrutura do flavonóide naringina, (B) estrutura do flovonoide rutina (GRASSI, 2010).....	<b>36</b>
<b>Figura 15.</b> Flavonoides regulam diferentes componentes da via de Wnt/ $\beta$ -catenina: .....	<b>42</b>
<b>Figura 16.</b> A/B Folhas adultas de oliveira usadas para obter o extrato.	<b>45</b>
<b>Figura 17.</b> A/B: Planta da oliveira: (A) terreno com declividade (B) Planta da oliveira adulta. ....	<b>46</b>
<b>Figura 18.</b> Efeito do extrato de folhas de oliveira (EFO), oleuropeína e luteolina sobre a morfologia de células HL60. ....	<b>48</b>
<b>Figura 19.</b> Vias de sinalização de transdução e sua modulação pelo	

flavonoide luteolina descritas na literatura (SEELINGER, <i>et al.</i> , 2008). .....	49
<b>Figura 20.</b> Bioativação intracelular da cisplatina (AVENDANO & MENENDEZ, 2008). .....	52
<b>Figura 21.</b> Estrutura de alguns fármacos antimitóticos: (1) vimblastina e (2) vincristina (BRANDAO <i>et al.</i> , 2010).....	53
<b>Figura 22.</b> Microscopia de fluorescência de células U937 evidenciando as características para a classificação das células como mencionadas acima: 1 – normal, 2 – Necrose, 3 – Apoptose primária, 4 – Apoptose-necrose (apoptose secundária). .....	60
<b>Figura 23.</b> Efeito citotóxico do composto morina e do extrato de oliveira contra às células humanas U937, THP-1, , H460, SK-MEL-5 e morina B16F10 após 48 horas de incubação. ....	65
<b>Figura 24.</b> Efeito citotóxico do composto naringina e rutina contra as células humanas U937, THP-1, H460, SK-MEL-5 e morina B16F10 após 48 horas de incubação.....	66
<b>Figura 25.</b> Efeito citotóxico do composto vincristina (controle positivo) contra as células humanas U937, THP-1, após 48 horas de incubação. ....	67
<b>Figura 26.</b> Efeito citotóxico do composto cisplatina contra a célula morina B16F10 e as humanas H460, SK-MEL-5 após 48 horas de incubação. ....	67
<b>Figura 27.</b> Avaliação da liberação da LDH (desidrogenase láctica). O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). ....	69
<b>Figura 28.</b> Avaliação da liberação da LDH (desidrogenase láctica). O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). ....	70
<b>Figura 29.</b> Porcentagem de apoptose induzida pelo composto morina nas linhagens neoplásicas U937, THP-1 determinada por microscopia de fluorescência em três tempos diferentes, 12, 24, 36. ....	72
<b>Figura 30.</b> Porcentagem de apoptose induzida pelo composto morina nas linhagens neoplásicas B16F10, S-KMEL-5, H460. ....	74
<b>Figura 31.</b> Porcentagem de apoptose induzida pelo composto extrato de oliveira nas linhagens neoplásicas U937, THP-1.....	75
<b>Figura 32.</b> Porcentagem de apoptose induzida pelo composto extrato de oliveira nas linhagens neoplásicas B16F10, SK-MEL-5, H460	

determinada por microscopia de fluorescência em quatro tempos diferentes, 12, 24, 36 e 48. ....	77
<b>Figura 33.</b> Porcentagem de apoptose induzida pelo composto vincristina (controle positivo) nas linhagens neoplásicas U937, THP-1 determinada por microscopia de fluorescência em três tempos diferentes, 12, 24, 36. ....	78
<b>Figura 34.</b> Porcentagem de apoptose induzida pelo composto cisplatina (controle positivo) nas linhagens neoplásicas U937, THP-1 determinada por microscopia de fluorescência em três tempos diferentes, 12, 24, 36. ....	79
<b>Figura 35.</b> <i>Dot-plots</i> da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células U937 submetidas a incubação de 24 e 36 horas com o composto morina (M). ....	81
<b>Figura 36.</b> <i>Dot-plots</i> da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células THP-1 submetidas a incubação de 24 e 36 horas com o composto morina (M). ....	82
<b>Figura 37.</b> <i>Dot-plots</i> da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células B16F10 submetidas a incubação de 24 e 36 horas com o composto extrato de morina (M). ....	83
<b>Figura 38.</b> <i>Dot-plots</i> da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células S-KMEL-5 submetidas a incubação de 24 e 36 horas com o composto morina (M). ....	84
<b>Figura 39.</b> <i>Dot-plots</i> da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células H460 submetidas a incubação de 24 e 36 horas com o composto extrato de morina (M). ....	85
<b>Figura 40.</b> <i>Dot-plots</i> da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células U937 submetidas a incubação de 36 e 48 horas com o composto extrato de folha de oliveira (E). ....	86
<b>Figura 41.</b> <i>Dot-plots</i> da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células THP-1 submetidas a incubação de 36 e 48 horas com o composto extrato de folha de oliveira (E). ..	87
<b>Figura 42.</b> <i>Dot-plots</i> da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células B16F10 submetidas à incubação de 36 e 48 horas com o composto extrato de extrato de folhas de oliveira (E). ....	88
<b>Figura 43.</b> <i>Dot-plots</i> da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células SK-MEL-5 submetidas a	

incubação de 36 e 48 horas com o composto extrato de extrato de folhas de oliveira (E).....	<b>89</b>
<b>Figura 44.</b> <i>Dot-plots</i> da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células H460 submetidas a incubação de 36 e 48 horas com o composto extrato de extrato de folhas de oliveira (E). .....	<b>90</b>
<b>Figura 45.</b> Atividade das caspases-3 e -6 induzida pelo composto morina na linhagem celular humana U937 após 48 horas de incubação. ....	<b>92</b>
<b>Figura 46.</b> Atividade das caspases-3 e -6 induzidas pelo extrato de oliveira contra a linhagem de célula humana U937 e SK-MEL-5, após 48 horas de incubação.....	<b>92</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Evolução das localizações de câncer com relação com o tabagismo .....	<b>32</b>
<b>Tabela 2.</b> Grupos de flavonoides, seus componentes e fontes alimentares. ....	<b>35</b>
<b>Tabela 3.</b> EC50 ( $\mu\text{M}/\mu\text{g}/\text{ml}$ ) dos compostos sobre a viabilidade celular baseado no ensaio de citotoxicidade celular por MTT.....	<b>68</b>

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

- APAE-1** Fator de apoptose (Apoptotic protease activating factor 1)
- APC** Célula apresentando antígeno
- Akt** Fator de transcrição
- B16F10** Linhagem de células melanômicas de camundongo
- Bax/Bak** Proteínas associadas à família Bcl-2
- Bcl-2** B cell lymphoma 2
- Bid/Bad** Proteínas proapoptóticas
- CD44** Receptor transmembrana celular
- CDK2** Quinase dependente de ciclina -2
- CK1** Proteína quinase 1
- C-Myc** Gene que codifica fator de transcrição
- D.O.** Densidade Óptica
- D.D.** Death Domain
- DISC** Death Inducing Signaling Complex
- DKK** Proteína
- D-MEN/F12** Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12
- EC50** Concentração necessária para 50 % de inibição
- EROs** Espécies reativas do oxigênio
- FADD** Fas-Associated Death Domain
- Fas/FasL** Proteínas transmembrana tipo II
- FGF-2** Proteína Dickkopf
- FNTr** Fator de necrose tumoral
- GLUT** Receptores de glicose
- H460** Linhagem de carcinoma de pulmão humano
- Hart** Proteína quinase B
- HIF-1** Fator indutor de hipóxia
- IAP** Inibidor of Apoptosis Proteín
- INCA** Instituto Nacional do Câncer
- JC-1** Iodeto de 5,5',6,6'- tetracloro-1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolil carbocianina
- LDH** Desidrogenase Láctica
- MAPKs** Proteína quinase ativada por mitógeno

**MCP** Morte celular programada  
**MMP** Metaloproteína de Matriz  
**MTT** [3(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]  
**NFκB** Fator nuclear kappa B  
**Notch** Receptores transmembranar de reconhecimento celular  
**OMS** Organização Mundial de Saúde  
**p53** fator de transcrição nuclear  
**PBS** Tampão Salina Fosfato  
**Rb** Fator regulador da E2F (fator de trascrição)  
**RER** Retículo endoplasmático Rugoso  
**RNA** Ácido Ribonucléico  
**Shh** Protein Sonic Hedgehog  
**SK-MEL-5** Linhagem de células melanômicas de humanos  
**TGF-α** Fator de transformação de crescimento  
**THP-1** Linhagem de células leucêmicas de humanos  
**TNF** Fator de Necrose Tumoral  
**TRAIL** TNF-related apoptosis-Inducing Ligand  
**U93-7** Linhagem de célula humana de linfoma histiocítico  
**VEGF** Fator de crescimento de célula endotelial vascular  
**WTN** Família das glicoprpte[inas  
**XIAP** X-linked Inibitor of Apoptosis Protein

## RESUMO

PEREIRA, Wander Lopes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014. **AÇÃO ANTITUMORAL *IN VITRO* DO EXTRATO FOLHA DE OLIVEIRA (*Olea europaea L.*) E DOS FLAVONOIDES MORINA, NARINGINA E RUTINA EM LINHAGENS DE CÉLULAS CARCINOGENICAS.** Orientador: Tania Toledo de Oliveira. Coorientadores: Marisa Alves Nogueira Diaz e Aloisio da Silva Pinto

O câncer é uma doença crônica que atinge milhares de pessoas ao redor do mundo, sendo responsável por elevadas taxas de morbidade e mortalidade. No Brasil, em 2012, foram registrados 321 mil novos casos de câncer e 190 mil óbitos em decorrência desta patologia. Por se tratar de uma doença que acomete a população mundial, o câncer produz impactos na saúde pública e na economia, pois o tumor atinge uma parcela da população economicamente ativa, podendo ser de rápido desenvolvimento e de altas taxas de metástase e de complicações físicas e psicológicas. O aumento da incidência de câncer no mundo e de suas repercussões sociais, econômicas e na saúde pública instiga a comunidade científica de vários países, inclusive do Brasil, a desenvolver pesquisas com o propósito de investigar quais compostos naturais seriam potencialmente considerados drogas terapêuticas no combate e prevenção ao câncer. Os flavonoides são compostos orgânicos, extraídos de plantas, conhecidos pelas suas propriedades farmacológicas, dentre elas, a atividade anticarcinogênica. A família da *Olea europaea L.* conhecida como oliveiras, possui aplicação medicinal na região onde é cultivada. Neste trabalho foi avaliada a atividade citotóxica de três flavonoides (morina, naringina, rutina) e do extrato da folha de oliveira contra às linhagens leucêmicas: U937, THP-1 e linhagens de tumores sólidos: B16F10, SK-MEL-5, H460 via ensaio colorimétrico MTT e pelo índice da lactase desidrogenase (LDH) liberada pela célula após 48 horas de incubação. Estes ensaios mostraram que o composto morina e o extrato de oliveira reduziram a viabilidade celular de maneira concentração dependente nas linhagens tumorais. A análise por microscopia de fluorescência mostrou que o flavonoide morina e o extrato de oliveira foram os únicos efetivos em induzir morte por apoptose de maneira tempo e concentração dependentes nas linhagens U937, THP-1, SK-MEL-5, B16F10 e

H460. O mecanismo de morte celular por apoptose foi confirmado por análise do potencial de membrana mitocondrial e por caspases. Sendo assim, investigação das propriedades anticarcinogênicas e terapêuticas dos compostos morina, e do extrato de folha de oliveira como inibidores de proliferação celular e promotor de apoptose de células tumorais, bem como, interferências no metabolismo da celular sugerem a utilização destes compostos como fármaco na prevenção e tratamento do câncer.

## ABSTRACT

PEREIRA, Wander Lopes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014. **ANTITUMORAL ACTION IN VITRO OF THE OLIVE LEAF EXTRACT (*Olea europaea* L.) AND FLAVONOIDS MORIN, NARINGIN AND RUTIN IN CELL LINES CARCINOGENIC.** Adviser: Tania Toledo de Oliveira. Coadvisers: Marisa Alves Nogueira Diaz and Aloisio da Silva Pinto

Cancer is a chronic disease that affects thousands of people around the world, being aggressive and lethal, which justifies its high prevalence and can provide high rates of morbidity and mortality. In Brazil, in 2012, there were 321.000 new cancer cases and 190.000 deaths due to this disease. Because it is a disease that affects the world's population, produces cancer impacts on public health and the global economy, because the tumor reaches a portion of the economically active population, being of rapid development and high rates of metastasis and physical complications and psychological. The increased incidence of cancer in the world and its social, economic and public health encourages the scientific community in several countries, including Brazil, to develop research in order to investigate natural compounds which would be considered potentially therapeutic drugs to combat cancer. Flavonoids are organic compounds extracted from plants, known for their pharmacological properties, among them the anticarcinogenic activity. The family of *Olea europaea* L. known as olive, has medical applications in the region where it is grown. In this study, we evaluated the cytotoxic activity of three flavonoids (morin, naringin, rutin) and extract of olive leaf front of leukemic lines: U937, THP-1 and strains of solid tumors: B16F10, SK-MEL-5, H460 via MTT colorimetric assay and the index of lactase dehydrogenase (LDH) released by the cell objected 48 hours of incubation. These tests showed that the compound morin and olive extract decreased the cell viability of concentration-dependent manner in tumor cell lines. Analysis by fluorescence microscopy showed that the flavonoid extract of olive and morin were the only effective in inducing apoptotic death of time and concentration dependent manner the lines U937, THP-1 and SK-MEL-5. The mechanism of cell death by apoptosis was confirmed by analysis of mitochondrial membrane potential and caspases. Thus, research and therapeutic anticarcinogenic properties of the compounds morin, and olive leaf extract as inhibitors of cell proliferation and a promoter of

tumor cell apoptosis, as well as interference in cellular metabolism suggest the use of these compounds as a medicine for the prevention and cancer treatment.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma patologia decorrente de mutações gênicas espontâneas ou induzidas por agentes patogênicos que promovem desordens no equilíbrio fisiológico das células, ocorrendo excesso nas taxas de proliferação e deficiência nas taxas de morte celular, culminando com a formação de agrupamento de clones de células neoplásicas (QIAN *et al.*, 2011).

A organização mundial de saúde estimou que, no ano de 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos de incidência de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas com câncer, anualmente, com câncer. O maior efeito deste aumento vai incidir em países de baixa e média renda (INCA, 2012)

Epidemiologistas em câncer têm observado que a prevalência no mundo tem aumentado de maneira significativa no último século (GAROLFO *et al.*, 2004; SIEGELIN *et al.*, 2009). Em países com grande volume de recursos financeiros, predominam os cânceres de pulmão, mama, próstata e cólon. Em países de baixo e médio recursos, os cânceres predominantes são os de estômago, fígado, cavidade oral e colo do útero. Mesmo na tentativa de se criar padrões mais característicos de países ricos em relação aos de baixa e média rendas, o padrão está mudando rapidamente, e vem-se observando um aumento progressivo nos cânceres de pulmão, mama e cólon e reto, os quais, historicamente, não apresentavam essa importância e magnitude (INCA, 2012; MOUNTZIOS *et al.*, 2011).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 foram válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país.

Os cinco tumores mais incidentes, em 2012, para o sexo masculino foram o câncer de pele não melanoma (63 mil casos novos), próstata (60 mil), pulmão (17 mil), cólon e reto (14 mil) e estômago (13 mil). Para o sexo feminino, destacam-se, entre os cinco mais incidentes, os tumores de pele não melanoma (71 mil casos novos), mama (53 mil), colo do útero (18 mil), cólon e reto (16 mil) e pulmão (10 mil). As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as

maiores taxas, enquanto as regiões Norte e Nordeste, as menores. As taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário (INCA, 2012).

Os flavonoides são compostos polifenólicos, pigmentos naturais amplamente encontrados em vegetais, frutas, plantas, chás, sucos, e produtos à base de ervas que pertencem ao grupo dos fitoquímicos. Inúmeros estudos *in vivo* e *in vitro* indicam efeitos farmacológicos dos flavonoides na prevenção de doenças cardiovasculares, efeitos anticarcinogênicos e antioxidantes (MANDERY, 2010; AMADO *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, ocorreu um aumento no interesse científico de pesquisar compostos fitoquímicos com potencial antitumoral e de baixa toxicidade. Estes compostos interferem no ciclo de divisão celular, inibindo etapas do crescimento e proliferação das células cancerígenas, ativando mecanismos bioquímicos intracelulares de efeito antitumoral, o que os torna possíveis alvos de estudo farmacológicos (VIDYA, 2010; *et al.*, 2010; AMADO *et al.*, 2011; HUNG *et al.*, 2010).

Diante da alta incidência do câncer no mundo e do seu grau de morbidade e letalidade e a falta de tratamento terapêutico eficiente no combate ao câncer demonstra a importância em pesquisar novos compostos biofarmacêuticos que apresentem características anticarcinogênicas. A metodologia escolhida possibilitará identificar se os compostos testados bloqueiam a proliferação celular investigando a via metabólica de controle do ciclo celular.

Se comprovadas suas propriedades farmacológicas e antitumorais, estes compostos poderão, futuramente, ser usados como fármacos na prevenção e terapia do câncer.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

### 2.1 Câncer: conceito e aspectos gerais

O câncer é definido como uma enfermidade multicausal crônica, caracterizada pelo crescimento descontrolado das células teciduais. Sua prevenção cresceu em importância no campo da ciência, visto que, recentemente, foi apontada como a primeira causa de mortalidade no mundo. (GAROLFO *et al.*, 2004, PLANKAR *et al.*, 2011).

Segundo Adams & Cory, 2007, neoplasia é “uma massa anormal de tecido cujo crescimento excede e não está coordenado ao crescimento dos tecidos normais e que persiste mesmo cessada a causa que a provocou”.

Complementar ao conceito citado, Moore & Lyfe (2011) definem câncer como um complexo processo que leva ao crescimento descontrolado das células para formar um tumor que, em alguns casos, invade os tecidos adjacentes e se propaga por processos de metástases, podendo formar tumores secundários em outras partes do corpo.

Este conceito também é compartilhado por Ortega (2009), que define câncer como uma doença complexa, orquestrada por mutações que ativam os oncogenes, genes promotores de tumores, e inativam os genes supressores de tumores. Várias mudanças genéticas são descritas na tumorigênese tais como anomalias cromossômicas, polimorfismo genético e alterações epigenéticas (LIN *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Protooncogenes são genes que sintetizam proteínas que regulam o ciclo celular.

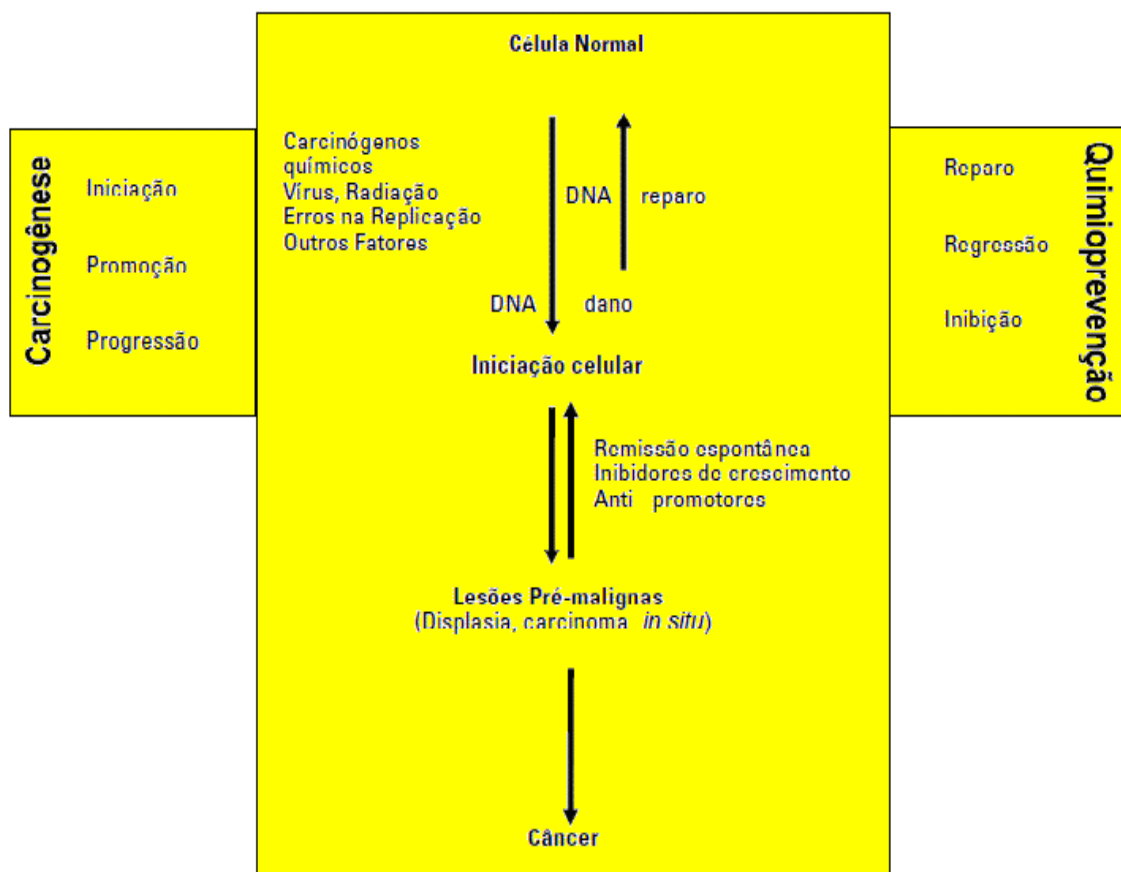
Os oncogenes codificam oncoproteínas, que são proteínas envolvidas em vias de sinalização que controlam a proliferação celular, enquanto que os genes supressores de tumores codificam proteínas que atuam em vias específicas da proliferação e/ou morte celular. (HAMEROFF, 2004; ORTEGA, 2009).

Alterações genéticas em grupos específicos dos protooncogenes, antioncogenes, promotores do crescimento e genes reguladores de apoptose induzem alterações metabólicas das células que levam à formação da massa tumoral. Mutações no genoma envolvendo um único gene e alguns poucos quilobases ou vários genes e inúmeros megabases do DNA, resultam em regiões amplificadas do cromossomo, provocando a superexpressão de determinados segmentos que levam à tumorigênese (RUSAK *et al.*, 2005, ORTEGA *et al.*, 2009).

Estudos experimentais propõem a divisão da carcinogênese em três estágios: iniciação, promoção e progressão. O estágio de iniciação é caracterizado por alteração do material genético, que pode ou não resultar em mutação. O estágio de promoção, caracterizado pela conversão da célula iniciada em pré-maligna, é um processo longo e reversível, sendo este um ponto estratégico para ação de agentes quimiopreventivos. A progressão da célula pré-maligna para célula maligna ocorre em consequência de dano adicional ao cromossomo. O resultado é a divisão celular incontrolada, resultante do aumento da autonomia celular (figura 02) (VOLP, *et al.*, 2008).

As características essenciais do câncer adquiridas pelas células que sofreram mutações que interferem na fisiologia normal são: inibição de apoptose ou morte celular programada, auto-suficiência quanto aos fatores de proliferação celular, insensibilidade aos inibidores de crescimento, habilidade invasiva tecidual, metastase, potencial replicativo ilimitado e angiogênese sustentável (MOORE & LYLE, 2011).

Já as características que diferenciam neoplasias benignas e malignas podem convenientemente ser discutidas sob quatro aspectos: (a) diferenciação e anaplasia; (b) taxa de crescimento; (c) invasão local; (d) metástase (RUSAK *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Visão esquemática do processo de carcinogênese (VOLP *et al.*, 2008).

A carcinogênese, então, pode ser compreendida como um processo complexo, envolvendo genes que regulam a estabilidade e o reparo do DNA e promovem o crescimento celular. Uma das causas relacionadas ao desenvolvimento neoplásico é o funcionamento inadequado de genes reguladores da divisão celular, tornando-os responsáveis pela proliferação anormal das células (JUNIOR, 2002; MOORE & LYLE, 2011).

## 2.2 O ciclo celular e a carcinogênese

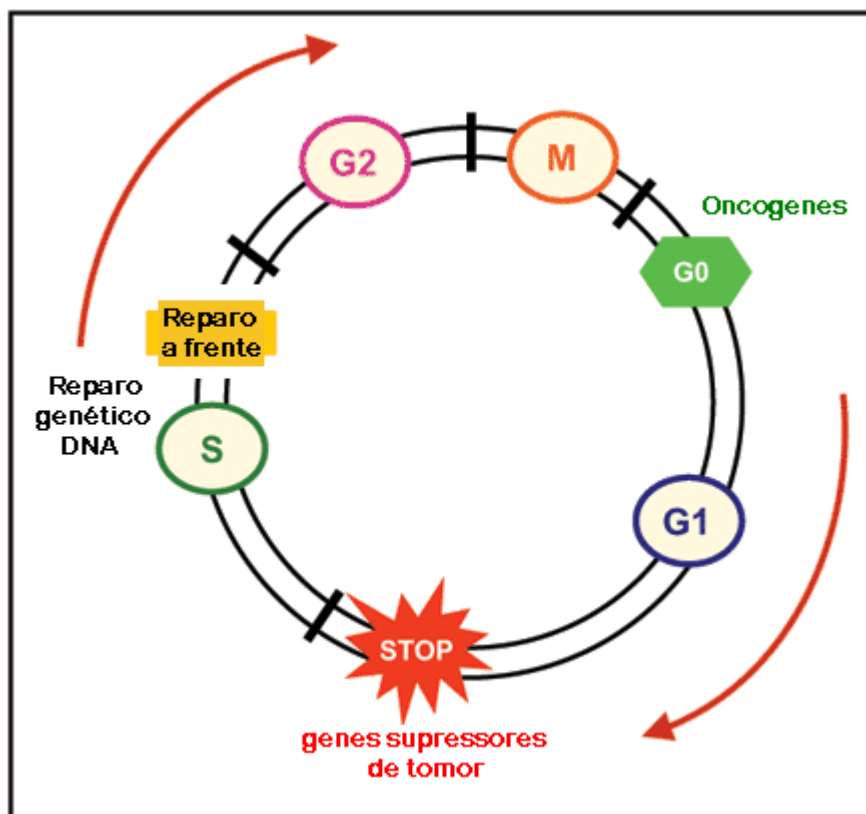
O ciclo celular é uma sequência de eventos que permite à célula crescer e replicar, duplicando seu material genético e distribuindo-o igualmente às suas células-filhas. Este processo compreende duas fases principais: a intérfase e a mitose. Na intérfase ocorre a duplicação do DNA e a preparação para a fase seguinte: a mitose, na qual ocorre a divisão celular propriamente dita. A mitose é crucial para o crescimento e diferenciação do organismo, levando o zigoto às aproximadamente 100 trilhões de células do

indivíduo adulto, participando inclusive dos processos de renovação celular (FOSTER, 2008).

O ciclo celular padrão de células eucarióticas é dividido em quatro fases com síntese de DNA e mitoses ocorrendo nas fases S e M, respectivamente (MADDIKA *et al.*, 2008). Na intérfase, intervalo entre o final de uma divisão mitótica, encontram-se três estágios: G1 (*Gap1*), S (*síntese*) e G2 (*Gap2*) (Figura 02). A fase em que as células estão temporária ou permanentemente fora do ciclo celular (quiescentes) é denominada G0. Durante o estágio G1 as células aumentam de tamanho sintetizando RNAs e proteínas. Um mecanismo importante de controle do ciclo celular é ativado durante este período para certificar que todo o material para a síntese de DNA esteja adequado (MOLINARI *et al.*, 2000; FOSTER, 2008).

É na fase S que ocorre a cópia idêntica da molécula de DNA. Os mecanismos que explicam a duplicação da molécula de DNA são complexos e envolvem a enzima ciclina-CDK2 que, imediatamente antes da síntese de DNA, fosforila proteínas específicas envolvidas na origem da replicação gênica. Estas proteínas são fatores licenciadores, os quais se ligam a determinados pontos da molécula de DNA, permitindo a deslicoidização da estrutura dupla-fita, a fim de que seja replicada. Os fatores licenciadores acumulam-se durante G1, atuam em S e são destruídos em G2 para impedir nova replicação antes da mitose. Durante o intervalo entre a síntese de DNA e a mitose (G2), a célula continua a crescer e sintetizar novas proteínas (VERMEULEN *et al.*, 2003).

Ao final deste intervalo, outro mecanismo de controle do ciclo celular (*G2 checkpoint*) verifica a necessidade de reparo dos erros da replicação do DNA antes da célula entrar em mitose. A perda do controle no *checkpoint* resulta na instabilidade genômica, no acúmulo de lesões da molécula de DNA e a proliferação celular não controlada, fenômenos estes que têm sido relacionados à progressão tumoral (ZHANG *et al.*, 2011).



**Figura 3.** Esquema representativo das fases do ciclo celular. G0, G1, S, G2 que compõem a interfase e a fase mitótica (M). Muitos cânceres causam mutações nos oncogenes e genes supressores de tumores. Divisões em células normais são requeridas para formar novas células durante o desenvolvimento e para repor células velhas e mortas. Em células normais, genes supressores de tumores bloqueiam G1 para parar ou diminuir o ciclo celular antes de alcançar a fase S. Genes de reparo do DNA são ativados por todo o ciclo celular, particularmente durante G2 depois da replicação do DNA e antes da mitose (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

### 2.2.1 Controle bioquímico do ciclo celular

O ciclo celular é controlado por vários mecanismos que garantem a divisão correta da célula. Estes mecanismos compreendem a regulação da quinase-dependente de ciclina (CDK), inibidores de CDK e reações de fosforilação. As proteínas p16, p21, p27, que são proteínas que pertencem à família das CDKI, impedem a formação do complexo ativo ciclina/CDK inibindo negativamente esta reação (VERMEULEN *et al.*, 2003, FOSTER, 2008).

A homeostasia da célula é regulada por vias de sinalização que promovem a proliferação celular, suspensão do crescimento e a apoptose

(morte celular). As proteínas ciclinas, que controlam o ciclo celular em diferentes pontos, se constituem em subunidades regulatórias de complexos de proteínas quinases; as subunidades quinases destes complexos são chamadas quinaseciclino-dependentes (CDKs). As CDKs ativam a proteína Rb via fosforilação promovendo, assim, a progressão do ciclo celular. Entretanto, no estado hipofosforilado, a Rb liga-se firmemente a um fator inibidor de transcrição (E2F) e forma um complexo silenciador da transcrição de genes requeridos para entrada no ciclo celular. A síntese de ciclinas tipo D e enzimas associadas (CDK4 e CDK6) são essenciais para a síntese de DNA e de genes da ciclina-E e CDK2, cuja ação é manter o estado de fosforilação de Rb e a progressão do ciclo celular. Sendo assim, o material genético deve estar livre de alterações para que se dê início ao processo de replicação do DNA. Células cujo DNA foi danificado (mutações), situação encontrada em um grande número de cânceres, desencadeiam um ciclo celular defeituoso (FORSTER, 2008).

A proteína p53 é um importante regulador (*checkpoint*) durante a progressão G1-S. Esta proteína, uma vez ativada, libera a proteína p21, um inibidor do complexo ciclinaquinase, promovendo um bloqueio na fase G1-S para que seja efetivado o reparo do DNA. Este bloqueio é de fundamental importância para permitir o reparo do DNA danificado antes que ocorra sua duplicação. Durante a divisão celular o alinhamento dos cromossomos metafásicos deve ser devidamente processado. Caso todos os cromossomos não estejam ligados ao fuso mitótico, as células filhas não foram idênticas. Esta segregação errônea das cromátides irmãs leva às distribuições cromossômicas anormais, bem como a rearranjos e ampliações de determinadas regiões. Estes distúrbios na distribuição cromossomal e alterações moleculares dos genes são, então, as bases para a gênese tumoral (HAMEROFF, 2004; FOSTER, 2008).

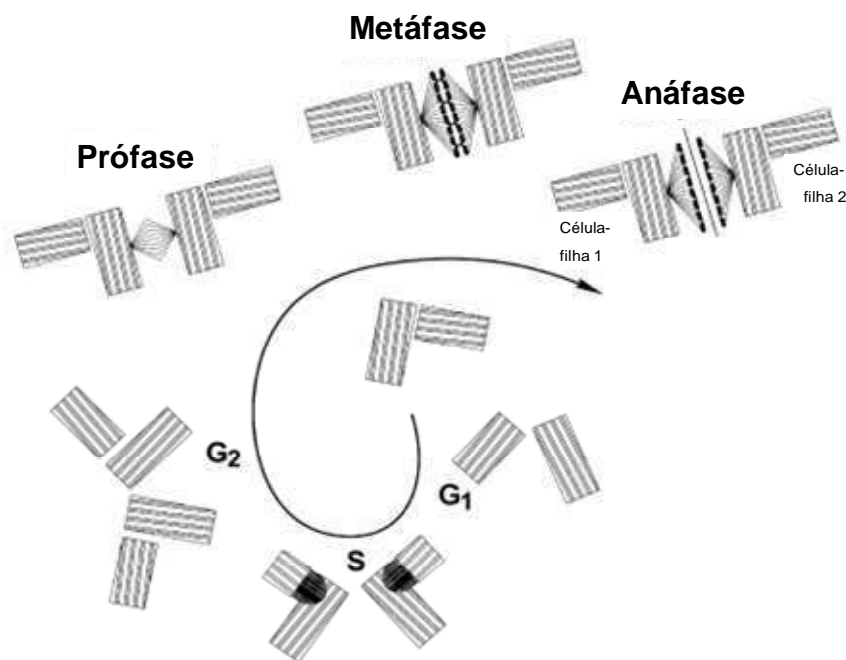
### **2.3 A origem do câncer**

As células malignas dividem-se e multiplicam-se incontrolavelmente: elas escapam dos mecanismos de autodestruição e estimulam a formação de vasos sanguíneos para sua própria manutenção, podendo invadir tecidos e

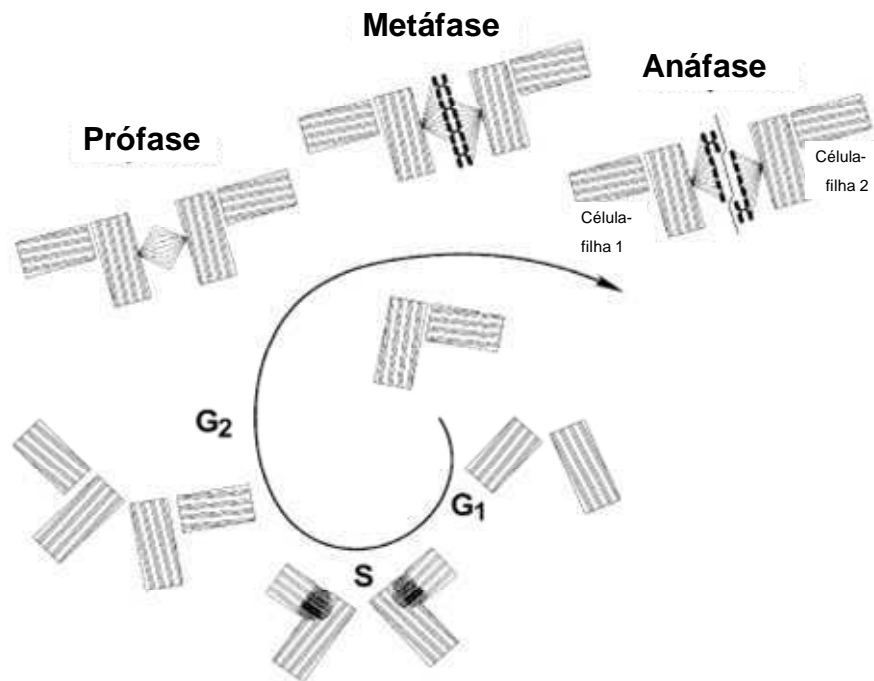
promover metástase. Elas possuem orientação própria, sendo que, no caso de câncer, o processo pelo qual a orientação genética leva aos tipos de células específicas é perdido (JARIWALLA *et al.*, 2005; HAMEROFF, 2004).

Nos primórdios do século 20, o biólogo Alemão Teodor Boveri observou células normais e tumorais em divisão celular. Enquanto células normais apresentavam divisões simétricas e bipolares dos cromossomos de forma igualitária (figura 04), as células cancerígenas agiam de forma diferente, mostrando divisão desequilibrada dos cromossomos, com assimetria e distribuição desiguais.

Boveri sugeriu que processos aberrantes em mitoses provocariam distribuição irregular dos cromossomos, sendo que algumas distribuições anormais seriam invisíveis enquanto outras levariam à diferenciação de carcinomas com proliferação descontrolada (Figura 05). Ele estabeleceu que a instabilidade gênica condiciona, conseqüentemente, mitoses anormais, resultando na gênese de tumores (HAMEROFF, 2004).



**Figura 4.** Modificação dos centríolos no ciclo de divisão e mitose em células normais. Centro: centríolos têm dois cilindros perpendiculares. No sentido horário do centro (G1, S e G2, ocorrem durante a interfase o qual precede e segue a mitose). Em fase G1, centríolos cilíndricos separados. Em fase S, centríolos replicados, em fase G2, centríolos separados e começando a migrar seguindo as fases de prófase, metáfase e anáfase. Distribuição dos cromossomos às células filha simetricamente correta (HAMEROFF, 2004).



**Figura 5.** Atividade anormal de centríolos em mitoses levando a aneuploidias. Durante a metáfase os centríolos/eixo de ligação da cromatina está defeituoso e assimétrico levando a má distribuição dos cromossomos na anáfase das células filhas (HAMEROFF, 2004)

## 2.4 Alterações Bioquímicas no Câncer

### 2.4.1 Metabolismo de carboidratos em células carcinogênicas

O primeiro estudo sobre metabolismo energético em tumores foi realizado por Warburg (1923) com fatias de tecido vivo, onde ele observou padrões específicos do metabolismo em tumores; enquanto em células normais de tecidos a produção de ácido láctico ocorria exclusivamente na privação de oxigênio, o mesmo não aconteceu em células tumorais ablacionadas, cuja produção de lactato ocorria na presença de oxigênio (PHILIPP *et al*, 2010; FERREIRA, 2010).

Existem dois tipos de processos metabólicos através dos quais células de mamíferos obtêm energia: fermentação láctica e respiração aeróbica. Glicose é o substrato metabólico preferido pela maioria das células normais de mamíferos e sua entrada no citoplasma e/ou na mitocôndria fornece energia e síntese de compostos importantes para manutenção, agregação e /ou proliferação celular. No citoplasma, as reações da glicólise oxidam o esqueleto

carbônico da glicose em duas moléculas de piruvato, produzindo dois moles de ATP e NADH por mol de glicose consumida. Quando a célula tem suprimento limitado de oxigênio ou apresenta deficiência genética que impede a oxidação do piruvato na mitocôndria, o piruvato glicolítico é reduzido a lactato no citoplasma pela lactato desidrogenase. A respiração aeróbica, processo que ocorre na presença de oxigênio, tem um rendimento energético maior do que a fermentação láctica (HERST *et al.*, 2010; SANCHEZ-ARAGÓ *et al.*, 2010).

Células normais diferenciadas têm uma baixa demanda de esqueleto carbônico e de energia para sustentar suas atividades metabólicas quando comparadas com células proliferativas. No entanto, células diferenciadas baseiam-se principalmente na fosforilação oxidativa mitocondrial para obter a energia necessária para manter suas atividades (ORTEGA *et al.*, 2009).

Vários estudos têm fornecido evidência funcional do metabolismo aeróbico anormal de glicose em células cancerígenas e tumores. Diferentes tumores humanos implantados em ratos revelaram que carcinomas têm um consumo de glicose aumentado (apesar de baixa oferta de oxigênio) e uma taxa alta de produção de lactato, quando comparados com tecidos normais. A alta atividade glicolítica em gliomas (tumores em células da glia) vem sendo demonstrados *in vivo* pela ressonância magnética e comprovadas, recentemente, por tomografia usando glicose análoga 2-desoxy-2- flúor-D- glicose (FDG) *in vivo*. Muitos carcinomas humanos têm a demanda de glicose aumentada quando comparados com tecidos normais circundantes. Além disto, um aumento da absorção de FGD em carcinomas de pulmão, tireóide, mama, sarcoma linfoma e gliomas é um indicativo significativo de má evolução do paciente portador de câncer (ORTEGA *et al.*, 2009).

Este fenótipo glicolítico em tumores está exacerbado devido a alterações em oncogenes, em pro-oncogenes e genes supressores de tumor o que aumenta sinais promotores do crescimento e diminui os inibidores de crescimento (GATENBY *et al.*, 2005). Desta forma, tanto a glicólise aeróbica quanto a expressão e translocação de transportadores de glicose podem ser estimulados por um grande número de fatores oncogênicos como HIF-1, c-Myc e Akt exercendo um papel importante no aumento da captação de glicose no tumor e, conseqüentemente, na metástase (GOTTLIEB, 2009).

Vários trabalhos relatam que células cancerígenas apresentam um notável conteúdo de glicogênio. Uma das enzimas envolvidas na síntese de glicogênio é a glicogênio sintase, a qual pode ser inativada através da fosforilação pela glicogênio kinase-3 (GSK-3), uma enzima regulatória multifuncional. Uma das características do câncer é a atividade reduzida da GSK-3 e, como esta enzima diminui a síntese do glicogênio pela inativação da glicogênio sintase, as células cancerígenas estocam o glicogênio em quantidades anormais. Recentemente, o interesse em estudar a estocagem de glicogênio pelas células cancerígenas vem aumentando, uma vez que este mecanismo influencia respostas inflamatórias, migração celular e regulação da adesão entre as células, processos que estão bem estabelecidas no câncer. Na realidade, é conhecido que a enzima GSK-3 atua como supressor de crescimento tumoral através da interferência com o potencial metastático e a apoptose (JOPE *et al.* 2007; JONES *et al.*, 2009).

A via das pentoses fosfatos (PPP), outra importante via para o consumo de glicose que pode levar à produção de ácido láctico via reabastecimento de intermediários da glicólise (NELSON & COX, 2008). Começando com glicose 6-fosfato, NADPH e ribose 5-fosfato são produzidos, algo que não é possível nem pela glicólise nem pela oxidação completa da glicose. O NADPH é um composto essencial para manter às altas taxa de síntese de ácidos graxos observada em células tumorais, resultado da superexpressão de enzimas relacionadas e é um bloqueador de espécies reativas de oxigênio (ROS) (FERREIRA *et al.*, 2010; KROEMER *et al.*, 2007). Por outro lado, ribose 5-fosfato é um precursor de bases nitrogenadas que compõem os ácidos nucleicos e sua biossíntese é uma constante demanda em células proliferativas. De fato, estudos usando células MCF10 mostram que a quantidade de glicose desviada pela PPP progressivamente aumentou com a transformação carcinogênica (FERREIRA, 2010).

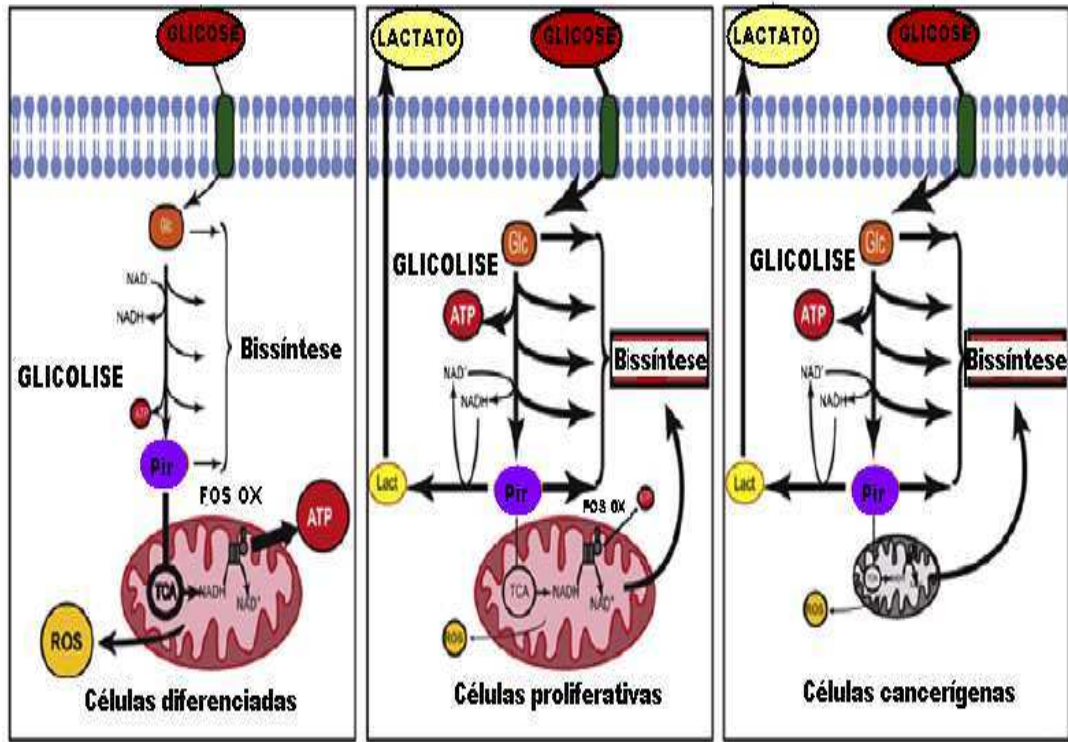
## 2.4.2 Alterações nas mitocôndrias de células carcinogênicas

Mitocôndria é uma organela celular onde a energia contida nas moléculas ingeridas na forma de alimento é transformada em energia para a célula. Essa reação utiliza como combustível o oxigênio proveniente da respiração, gerando como resíduos, as chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs) ou radicais livres. O oxigênio atua em organismos aeróbicos comoceptor final de elétrons em processo respiratório sendo, desta forma, estável, mas durante processos oxidativos biológicos ou em circunstâncias patológicas incluindo câncer, reações inflamatórias, desordens cardiovasculares, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, catarata e diabetes pode ser transformado nas seguintes espécies: ânion superóxido ( $O_2^-$ ) Radical de hidroxila (OH) superóxido ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que são responsáveis por danos celulares. Os Eros podem ser definidos como qualquer espécie química capaz de existência independente, que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, desta forma são altamente reativos e capazes de atacar biomoléculas. A formação desses compostos é determinada pela perda ou ganho de elétrons apresentando assim elétrons desemparelhados dos diferentes átomos (MACHADO *et al.*, 2008). Esses (EROs) podem agir como desencadeadores do câncer causando danos ao DNA, acarretando erros na produção das proteínas (FERREIRA, 2010).

O comprometimento da função mitocondrial em células tumorais tornou-se recentemente um assunto de extenso debate. Pesquisas comprovam que, na presença de oxigênio, células tumorais consomem uma grande quantidade de glicose e produzem uma grande quantidade de lactato quando comparado a células normais e atribuem o metabolismo aeróbico anormal do câncer a um comprometimento da função da mitocôndria, sugerindo que esta mudança metabólica é um importante evento na tumorigênese (SHULZ *et al.*, 2006).

Um grande número de estudos mostrou que a enzima piruvato desidrogenase, presente em mitocôndrias de células tumorais, cineticamente assemelha-se com as de tecidos embrionários e promovem a descarboxilação anormal do piruvato em acetoína, um produto que competitivamente inibe a oxidação do piruvato por desidrogenase tumoral. O ciclo do ácido cítrico em

mitocôndrias tumorais mostrou-se parcialmente truncado ao nível de conversão em citrato, o que favorece a formação de lactato. Uma recente abordagem proteômica demonstrou uma deficiência no ciclo do ácido cítrico em amostras de câncer de colorretal (PATHANIA *et al.*, 2009).



**Figura 6.** Fluxo de produção de energia e biossintese de compostos em processos de diferenciação celular, proliferação celular e câncer. Em células diferenciadas o fluxo de glicólise é diminuído porque a demanda de precursores de síntese de compostos é baixa e existe uma alta produção de energia pela oxidação do piruvato na fosforilação oxidativa mitocondrial. Esta situação, a atividade mitocondrial produz uma grande quantidade de radicais livres que são normalmente quelados pelos compostos antioxidantes celular. Em células proliferativas e cancerígenas existe uma alta demanda de glicose para suprir a biossintese de macromoléculas das células filhas e porque a maioria da energia requerida para as reações anabólicas provém de vias anabólicas anaeróbicas como a glicólise. A atividade mitocondrial limitado nestas situações diminui a produção de radicais livres. Células cancerígenas têm menos componentes e/ou atividade mitocondrial por reprimir a biossintese da mitocôndria (ORTEGA *et al.*, 2009).

A consequência fisiológica com o aumento da produção de ácido láctico é a diminuição do pH intersticial observado em células tumorais. Vários estudos confirmam uma invasão tumoral mediada por acidose. Acido láctico estimula a produção de ácido hialurônico, uma glicosaminaglicona, e a

expressão de CD44, seu receptor transmembranar principal. Quando o ácido hialurônico se liga ao CD44 na superfície da célula, aumenta a progressão maligna por redução da aderência celular (FERREIRA, 2010). Além disto, pH baixo induz a remodelagem de sistemas chamados de metaloproteína, proteases lisossomais e hialuronidasas, aumentando as chances de metástase (FISCHER *et al.*, 2007).

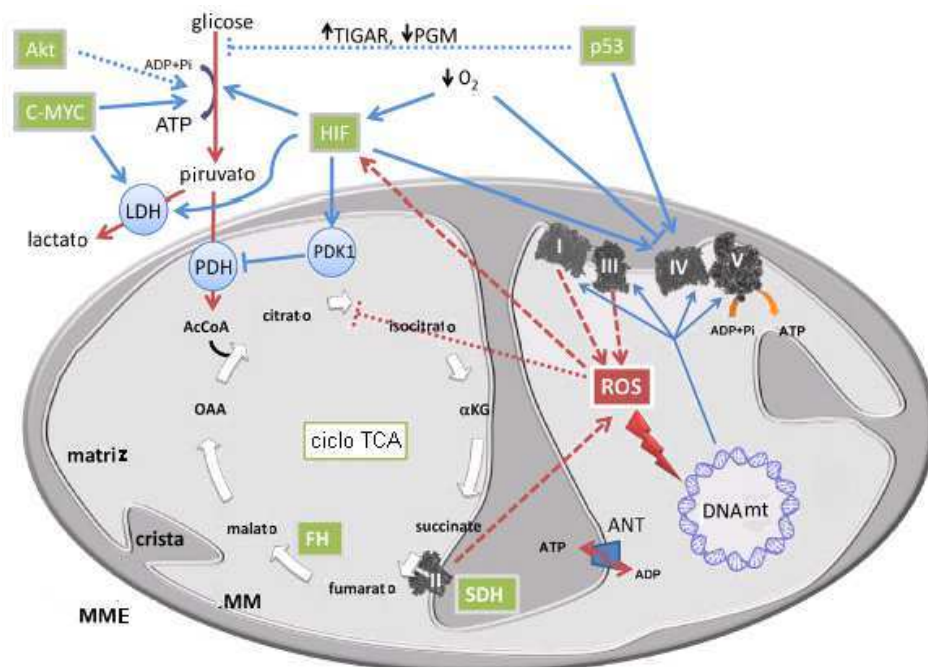
Deficiências de complexos enzimáticos da cadeia respiratória e fosforilação oxidativa em células cancerígenas tem sido descritas, incluindo a expressão exacerbada da HIF1 (fator induzido por hipóxia), a qual é um inibidor fisiológico da ATPase mitocondrial. HIF-1 é um fator transcricional que funciona como um regulador da homeostasia do oxigênio, cujo alvo é o DNA que media uma resposta adaptativa regulada pela concentração de O<sub>2</sub>. Em células cancerígenas tanto a hipóxia intracelular quanto alterações genéticas aumentam a atividade de HIF-1 levando a uma resposta celular pela indução de genes para sua sobrevivência, como proteínas que têm papel chave no desenvolvimento crítico e em processos fisiológicos, incluindo transportadores de glicose (GLUT), VEGF, enzimas envolvidas com metabolismo de glicose, fatores hematopoiéticos (transferrina e heritropoietina) transportadores de íons, além de proteínas envolvidas com a proliferação e a sobrevivência celular (MYLONIS *et al.*, 2010; FREZZA & GOTTLIEB, 2009; DE BERNARDINIS *et al.*, 2008). A atividade de HIF-1 $\alpha$  não somente estimula a glicólise, induzindo a transcrição de genes e a tradução de numerosas enzimas glicolíticas, mas também atenua a atividade mitocondrial, destacando-o como um regulador do metabolismo celular em cânceres (YOUNG & ANDERSON, 2008)

Outra proteína que está presente nas células tumorais regulando seu metabolismo energético é a Akt. A Akt fosforilada estimula o consumo de glicose em células tumorais sem afetar a taxa da fosforilação oxidativa e o estímulo ao consumo de glicose se deve, neste caso, pelo aumento da atividade da enzima glicolítica que está associada á mitocôndria, a hexocinase, responsável pela fosforilação da glicose 6-fosfato (Figura 06) (YOUNG & ANDRESON, 2008)

Nas células tumorais também são encontradas Myc, que são ativadas em várias vias de sinalização importante no controle do crescimento celular e

tumorgênese. Entre muitos alvos para Myc estão os genes da glicólise o que leva ao aumento nas taxas da produção de lactato, mesmo sob condições aeróbicas por superexpressar a enzima lactato desidrogenase A (LDH-A) (FREZZA & GOTTLIEB, 2009).

Mitocôndrias de células cancerígenas têm menos cristas mitocôndrias do que em células normais. O complexo protéico da cadeia respiratória mitocondrial apresenta atividade diminuída em câncer devido à diminuição da expressão de subunidades codificadas pelo DNA mitocondrial (Figura 06). Além disto, mutações em genes nucleares envolvidos em transdução de energia mitocondrial, tais como as fumarase e succinato desidrogenases, podem causar predisposição a alguns tipos de síndromes neoplásicas (FREZZA & GOTTLIEB, 2009).



**Figura 7.** Mitocôndria como um alvo para múltiplos eventos de transformação metabólica: Principais transformações metabólicas em células cancerígenas são induzidas pela reprogramação genética e mudanças ambientais. A ativação de oncogenes da Akt e Myc e a perda dos genes da p53 supressores de tumor são os eventos mais freqüentes em câncer. Além disto, todos os tumores sólidos são expostos ao estresses oxidativo e a hipóxia o que ativa a HIF, que provocam mudanças dramáticas no metabolismo mitocondrial desviando a via do metabolismo oxidativo para a via glicolítica. Complementando, lesões genéticas diretas a molécula de DNA mitocondrial ou alterações na codificação de enzimas mitocondriais nucleares como a fumarato desidrogenase e na succinato desidrogenase (FS e SDH) podem diretamente revogar a fosforilação oxidativa em câncer (FREZZA & GOTTLIEB, 2009).

Em 2008, Lopes-Lazaro propôs que células cancerígenas têm um metabolismo desóxico: ao invés de reduzir em H<sub>2</sub>O via fosforilação oxidativa, oxigênio é transformado em ROS superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e hidroperóxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ativando a via glicolítica e formação de ácido láctico. ROS superóxido provoca a alcalinização intracelular sem comprometer a integridade celular, consumindo prótons da redução de O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e estimulando PKF-1, uma enzima chave da glicólise (FERREIRA, 2010). A produção de EROS pelo complexo III da cadeia respiratória parece está envolvida na estabilidade da HIF-1 durante a hipóxia. Como hipóxia aumenta a formação de ROS, a ativação do complexo III, então diminuiu a conversão de piruvato em Acetil-ScoA, diminuindo os níveis de fosforilação oxidativa (KLIMOVA & CHANDEL, 2008).

### **2.4.3 Via canônica da Wtn e câncer**

A via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina desempenha um papel essencial no desenvolvimento embrionário, na regulação da proliferação, na migração e na arquitetura celular e tecidual, sendo também, importante na homeostasia de tecidos em organismos adultos. Porém, a desregulação desta via desencadeia atividades que estão intimamente ligadas à carcinogênese (ZHANG *et al.*, 2011).

A sinalização da Wnt pode ser classificada em duas vias: canônica e não canônica. A via não canônica atua de forma independente de  $\beta$ -catenina (MCDONALD & SILVER, 2009).

A via canônica de Wtn tem a proteína  $\beta$ -catenina como componente central. Na ausência da Wnt, a  $\beta$ -catenina é fosforilada na região amino terminal por um complexo de proteínas que consiste em axin, glicogênio síntese quinase-3 (GSK-3), coli polipose adenomatosa (APC) caseína quinase 1 (CK1). A  $\beta$ -catenina fosforilada é reconhecida pela  $\beta$ -TrCP, um componente do complexo da E3 ubiquitina ligase, que promove a sua ubiquitinação seguida de degradação (ZHANG, *et. al*, 2011). Sendo assim, a principal função desta via é regular a proteólise da  $\beta$ -catenina através da fosforilação e degradação via ubiquitina-proteosoma evitando seu acúmulo citoplasmático (McDONALD & SILVA, 2009).

A proteína ligante Wnt associada ao seu receptor induz a dissociação do complexo de destruição da  $\beta$ -catenina, o que diminui a sua fosforilação e subsequente degradação. Sendo assim, a  $\beta$ -catenina citoplasmática é translocada para o núcleo onde se liga a fatores de transcrição e genes de expressão da atividade da Wtn. Portanto, regulação inapropriada e ativação desta via estão associadas com várias doenças degenerativas, incluindo câncer. Recentes estudos têm demonstrado que a via Wnt5a pode aumentar a motilidade de células malignas e a invasão tumoral tais como: câncer de mama, melanoma e câncer gástrico (AMADO, *et al.*, 2011).

## **2.5 Angiogênese**

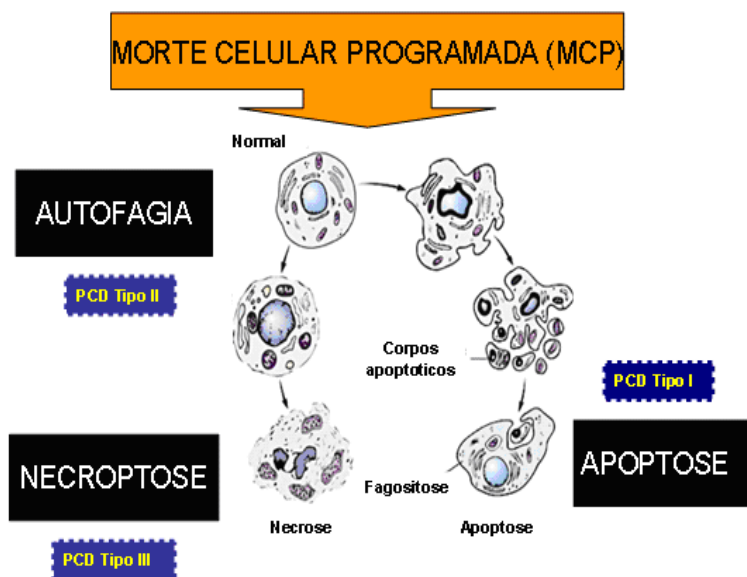
A angiogênese é um processo fisiológico definido como a formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes que ocorre durante a formação de novos tecidos, onde são requeridos nutrientes e oxigênio para o crescimento celular. Este processo é, portanto, crucial em estágios tumorais tais como: crescimento, invasão e metástase. No entanto, a angiogênese em tumores é bastante diferente daquela vista em tecidos normais, apresentando vasos vazantes com diâmetro irregular e paredes finas, com fluxo sanguíneo aberrante e áreas de necrose (RAMOS, 2008).

As células tumorais começam a promover a angiogênese já nas fases iniciais da tumorigênese. O processo de angiogênese é resultado do balanço entre fatores estimulatórios, como o VEGF (fator de crescimento de célula endotelial vascular), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF- $\alpha$  e  $\beta$ , FGF-2 (fator de crescimento de fibroblastos tipo 2) e citocinas pró-inflamatórias como TFN- $\alpha$  (fator de necrose tumoral –  $\alpha$ ) e fatores inibitórios como interferons, angiostatinas, endostatina, trombospondina e inibidores de metaloproteinases. Ao longo da transformação maligna, há aumento da expressão das proteínas pró-angiogênica e diminuição das proteínas supressoras da angiogênese, algumas delas controladas por TP53 (KERBEL & FOLKMAN, 2002).

## 2.6 Mecanismos bioquímicos da Morte Celular Programada

O mais importante processo de regulação de crescimento das células é o programa de morte celular (MCP), processo evolucionariamente conservado que decide o destino da célula e que vem atraindo crescente atenção no tratamento do câncer (LIU *et al.*, 2011; CRIMI & ESPORTI, 2010).

Os programas que melhor caracterizam a morte celular são apoptose (tipo I de MCP) e autofagia (tipo II de MCP), sendo estas duas vias principais mediadas por receptores e por sinalização mitocondrial (CRIMI & ESPORTI, 2010). O Tipo I de MCP é crítico para a auto-destruição celular por uma variedade de processos, tais como o desenvolvimento ou prevenção de transformação oncogênica. Existe ainda o tipo III de MCP ou necroptose que também serve para desencadear a morte da célula (PORTT *et al.*, 2010; EISENBERG *et al.*, 2009). Apesar de apoptose e autofagia terem características morfológicas e processos fisiológicos distintos, existe uma intrincada colaboração entre eles (LIU *et al.*, 2011; ANDREW, 2008). Recentes estudos têm salientado que apoptose e autofagia podem estar interconectadas e mesmo simultaneamente reguladas pelo mesmo processo em células tumorais (LIU *et al.*, 2011; CHENG *et al.*, 2009).



**Figura 8.** Tipo I de morte celular programada (MCP) ou apoptose. Outras formas alternativas de MCP incluem tipo II (autofagia) e tipo III (Necrose) (FERREIRA *et al.*, 2004).

### 2.6.1 Vias de sinalização em câncer: Autofagia e apoptose

É crescente a constatação da importância da via de autofagia em respostas fisiológicas ao estresse bem como em processos patofisiológicos tais como o câncer, doenças neurológicas e cardiológicas a partir do grande número de publicações que retrataram o assunto em 2010 (CHERRA *et al.*, 2010; MORSELLI *et al.*, 2010; MADEO *et al.*, 2010). Acredita-se que a autofagia basal funciona inibindo o desenvolvimento tumoral, enquanto que a autofagia em excesso ocorre em células tumorais estressadas pelo tratamento quimioterápico. Assim, inibidores de autofagia são atualmente usados e muitos outros são desenvolvidos para servir como adjuvantes para quimioterápicos (LIU *et al.*, 2011, MORSELLI *et al.*, 2009).

Autofagia, processo pelo qual células reciclam constituintes celulares, é uma adaptação crítica ao jejum e desempenha um importante papel na função normal das células e na morte celular programada (MADEO *et al.*, 2010). Em nível macromolecular, a autofagia envolve a formação e emersão subsequente de constituintes celulares destinados à reciclagem dentro dos autofagossomas. Os autofagossomas maduros fundem-se com lisossomas para formar autofogolisossomas e a carga celular é, então, degradada em elementos básicos para a síntese de novos componentes celulares e/ou usados para produção de energia celular (KROEMER & LEVINE, 2010).

Estudos têm mostrado que a autofagia protege as células de estresses, incluindo o estresse encontrado em várias doenças como esquemia cardíaca e câncer (CHEN & DEBNATH, 2009; CHENG *et al.*, 2009, PORTT *et al.*, 2010).

A apoptose, que em grego significa “apo” a partir de e “ptose” falha, é caracterizada pelo encolhimento das células que são a seguir fagocitados por células vizinhas, podendo formar corpos apoptóticos. As alterações morfológicas observadas são consequências de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados. A morte fisiológica da célula, conhecida como apoptose, desempenha um papel importante na homeostasia e no desenvolvimento do organismo multicelular, livrando-se de células danificadas ou infectadas que podem interferir no seu funcionamento normal. O desequilíbrio entre a proliferação celular e morte

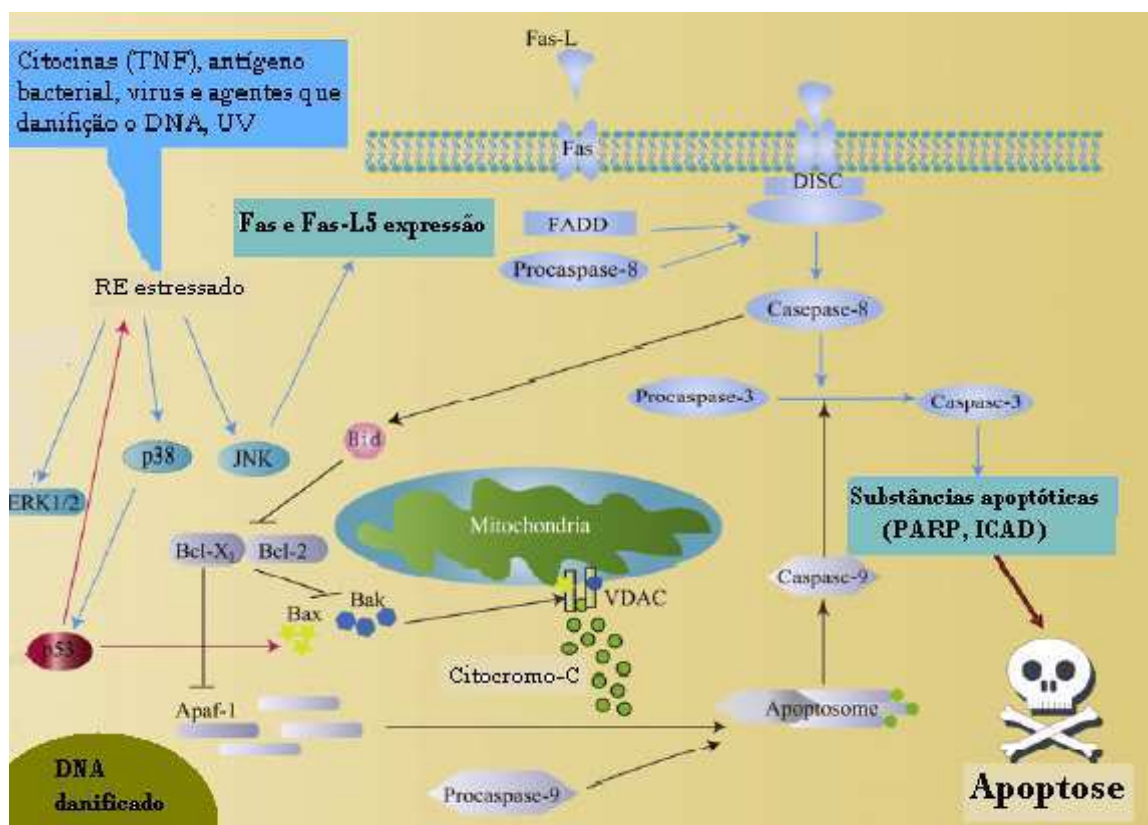
celular apoptótica resulta em uma série de doenças como, por exemplo, o câncer (PORTT *et al.*, 2010; RUSAK *et al.*, 2005; CHI *et al.*, 2003).

São duas as principais vias envolvidas no mecanismo bioquímico da apoptose: extrínseca e intrínseca. A via extrínseca é mediada por um subgrupo da superfamília de receptores de fator de necrose tumoral (FNTr), que incluem Fas e TRAIL. A ativação destes receptores leva ao recrutamento e ativação de caspases iniciadoras, tais como as caspases 8 e 10. Este processo envolve a formação e a ativação de complexos tais como DISC (complexo sinalizador e indutor de morte) e que, por sua vez, promove a ativação das caspases efetoras, como por exemplo, a caspase 3 (BRAS *et al.*, 2005; FULDA, 2009; DUPREZ *et al.*, 2009, WHELAN *et al.*, 2010). A caspase 3 ativa é responsável pela clivagem dos assim chamados substratos da morte, que levam à morte celular, incluindo a fragmentação do DNA nuclear e da membrana e a outras mudanças bioquímicas (WHELAN *et al.*, 2010;).

A via intrínseca da apoptose é largamente centrada e/ou regulada pela mitocôndria. O mecanismo mais amplamente estudado desta via é a liberação do citocromo C mitocondrial que recruta Apaf-1 e procaspase-9, resultando na formação de complexo chamado apoptosoma. A seguir, inicia-se uma cascata de reações envolvendo as caspase 9 e 3, que clivam substratos apoptóticos tais como PARP, que promove a morte celular apoptótica (PORTT *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2011). Contudo, estas duas vias de sinalização e a via final das caspases são reguladas por várias proteínas, tais como: p53, Bcl2, NFkB e MAPKs que funcionam em vias comuns.

A proteína p53, um fator de transcrição nuclear, pode atuar prevenindo o aparecimento de células anormais. A p53 tem como função fisiológica à regulação do ciclo celular podendo promover a interrupção do mesmo ou a apoptose em resposta ao dano no DNA. Algumas investigações clínicas indicam que em situações anormais, tais como quimioterapia e UV, o DNA danificado pode ativar a expressão da proteína p53 resultando em parada do ciclo celular. Se o dano não for reparado completamente, uma ativação exacerbada da p53 leva à estagnação do crescimento tumoral ou a apoptose (WANG *et al.*, 2011). Quando o gene p53 apresenta-se multado pode comprometer o sinal principal apoptótico que a mitocôndria recebe na via intrínseca favorecendo a carcinogênese (YU *et al.*, 2003).

A proteína p53 promove a morte celular ativando vários reguladores de apoptose da família de receptores DR5 e da família das proteínas Bcl-2 (LIU *et al.*, 2011). Além da proteína p53, as proteínas da família Bcl-2, que participam de múltiplos processos celulares, podem ser amplamente usadas como drogas alvos para tratamento pré-clínico e clínico de câncer. Os membros da família Bcl-2 podem ser divididos em proteínas pro-apoptose (Bax e Bak) e proteínas anti-apoptose (Bcl-2 e Bcl-X1), que desempenham um papel antagônico na regulação da apoptose. Devido às diversas vias de regulação apoptótica, diferentes subfamílias, quando induzidas, contribuem para distinguir resultados pro-tumorgêneses ou pro-morte celular (ADAMS & CORY, 2007; KROEMER *et al.*, 2007).



**Figura 9.** Modelo sobre a via de sinalização da apoptose. Pela via extrínseca, ocorrerá a ativação de receptores de membrana, transmitindo sinais para o interior da célula e ativando inicialmente a caspase-8 ou caspase-10. A via intrínseca, ativada por estresse celular, é mediada pela liberação do citocromo c pela mitocôndria, levando à ativação da caspase-9. Essas duas vias levam à ativação da caspase efetoras 3 (vias coloridas de cinza) (LIU *et al.*, 2011).

## **2.6.2 Apoptose induzida pelo estresse do Retículo Endoplasmático Rugoso**

Várias condições fisiopatológicas como hipóxia, depleção de cálcio, injúria oxidativa, hipoglicemia e infecção viral podem afetar o equilíbrio do retículo endoplasmático rugoso (RER) e interferir na montagem adequada de proteínas, causando, em última análise, um desequilíbrio entre a montagem da proteína cargo e sua capacidade funcional. Esta condição celular é conhecida como “estresse RER” (VERFAILLE *et al.*, 2010).

O RER é uma organela celular crucial na biossíntese de compostos importantes na sinalização de funções em células eucarióticas. Esta organela é responsável pela síntese, montagem e modificações pós-traducionais em proteínas destinadas à via secretória. Estas proteínas, no RER, são assistidas por várias chaperonas como, por exemplo, a BiP e proteína dissulfeto isomerase (PDI) (SCHROTHER & KAUFMAN, 2005;).

O estresse RER é inicialmente moldado para restabelecer o equilíbrio interno do RER através da ativação de uma via intracelular de transcrição, denominada resposta a proteínas desdobradas (unfolded protein response, UPR). Entretanto, quando a condição de estresse no RER for muito grave e prolongada ou não pode ser resolvida, a via UPR muda a resposta de pro-sobrevivência para pro-morte celular, geralmente culminando na ativação da via intrínseca da apoptose. Além disto, evidências científicas implicam a via de estresse RER na ativação de vários processos inflamatórios e em torno de microambientes tumorais. De fato, a via de estresse RER, em algumas modalidades experimentais, mostrou promover imunidade anti-tumoral por aumentar a imunogenicidade em células cancerígenas (VERFAILLE *et al.*, 2010; GHOSH *et al.*, 2010).

## **2.7 Linhagens de células carcinogênicas testadas**

### **2.7.1 Leucemias**

As leucemias são neoplasias malignas que acometem as células do sangue e tem a sua origem na medula óssea (COTRAN *et al.*, 2005). As células maduras do sistema hematopoiético (sistema sanguínea) se originam

da célula tronco pluripotente que reside na medula óssea. Inicialmente, a célula-tronco se diferencia em dois tipos, a célula pluripotente mielóide (hemácias, plaquetas, granulócitos e monócitos), e a célula pluripotente linfóide que se diferencia em células linfóides como linfócitos B e T (GOLAN *et al.*, 2009).

As leucemias são geralmente caracterizadas pela produção descontrolada de leucócitos anormais na medula óssea, o que compromete a formação e maturação das células normais. A leucemia mielóide tem a sua origem nas células da linhagem mielóide e a leucemia linfóide se origina de células da linhagem linfóide, nos dois casos observa-se um grande número de células neoplásicas no sangue periférico. Os linfonos são originados de células das linhagens linfóide e correspondem a proliferações na forma de massa tecidual principalmente nos linfónodos, que muitas vezes se manifestam como um quadro leucêmico, acompanhado de extenso comprometimento da medula óssea, o que acarreta na presença de células neoplásicas no sangue periférico. As células leucocitárias (linfócitos, granulócitos e monócitos, ver figura 5) são responsáveis pelas respostas imunológicas o que aumenta o risco de infecções potencialmente graves em pacientes com leucemia (COTRAN *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2005).

Conforme o tipo celular envolvido e o estágio de maturação as leucemias podem ser classificadas em aguda, caracterizadas por rápida proliferação de células imaturas denominadas blastos, e crônicas, caracterizadas por crescimento de células maduras bem diferenciadas. Assim, as leucemias podem ser classificadas em leucêmicas mielocíticas (mieloblásticas) agudas, leucemias mielocíticas crônicas, leucemias linfocíticas (linfoblásticas) agudas e as leucemias linfocíticas crônicas. Entretanto, existem patologias raras como o linfoma histiocítico, distúrbio proliferativo dos histiócitos e macrófagos (origem mielóide), que se manifestam na forma de linfoma maligno com infiltração na medula óssea. As leucemias são constituídas principalmente por células das linhagens leucocitárias e os fatores predisponentes são os mesmo envolvidos nos outros tipos de neoplasias que, de forma geral, tem a sua origem na lesão do DNA (KUMAR *et al.*, 2005).

Leucemia linfocítica aguda infantil é uma doença que atinge vários linfócitos em desenvolvimento que atinge crianças causando morte se não for

controlado. Leucemia linfocítica pré-aguda em crianças é frequentemente marcada por: (a) várias reações alérgicas, (b) frequentes infecções virais respiratórias e febre, (c) suspensão do apetite e alteração do paladar, (d) suspensão do crescimento, (e) letargia e depressão, (f) diarreia, (g) odores corporais, cada uma destas condições pode estar relacionado a deficiência de zinco (COTRAN *et al.*, 2009).

Todos os tipos de leucemias são tratadas com quimioterapias para matar as células leucêmicas, sendo importante o suporte dietético e o suplemento de zinco devido aos baixos níveis de zinco sérico em leucemia infantil. Células leucêmicas contem muito menos zinco do que as células normais, sugerindo um erro no metabolismo do zinco. Este mineral é importante para a função genética, imunológica adequadas, formação de células vermelhas, função de órgãos, músculos e ossos, estabilidade da membrana celular, crescimento, divisão e diferenciação celular (EBY, 2005).

### **2.7.2 Melanomas**

Os melanócitos na pele humana representam um grupo complexo de células que principalmente conferem cor a pele, eles são distribuídos como células individuais dentro da camada basal da epiderme. Estas células não se dividem rapidamente, mas podem ser estimuladas por fatores ambientais, como a luz ultravioleta (UV), o que lhes permite dividir e produzir pigmentos citoprotetores (BOGENRIEDER & HERLYN, 2010).

O melanoma cutâneo, câncer originado de melanócitos transformados, é a neoplasia maligna que vem apresentando maior crescimento na última década, tornando-se um problema de saúde pública (MORENO, 2012). Apesar de ser o menos freqüente dos cânceres de pele, sua letalidade é a mais elevada devido à sua alta possibilidade de metástase, o que representa uma resistência as abordagens terapêuticas existentes (MONZON & DANCEY, 2012).

Os fatores de risco para o melanoma estão relacionados ao histórico familiar, múltiplas manchas benignas ou atípicas e um melanoma anterior. Imunossupressão, sensibilidade ao sol, e exposição à radiação ultravioleta são fatores de risco adicionais. Cada um destes fatores de risco, relacionados a uma predisposição genética ou um fator ambiental, irão contribuir para o

desenvolvimento do melanoma (ARLO *et al.*, 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que, anualmente, ocorram cerca de 130 mil casos novos desse câncer no mundo, e, à prevalência, seja por volta de 2% (WHO, 2012). No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, válidas também para o ano de 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 3.170 casos novos em homens e 3.060 casos novos em mulheres, as maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul (INCA, 2012).

No momento do diagnóstico, cerca de 20% dos pacientes com melanoma já possuem a doença metastática e uma vez que tenha ocorrido à metástase, a média de sobrevivência é de apenas 6-9 meses (TARHINI & AGARWALA, 2006). Existem poucos agentes quimioterápicos disponíveis para o tratamento de melanoma metastático, e aqueles que têm sido utilizados produzem resultados insatisfatórios, além disso, o tratamento é invariavelmente acompanhado por efeitos colaterais, incluindo náusea, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções (HOWE *et al.*, 2001). A necessidade de novas abordagens para o tratamento de melanoma inclui o encontro de fármacos cujos benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável (FOYE & SANGUPTA, 1996).

A metástase é um processo complexo, e que envolve uma cascata de eventos, incluindo proliferação, invasão, aderência e migração de células tumorais para sítios adjacentes ou distantes do tumor de origem (WEINBERG, 2008). Ao longo do processo metastático, o passo limitante é a quebra de barreiras no tecido conjuntivo, como a matriz extracelular (ECM) e a membrana basal (BM) (YOON *et al.*, 2003). Consequentemente, a degradação da ECM e da BM é um acontecimento essencial no processo de metástase (CHA *et al.*, 2011).

Consistente com essa definição, a invasão e migração são altamente relacionadas com a atividade de metaloproteases de matriz (MMPs), uma família de endopeptidases estruturalmente relacionadas e dependentes de zinco, que regulam muitos processos envolvidos na evolução do tumor, tais como a migração e crescimento celular e degradação da matriz extracelular e membrana basal (STERNLICHT *et al.*, 2001). Notavelmente o aumento da expressão de MMP-1, MMP-2, MMP-9 foram relacionadas como fenótipo

invasivo em linhagens de melanoma humanas e murinas em diferentes estudos (FOLEY *et al.*, 2012; VILLANUEVA & HERLYN, 2008; MAHABELESHWAR & BYZOVA, 2007, HOFFMAM *et al.*, 2000).

Durante a disseminação metastática de células tumorais, a desagregação da ECM é alcançada através da ação de enzimas que incluem além das MMPs, o ativador de plasminogênio do tipo urokinase (uPA), catepsinas, entre outras moléculas liberadas tanto pelas próprias células tumorais quanto por células adjacentes ao tumor (BROOKS *et al.*, 2010). A liberação ocorre em resposta à ligação da célula tumoral com a membrana basal através de vias de transdução de sinal envolvendo integrinas. Assim, as moléculas MMP-1, MMP-2e MMP-9, além da uPA e catepsinas são atraentes alvos terapêuticos contra a invasão tumoral e metástases contribuindo para o tratamento de melanoma metastático (BANDARCHI *et al.*, 2010).

### **2.7.3 Câncer de pulmão**

No começo do século 20, câncer de pulmão era uma doença rara, que acometia uma pequena parcela da população, sem grande impacto demográfico mundial. Entretanto, no final deste século, este tipo específico de câncer tornou-se a principal e mais comum causa de morte entre a população dos Estados Unidos, do Reino Unido e do mundo (ALBERG & SAMET, 2005). A ocorrência de muitos casos de morte pode ser explicada através de agentes ambientais: fumar cigarros foi identificado como a causa predominante de mortes em 1950. Com o papel do cigarro bem estabelecido, pesquisadores de câncer de pulmão focaram suas pesquisas em fatores ambientais e genéticos que determinam o risco de câncer de pulmão em fumantes (FRANCO *et al.*, 2008).

O câncer de pulmão é o mais comum de todos os tumores malignos, apresentando um aumento por ano de 2% na sua incidência mundial. Noventa por cento dos casos diagnosticados estão associados ao consumo de derivados de tabaco. No Brasil, este tipo de câncer foi responsável por 14.715 óbitos em 2000, sendo o tipo de câncer que mais fez vítimas (INCA, 2010).

Histologicamente quase todos os tipos de cânceres de pulmão são de origem epitelial e incluem dois subtipos principais: pequenas células (small cel

lung cancer) e não-pequenas células (non small cel lung cancer). O tumor do tipo não-pequenas células corresponde a um grupo heterogêneo composto de três tipos histológicos principais e distintos: carcinoma epidermóide, também conhecido como carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de grandes células, ocorrendo em cerca de 80% dos pacientes diagnosticados com câncer de pulmão (HARTWALL *et al.*, 2011; HOLDENRIEDER & STIEBER, 2010). A frequência destes subtipos de cânceres de pulmão varia de acordo com o sexo: carcinoma epidermóide corresponde a 44 % em homens e 25 % em mulheres, enquanto que adenocarcinoma corresponde a 28% em homens e 42% em mulheres (MOUNTIZIOS *et al.*, 2011).

Dentre os tipos celulares restantes (pequenas células), destaca-se o carcinoma indiferenciado de pequenas células, com os três subtipos celulares: linfocitóide, intermediário e combinado (células pequenas mais carcinoma epidermóide ou adenocarcinoma) sendo responsável pelos 20% restante (MOUNTIZIOS *et al.*, 2011).

Raramente o carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC) é assintomático (10%). Quando sintomático (90%) pode traduzir apenas manifestações locais (tosse, hemoptises, dispnéia, toracalgia, pieira); estar associado a manifestações localmente avançadas (rouquidão, disfagia, síndrome da veia cava, derrame pleural) e às manifestações extra-torácicas tradutoras de metastização óssea, cerebral ou hepática; ou manifestar-se como quadros paraneoplásicos (HARTWELL *et al.*, 2011; MASTERS & KYONG, 2004; MELO, 2003).

Em 49% dos pacientes há lesão metastática única; duas lesões em 21% e três lesões em 13%. O tratamento focal se aplica em 70 % dos casos. O tipo de câncer de pulmão de pequenas células é altamente agressivo, de crescimento rápido e de ampla metástase. Frequentemente desenvolve resistência ao tratamento por radiação e por quimioterapia e se apresenta em um estágio tardio demais para uma intervenção cirúrgica. A expectativa de vida dos sobreviventes pode ser prolongada com tratamento quimioterápico, mas, infelizmente, não é de longa duração. Sem o tratamento, o prognóstico é ruim com uma expectativa de vida média de 2 a 4 meses. (HARTWELL *et al.*, 2011). Somente 3 a 8 % de todos os pacientes sobrevivem cinco anos e a

media de sobrevivência para a doença com estágio avançado é de 8 a 13 meses (POLLOCK, 2010).

Considerado uma doença letal, o câncer de pulmão de pequenas células é a mais comum causa de câncer relacionada à mortalidade no mundo (SUTHERLAND, 2011). Segundo HARTWELL (2011), o câncer de pulmão de pequenas células é o mais devastador e atinge estatisticamente 10 a 20 % da população do Reino Unido.

A maioria dos pacientes com câncer de pulmão em estágio avançado apresenta quadro de perda de peso (BLUM *et al.*, 2011).

#### **2.7.4 Características das Linhagens de células cancerígenas testadas**

A linhagem de célula U937 e THP-1 são de origem humana do tipo leucêmica linfóide histiocítica e leucêmica monocítica aguda, respectivamente. São tumores malignos e metastáticos, não aderentes e que atinge tecidos linfóticos mielócitos e tecido sanguíneo periférico, respectivamente.

A linhagem humana SK-MEL-5 e a linhagem murina B16F10 são origem melanômica, de tumores sólidos, malignos, metastáticos e aderentes.

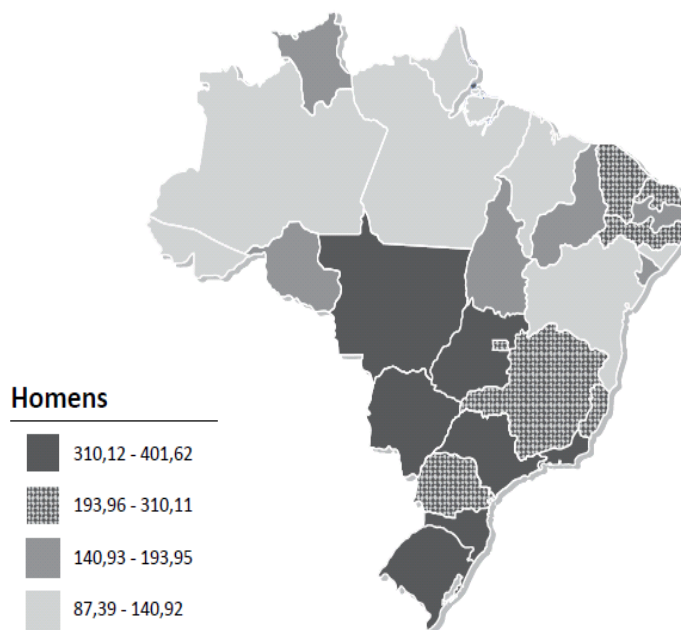
A linhagem humana H450 é um carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNQC). Tumor agressivo, maligno, metastático, aderente.

Todas as linhagens de célula testadas são cultivadas em meio D-MEM F12 (Gibco, BRL) suplementado com 20µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL).

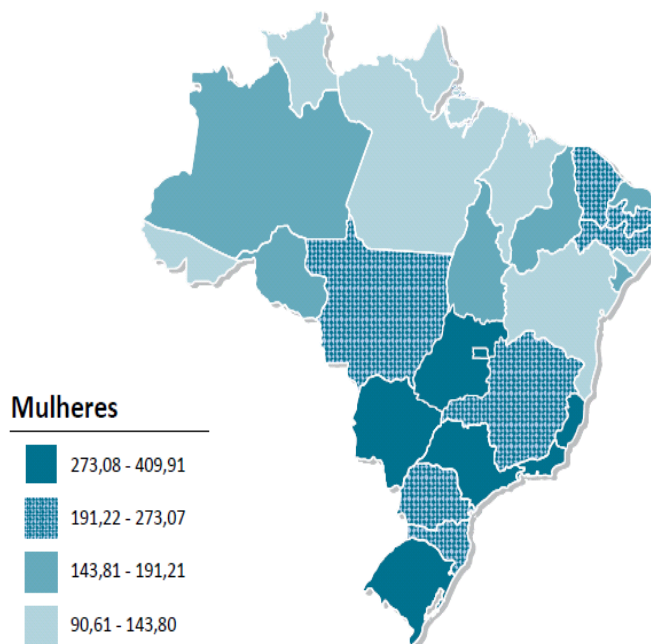
As linhagens de células tumorais aderentes são tripsinadas para suspensão das células e posterior cultivo celular (ATCC, 2013).

### **2.8 Epidemiologia e etiologia do câncer no mundo e no Brasil.**

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média rendas (INCA, 2012).



**Figura 10.** Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas). As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto as regiões Norte e Nordeste as menores (INCA, 2012).



**Figura 11.** Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas). As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto as regiões Norte e Nordeste as menores (INCA, 2012).

A etiologia do câncer é variada, podendo ser externa, ligada ao meio ambiente, ou geneticamente pré-determinada, estando ambas inter-relacionadas (WANG, 2010, RUANA-RAVINA *et al.*, 2010).

Dos fatores que favorecem o aparecimento do câncer, o mais preocupante é o fator ambiental, responsável por 80 % dos casos. Entre as mortes por câncer atribuídas a fatores ambientais, a dieta contribui com 35%, seguida pelo tabaco (30%) (GAROLFO *et al.*, 2004). Outros fatores de risco associados ao desenvolvimento de câncer incluem um ambiente envolvendo usuários de tabaco, classe social, hábitos dietéticos, consumo alcoólico, atividade física, poluição do ar e exposição ocupacional (SWIATKOWSKA, 2007).

O alto consumo de frutas e vegetais podem reduzir o risco de câncer. Este conceito é baseado em grande número de estudos. Por exemplo, estudos nos USA mostraram que uma associação invertida entre o consumo de frutas e vegetais em 5 anos e a incidência de câncer. A chamada dieta mediterrânea (que preconiza consumo maior de frutas e verduras e moderado consumo de carnes, ovos, leites e derivados) mostrou estar intimamente associada à diminuição do risco de câncer. Um estudo na Itália, mostrou, por exemplo, que o consumo diário, por um período de 8 anos, de seis ou mais vegetais, frutas, cereais, óleo de oliva, vinhos e baixo consumo de carnes, leite e derivados apresentou baixa incidência de câncer quando comparada aos que consumiam menos que seis destes itens (MEURMAN, 2010).

O risco atribuível ao tabagismo, de 90% em homens e 70% em mulheres, torna o tabaco um fator causal de suma importância. Dados da Organização Mundial de Saúde estimam que, atualmente, 5,4 milhões de óbitos são atribuídos ao tabagismo. (MALTA *et al.*, 2010).

No Brasil, o tabagismo é responsável por 20 milhões de óbitos ao ano. Todavia, a redução do uso diário de tabaco diminui o risco de várias doenças crônicas degenerativas e da incidência de câncer, em especial o de pulmão (PISINGER *et al.* 2007). Em 2008, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em conjunto com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), conduziram o mais recente inquérito sobre tabagismo em maiores de 15 anos de idade. Foi constatado que 17,5% faziam uso regular de tabaco, equivalente a 25 milhões de pessoas (FILHO *et al.*, 2010).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado umnexo causal entre tabagismo e carcinoma de pulmão. As principais alterações moleculares do câncer pulmonar envolvem genes de supressão tumoral, protooncogenes e fatores de crescimento (DUARTE & PASCHOAL, 2005).

Desde o estabelecimento da relação entre tabagismo e câncer de pulmão há 60 anos, o número de tumores malignos com evidências de associação causal com o tabagismo tem aumentado. O declínio do consumo de tabaco na população brasileira tem sido constante desde a década de 80. A maior prevalência de fumantes foi detectada na região sul (19%), e os menores percentuais nas regiões centro Oeste e Sudeste (16,9%) (FILHO *et al.*, 2010).

Como observado na tabela 02, desde o clássico estudo de Doll e Hill, em 1957, que identificou uma estreita associação entre o consumo de cigarros e câncer de pulmão, novas evidências não só confirmam esta relação, bem como, demonstram outros tumores malignos associados à prática do consumo de tabaco (FILHO *et al.*, 2010).

**Tabela 1.** Evolução das localizações de câncer com relação com o tabagismo

Publicação (Ano)	Tumores para os quais há evidências suficientes
Doll & Hill (1957) <sup>50</sup>	Pulmão
Doll & Peto (1981) <sup>51</sup>	Pulmão, boca, faringe, laringe e esôfago, pâncreas, rins, bexiga
IARC Monographs, Volume 38 (IARC 1986) <sup>52</sup>	Trato respiratório, trato digestivo superior, pâncreas, pelvis renal, bexiga
IARC Monographs, Volume 83 (IARC 2004) <sup>40</sup>	Pulmão, boca, naso-, oro-, e hipofaringe, cavidade nasal e seios paranasais, laringe, esôfago ( <b>adeno</b> e espinocelular), estômago, pâncreas, <b>figado</b> , rins ( <b>corpo</b> e pélvis), <b>uretra</b> , bexiga, <b>colo uterino</b> , <b>medula óssea</b>
IARC Monographs, Volume 100, parte E, 2010 (Secretan <i>et al.</i> 2009) <sup>3</sup>	Pulmão, boca, naso-, oro-, e hipofaringe, cavidade nasal e seios paranasais, laringe, esôfago (adeno e espinocelular), estômago, <b>colorretal</b> , pâncreas, figado, rins (corpo e pélvis), uretra, bexiga, colo uterino, <b>ovário (mucinoso)</b> , medula óssea (leucemia mielóide)

Em negrito os tumores acrescentados a cada nova avaliação / *New sites added at each new evaluation in bold.*

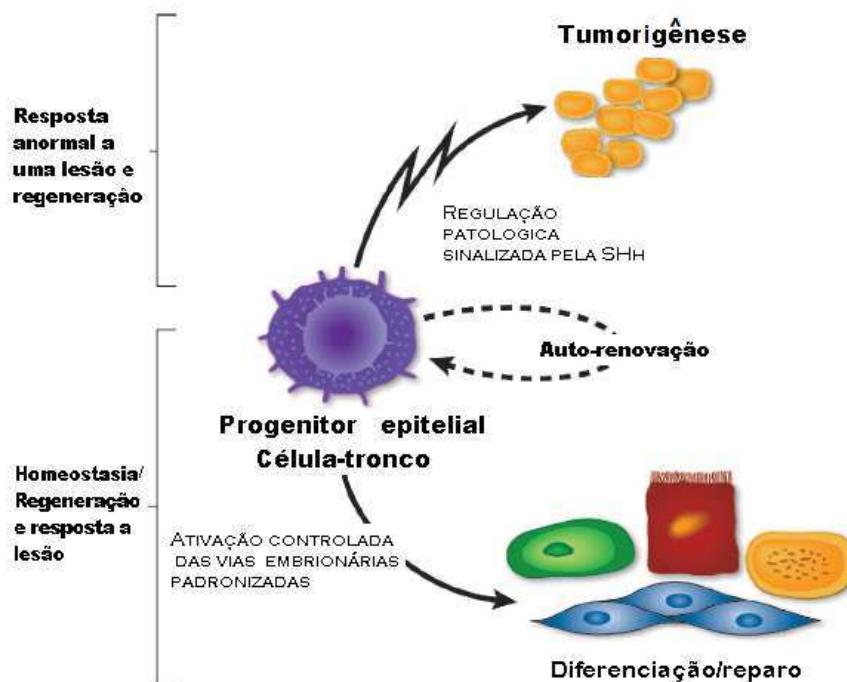
Fonte: (FILHO *et al.*, 2010).

### 2.8.1 Mecanismo bioquímico do tabaco na etiologia do câncer.

A correlação entre tabaco e câncer não é baseada somente na evidência epidemiológica: câncer proveniente de fumantes frequentemente abriga um ponto típico, mas não específico, de mutação, caracterizado por transição de G=C → A=T ao longo do gene locus TP53 atribuído, provavelmente, ao DNA danificado por benzopirene, uma das notórias substâncias carcinogênicas da fumaça do cigarro (MOUNTZIOS *et al.*, 2008; MOUNTZIOS *et al.*, 2010).

O câncer de pulmão é invasivo, geralmente provocado pelo cigarro, pode abrigar diferentes alterações gênicas que vão desde mutações pontuais em genes específicos até deleções de grandes regiões cromossômicas. Dentre as deleções gênicas encontradas em todos os tipos de câncer, as mais comuns são: LOH 3p, mutações do gene Tp53, mutações do gene PRb (MOUNTZIOS *et al.*, 2008). A alteração gênica LOH no cromossomo 3p, que é a região cromossômica onde está localizado o gene supressor de tumor, caracteriza-se por hipermetilação e desacetilação de histonas. As mutações mais frequentes no câncer de pulmão acontecem nos genes supressores de tumores TP53, que codificam a proteína p53, reguladora do ciclo celular. Este gene encontra-se mutado em até 50 % dos casos de CPNPC e em mais de 70 % dos casos em CPPC (VELCHETI & GOVINDAM, 2007). A segunda mutação mais comum em câncer de pulmão leva à inativação de genes do retinoblastoma Rb1 localizado em 13q1. RB1 é um gene codificador da proteína Rb que atua como um bloqueador na fase de transição G → S1 do ciclo celular. O mecanismo pelo qual esta via específica afeta o processo de transformação maligna parece ser diferente entre o CPPC e CPNPC. A expressão reduzida da Rb1 é de 80-100% em tumores de CPCP. Estes tumores mantêm níveis normais de ciclina D1 e de inibidores de quinase dependente de ciclina P16<sup>INKk</sup>. Por outro lado, a perda da expressão da proteína RP1 é menos frequente em CPNPC (15-35%), enquanto que a inativação da P16<sup>INKk</sup> está presente em mais de 70 % dos casos e a amplificação do gene da ciclina D1 pode ser detectada em 10 % dos casos de carcinoma de células escamosas (MOHAMED *et al.*, 2007).

A transformação neoplásica, que é considerada uma anomalia da expressão gênica, pode ser exemplificada por um dos mais agressivos tipos de câncer pulmonar, relacionado ao tabagismo (INCA, 2012; VELCHETI & GOVINDAM, 2007). O mecanismo bioquímico que explica o desenvolvimento do câncer de pulmão envolve a proteína Sonic Hedgehog (Shh). Esta proteína é responsável pelo controle da multiplicação e diferenciação das células pulmonares durante o desenvolvimento embrionário, mas, em adultos, o oncogene responsável pela sua codificação permanece inativo. No entanto, entre os fumantes, este gene volta a se expressar para garantir a produção de novas células pulmonares, a fim de compensar os danos causados pelos componentes da fumaça do cigarro com o aumento do ritmo da multiplicação celular, aumentando a probabilidade de transformação neoplásica (VELCHETI & GOVINDAM, 2007).



**Figura 12.** Papel da SHH no desenvolvimento das vias de sinalização da tumorigênese.

## 2.9 Flavonoides: estrutura química e características físico-químicas da molécula

A palavra flavonoides tem sua origem do latim flavus e significa amarelo. De fato, flores, frutos e folhas coloridas contêm uma grande

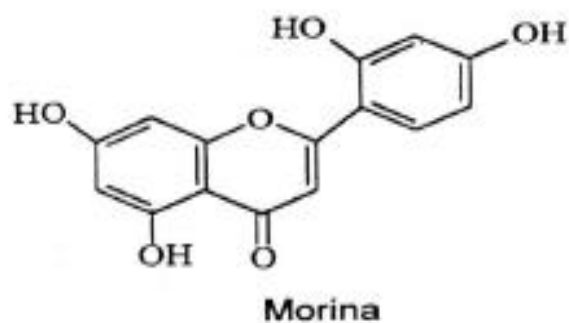
quantidade de pigmentos considerados flavonoides (tabela 02). Os flavonoides formam um grande grupo de compostos naturais caracteristicamente contendo um esqueleto carbônico C6-C3-C6, diferenciando-se na saturação do anel C e no padrão da hidroxilação (Figura 13). As seis maiores sub-classes de flavonoides compreendem flavonas (ex: apigenina e luteonina), flavonols (quercetina e mirecetina), flavanonas (narigenina e hesperidina), catequinas ou flavanois (epitatechina, galocatechina), antocianinas (cianidina e pelargonidina) e isoflavonas (genisteína e daidzina) (ATTOUB *et al.*, 2011; *et al.*, 2010). Várias famílias de plantas têm diferentes padrões de flavonoides, bem como suas conjugações, os quais desempenham importantes funções bioquímicas e fisiológicas em vários tipos de células (AMADO *et al.*, 2011).

**Tabela 2.** Grupos de flavonoides, seus componentes e fontes alimentares.

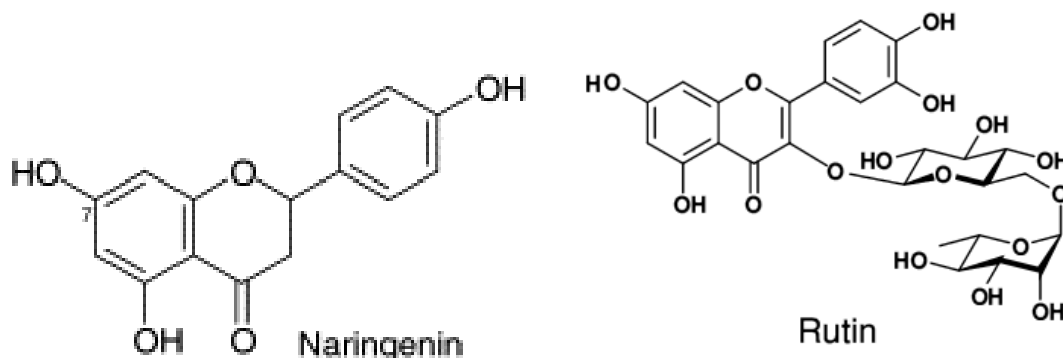
Grupos	Componentes	Fonte alimentar
Flavonas	Apigenina Chrisina Kaempferol Luteolina Miricetina Rutina Sibelina Quercetina	Cascas de maçãs Cerejas Brócolis Peles de frutas <i>Cranberries</i> Uvas Alfases Oliva Alho
Flavanonas	Fisetina Hesperetina Narigina Naringenina Taxifolina	Frutas cítricas Peles de frutas cítricas
Catequinas	Catequina Epicatequina Epigalocatequina galate	Vinho tinto Chá
Antocianinas	Cianidina Delfinidina Malvidina Pelargonidina Peonidina Petunidina	Cerejas Uvas <i>Raspberries</i> Uvas vermelhas Morangos Chá Peles de frutas com pigmentos escuros

Fonte: VOLP *et al.*, 2008

Os flavonoides são grupos de compostos polifenólicos e, embora não sejam considerados vitaminas, têm várias funções nutricionais que têm sido descritas como modificadores de resposta biológica; a maioria atua como antioxidantes e alguns têm propriedades anti-inflamatórias. Demonstrou-se que os flavonoides previnem ou retardam o desenvolvimento de alguns tipos de câncer (LIU *et al.*, 2010, ATTOUB *et al.*, 2011).



**Figura 13.** Estrutura do flavonoide morina (AMADO *et.al*, 2011).



**Figura 14.** (A) estrutura do flavonoide naringina, (B) estrutura do flavonoide rutina (GRASSI, 2010).

### 2.9.1 Propriedades farmacológicas dos flavonoides

Vários estudos têm relatado que as propriedades antioxidantes e antiinflamatórias dos flavonoides contribuem para o controle e tratamento de várias doenças crônico-degenerativas, tais como: aterosclerose, dislipidemias, câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes, doenças reumáticas, por se tratar de doenças que estão intimamente ligadas aos processos oxidativos e inflamatórios (CHEN *et al.*, 2011).

Os flavonoides apresentam diversas atividades biológicas: potenciais antiinflamatórios, proteção e prevenção a doenças cardiovasculares, eliminação de radicais livres, redução de pressão arterial, efeitos antitumorais, antiespasmódicos e antidiarréicos (YAN *et al.*, 2011).

Produtos naturais, incluindo flavonoides, foram usados mundialmente por centenas de anos como medicina tradicional para prevenir e tratar várias formas de doenças, incluindo o câncer. Vários estudos têm mostrado que os efeitos dos flavonoides sobre as doenças humanas são mediados visando

múltiplas vias de sinalização celular. A ingestão diária de flavonoides é associada com vários efeitos benéficos como antioxidante, antiviral, antiinflamatório, ação hepatoprotetora, prevenção de doenças cardiovasculares e efeitos antitumorais (AMADO *et al.*, 2010; QUISPE *et al.*, 2005).

Três novos flavonoides: lawsocrisina, lawsocrisinina e lawsonarigenina foram isolados da folha de *Lawsonia alba* Lam, planta nativa do norte da África, e que apresentaram uma variedade de atividade biológica: antimicrobiana, fungicida, estimulante de macrófagos, atividade hepatoprotetora, analgésica, antiinflamatória, antiprética, citotóxica, antioxidante e imunomodulatória (UDDIN *et al.*, 2010).

Estudos epidemiológicos sugerem que o alto consumo de frutas e vegetais contendo flavonoides podem estar associados à diminuição do risco de doenças cardiovasculares. O mecanismo que explica esta ação não é muito claro, mas evidências sugerem que flavonoides podem exercer efeitos melhorando a função endotelial, inibindo a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), diminuindo a pressão sanguínea e alterando o perfil dislipidêmico. Evidências recentes sugerem que polifenóis, na forma purificada, incluindo reverastrol, berberine e naringenina, apresentam efeitos benéficos sobre dislipidemia em humanos (GRASSI *et al.*, 2010; MULVIHILL & HULFF, 2010).

Plantas ricas em luteolina foram usadas na medicina tradicional chinesa para tratamento de várias doenças tais como hipertensão, desordens inflamatórias e câncer. Luteolina diminuiu a viabilidade da linhagem de células de câncer de pulmão (LNM35), cólon (HT29), fígado (HepG2) e mama (MCF7/6) (ATTOUB *et al.*, 2011).

É notório que a obesidade é um fator de risco para o câncer de cólon. Os flavonoides crisina, quercetina e mobilitina foram testados em ratos que desenvolveram câncer de cólon e que apresentavam fenótipos de obesidade e diabetes. Os resultados sugerem que os flavonoides acima são capazes de suprimir a fase inicial da carcinogênese de cólon em ratos obesos. Uma explicação para esta propriedade é a inibição da atividade de proliferação celular causada pelos fatores de crescimento sérico. Os autores indicam que

os flavonoides podem ser usados na prevenção da carcinogênese do cólon em humanos obesos (MIYAMOTO *et al.*, 2010).

Uma série de flavonoides naturais foi avaliada como potenciais inibidores de trombina, onde miricina e quercetina mostraram ser os mais potentes (LIU *et al.*, 2010).

Estudos têm mostrado que o flavonoide quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavone) inibe o crescimento de tumor mamário, ovariano, colorretal, leucemia e de pulmão. Também foi demonstrado que a quercetina inibe o crescimento *in vitro* de melanoma, provavelmente através do sítio de ligação de estrogênios (CALTAGIRONE *et al.*, 2000)

### **2.9.2 Atividade anticarcinogênica dos flavonoides**

Ao longo dos últimos anos, existe um crescente interesse em compostos fitoquímicos com potencial anticâncer e baixa toxicidade (ATTOUB *et al.*, 2011). Os flavonoides são compostos polifenólicos que tem atraído atenção da comunidade científica como moléculas responsáveis pela prevenção de câncer por uma infinidade de mecanismos bioquímicos, suprimindo a carcinogênese em modelos animais. Relatos demonstram um efeito benéfico dos flavonoides em vários mecanismos envolvidos na genesis do câncer, inclusive o câncer de pulmão (ANDROUTSOPOULOS *et al.*, 2010).

Os flavonoides são agentes que exibem diversas atividades biológicas prevenindo a iniciação de cânceres e inibindo a progressão tumoral. Vários estudos publicados têm demonstrado que agentes anticâncer podem induzir a apoptose via sistema de Fas/FasL. Fas é um receptor de superfície celular que expressa à morte citoplasmática e que pertence à subfamília de receptores de fator de necrose tumoral. A morte celular de células tumorais é resultado da ativação das vias das caspases 8 e 10 promovidas pelos agentes antitumorais (HUNG *et al.*, 2010).

Estudos epidemiológicos fornecem evidências que uma alta ingestão de flavonoides dietéticos pode ser associada com baixa prevalência de câncer de pulmão. Estudos *in vivo* e *in vitro* apontam os flavonoides como moléculas supressoras da carcinogênese, sendo que as classes chalconas, flavanonas,

flavanóis, flavonas, flavonóis e isoflavonas são as que mais apresentaram esse efeito (HUNG *et al.*, 2010).

A hesperidina, um conhecido flavonoide constituinte de citrus, reduz a proliferação celular de muitos cânceres. Estudos realizados por Park (2008) identificaram o efeito apoptótico de hesperidina em células de câncer de colo humanas, SNU-C4 na concentração de 1-100µM visto que a hesperidina reduziu em 65% a viabilidade celular em relação ao controle. A Morte celular induzida pela hesperidina mostrou características apoptóticas através da atividade da caspase 3 no tratamento com hesperidina. .

Vários estudos classificam os flavonoides como inibidores de câncer por apresentarem atividades antioxidantes através da habilidade de remover compostos reativos ou de influenciar no seu estado redox, modular a via de transdução de sinais envolvida na proliferação celular, bloquear a angiogênese, modular enzimas necessárias ao metabolismo de procarcinogênicos e detoxicação de carcinógenos (PICK *et al.*, 2011).

Os flavonoides daidzeína e genisteína têm mostrado capacidade antiproliferativa, pois inibem o dano oxidativo do DNA induzido por irradiação ultravioleta. Outros pesquisadores relatam que a propriedade antioxidante dos flavonoides faz com que eles inibem vários tipos de câncer, inclusive de pulmão (KHLEBNIKOV *et al.*, 2007; RABIAU, 2010).

Ensaio, *in vitro* realizados por HUNG *et al.* (2010), demonstraram que o flavonoide didimina, cuja propriedade antioxidante é alta, apresentou atividade antiproliferativa e apoptóticas em células tumorais de pulmão. Vários outros estudos *in vivo* demonstraram que os flavonoides apresentam atividades em induzir apoptose. A meristina, por exemplo, aumenta a ativação das caspase-iniciadoras-8/-9 e das caspases efetoras-3/-7, moléculas que participam de cascatas enzimáticas que promovem a morte celular por apoptose em carcinoma de colorretal (CRC) (SIEGELIN *et al.*, 2009).

Uma das características mais importantes dos flavonoides, responsáveis pela propriedade preventiva de câncer, é sua interação inibitória com as enzimas P450 CYP1, o que impede a formação de produtos carcinogênicos com conseqüente bloqueio da carcinogênese. Flavonoides têm sido tradicionalmente descritos como inibidores da enzima CYP1 devido à

inibição da formação de produtos carcinogênicos e conseqüente bloqueio do estágio de carcinogênese (ANDROUTSOPOULOS *et al.*, 2010).

Os flavonoides podem influenciar diretamente na atividade enzimática envolvida no reparo do DNA e/ou modular a expressão de genes. Estes compostos afetam a progressão do ciclo celular como, por exemplo, a luteolina, que bloqueia o ciclo celular na fase G1/S em células de carcinoma nasofaríngeo. Além disto, a luteolina promoveu a redução da ciclina D1 via fosforilação da proteína e degradação proteasomal. O mecanismo que explica este princípio baseia na supressão da fosforilação e ativação da proteína Akt, resultando na desfosforilação e ativação da quinase-3 $\beta$  glicogênio sintase (GSK-3 $\beta$ ). A GSK-3 $\beta$  ativada, então, atinge ciclina D1, causando fosforilação da ciclina D1 no resíduo de aminoácido Thr<sup>286</sup> e subsequente degradação proteasomal (OMG *et al.*, 2010).

Estudos comprovam que o flavonoide kaemferol-7-O- $\beta$ -D-glucose (KG) induziu o bloqueio nas fases G2/M correlacionadas com a diminuição das ciclina B1 e Cdk1 de uma forma independente de p53 e também causou um aumento da apoptose, conformado por características alterações morfológicas, evidências da fragmentação do DNA e aumento da população sub-G apoptótico. Além disto, inibição da translocação nuclear de NF-kB, aumento da Bax e diminuição da Bcl-2 foram observados em células de carcinoma cervical HeLa tratados com KG (XU *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, várias pesquisas foram direcionadas para elucidar mecanismos moleculares de flavonoides em vias relacionadas com tumorigênese e progressão tumoral. Flavonoides como genisteína, tangeritina, EGCG e fisetina podem modular componentes diferentes da via de NF-kB e assim inibir translocação destes fatores para o núcleo, evitando a ativação de genes alvos. Este mecanismo desempenha importante papel no crescimento celular e apoptose e está relacionado com diferentes tipos de câncer (AMANDO *et al.*, 2011).

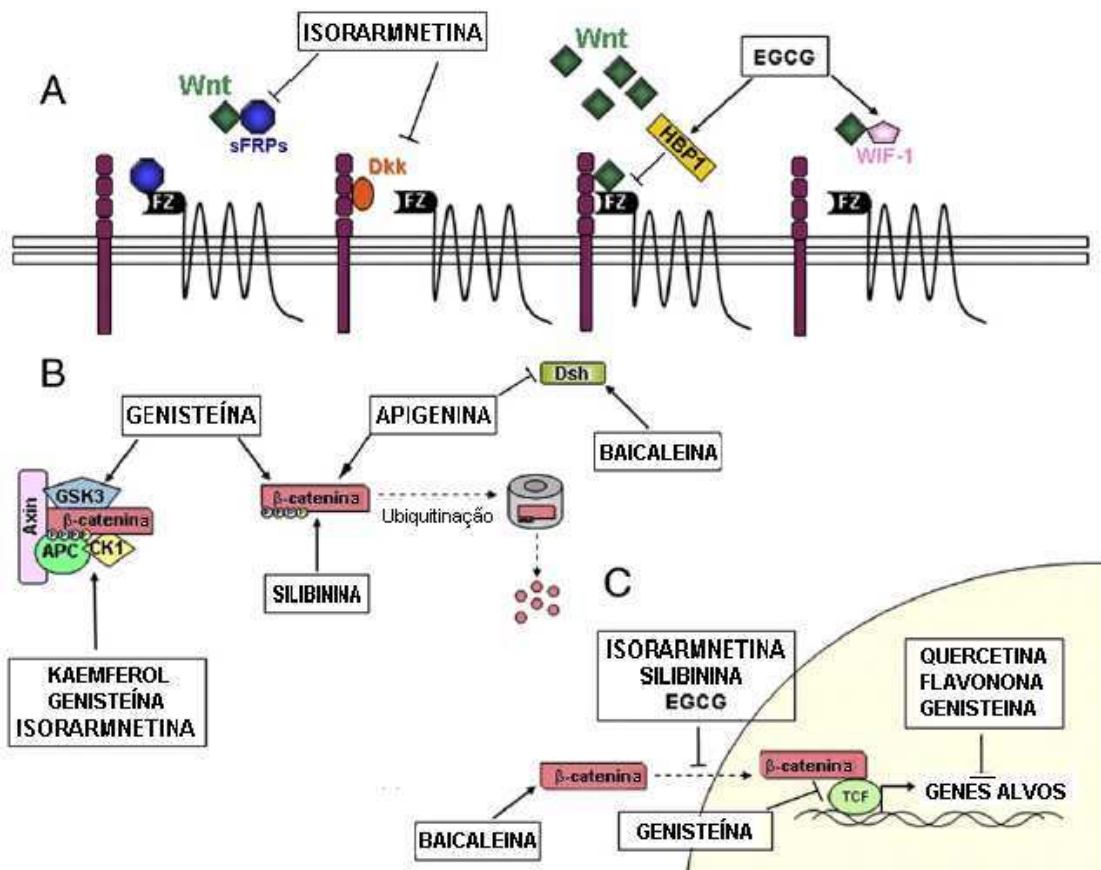
Alguns flavonoides como didimina, fisetina e quercetina induzem a apoptose por mecanismos dependentes do gene p-53. A proteína p-53 funcional atua na regulação do ciclo celular, reparo de DNA e na indução da apoptose das células geneticamente instáveis, mantendo desta forma a integridade do genoma (CHEN *et al.*, 2011; HUNG *et al.*, 2010).

As rotas metabólicas das Akt e MAPK desempenham um papel crucial na via de sinalização da sobrevivência celular e são ativadas em vários cânceres. Flavonoides como EGCG, kaemferol, tangeretina, quercetina e genisteína apresentam efeitos de controle destas vias. Por exemplo: modulação da Akt pela quercetina e pela EGCG e modulação da MAPK pela genisteína promove efeitos indiretos sobre a via de NF- $\kappa$ B, melhorando o efeito antitumoral destes produtos naturais (AMADO *et al.*, 2011; GADGEEL *et al.*, 2009).

A mais conhecida atividade antioxidante dos flavonoides é a sua habilidade de desativar moléculas reativas de oxigênio singlete. Podem ainda proteger as membranas celulares da peroxidação lipídica garantindo, desta forma, a integridade e fluidez da membrana, diminuindo a formação de peróxidos imunossupressores e impedindo alterações na sinalização intracelular e função celular. Os Flavonoides atuam ainda na apoptose celular e angiogênese. A ação na angiogênese e na apoptose celular é interessante e pode explicar a ação antitumoral *in vitro* destas substâncias (VOLP *et al.*, 2008).

Outra importante via de sinalização envolvendo câncer é a via Notch. Quando esta via é ativada de forma anormal, um aumento na proliferação de células cancerígenas é observado. Genisteína e quercetina podem diminuir os níveis das proteínas Notch 1 e Notch 2, respectivamente, e então diminuir as taxas de crescimento no câncer (AMADO, *et al.*, 2011),

SU (2007) demonstrou uma relação entre flavonoides, a via não canônica da Wnt e câncer. Sua pesquisa relatou que a genisteína inibiu a expressão da Wtn5a em ratos com tumores de glândulas mamárias. Este tratamento aumentou a secreção do inibidor da Wnt (sFRP2), mas não mudou o nível da  $\beta$ -catenina indicando efeito não canônico da genisteína em tumores de mama (SU *et al.*, 2007; AMADO *et al.*, 2010).



**Figura 15.** Flavonoides regulam diferentes componentes da via de Wnt/ $\beta$ -catenina: A painel acima mostra flavonoides interagindo com inibidores extracelulares da Wnt/ $\beta$ -catenina (sFRPs, DKK, HBP1, W1F1) (B) Intracelularmente, flavonoides interagem com o complexo de degradação formado pela GSK3, Axin, APC e CK1, bem como com a  $\beta$ -catenina fosforilada. (C) Flavonoides afetam a translocação nuclear de  $\beta$ -catenina, associação /TCF e genes da Wnt/ $\beta$ -catenina (AMADO *et al.*, 2011).

## 2.10 Botânica e descrição de planta de oliveira (*Olea europaea L.*)

### 2.10.1 Histórico da olivicultura no mundo e no Brasil.

A origem e o desenvolvimento da cultura da oliveira (*Olea europaea L.*) perdem-se no tempo e no espaço geográfico e confundem-se com a história da humanidade. Acredita-se que a oliveira seja proveniente da Síria, do Líbano ou mesmo de Israel, mas há relatos que esta espécie iniciou-se no período Palestino e Neolítico, entre 10.000 a 3.000 a.C., possivelmente na Mesopotâmia, de onde se difundiu para o Egito (2000 a.C.), ilhas da Ásia Menor e Grécia Continental (1800 a. C.). Posteriormente, a oliveira disseminou-se pela Bacia do Mediterrâneo, chegando a vários países da

Europa e do Oriente Médio (NETO *et al.*, 2008). Atualmente, os principais países produtores de oliveira encontram-se na Europa, com destaque para Espanha, Itália e Grécia. Na América do Sul, destacam-se o Chile e a Argentina como principais produtores e exportadores de azeitona e de azeite. No Brasil, a oliveira foi introduzida no início do século 19, nas Regiões Sul e Sudeste. Ainda hoje, é uma espécie muito pouco cultivada, sendo que a maioria dos pomares existentes não é destinada à produção comercial ou industrial, além de fazer uso de variedades inadequadas ou ultrapassadas. Atualmente, a oliveira tem despertado interesse por parte de agricultores, empresários do agronegócio e da indústria alimentícia pelo grande potencial existente de agregação de valor (NETO *et al.*, 2008).

A produção mundial de frutos aumentou 22% na última década, passando de 431,2 milhões de toneladas, em 1996, para 526,5 milhões de toneladas em 2006. O aumento da demanda pelo consumo de alimentos saudáveis é apontado como o principal fator responsável por esse desempenho (NETO *et al.*, 2008).

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2006) revelam a importância da fruticultura no cenário agrícola nacional. A produção brasileira atingiu 40,2 milhões de toneladas em 2006 (7,6% da produção mundial), numa área de 2,2 milhões de hectares, gerando R\$ 16,3 bilhões em divisas. Com esse resultado, o Brasil destaca-se como terceiro pólo mundial de fruticultura (ALVARENGA *et al.*, 2006).

Além disso, o setor é estratégico para o agronegócio brasileiro, empregando, anualmente, mais de cinco milhões de pessoas com faturamento bruto entre R\$ 1 mil e R\$ 20 mil por hectare (NETO *et al.*, 2008).

No mundo, estima-se que a área plantada de oliveira seja de 8,3 milhões de hectares, com produção de 15,8 milhões de toneladas de azeitonas. A importância dessa atividade agrícola está relacionada principalmente com a fabricação de azeite de oliva (OLIVEIRA & ABRAHÃO, 2006).

O Brasil ainda não possui plantio comercial de oliveira, ficando praticamente dependente da importação de seus derivados. Configura-se como um dos maiores importadores de produtos de oliveira da América do Sul, sendo a Argentina um dos mais importantes fornecedores, incluindo

também a Espanha e Portugal. Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, BRASIL, 2007), somente com importações de azeite, em 2006, foram gastos 236 milhões de reais.

Considerando o volume de exportação anual desses produtos e o consumo interno, bem como a expectativa de cultivo comercial da oliveira em território nacional, o Brasil poderá alcançar auto-suficiência na produção de azeitona e azeite com o plantio de, aproximadamente, 62 mil hectares de oliveiras. Dessa forma, seriam evitados gastos de R\$ 23.688,50 por hectare, a partir do sexto ano, para os produtores rurais que aderissem a essa atividade (NETO *et al.*, 2008).

### **2.10.2 Botânica e descrição de planta de oliveira (*Olea europaea* L.)**

A oliveira (*Olea europaea* L.) pertence à família Oleaceae e, quando cultivada, é uma árvore de tamanho médio e formato arredondado, cujo porte, densidade de copa e cor da madeira variam em função das condições de cultivo. Apresenta duas fases diferenciadas: a juvenil e a adulta. Na fase juvenil, apresenta folhas mais curtas e grossas e ramos com comprimento de entrenós menores. Na fase adulta, alcança sua capacidade reprodutiva apresentando folhas maiores e mais delgadas, e ramos com entre entrenós de comprimento maiores (AVILA *et al.*, 2005; NETO *et al.*, 2008).

O sistema radicular é caracterizado como raiz pivotante central, quando a planta origina-se, estaquia, apresenta um sistema radicular fasciculado (AVILA *et al.*, 2005).

As folhas adultas são de forma simples e elíptico-lanceoladas com comprimento de 5 a 7 cm e largura de 1 a 1,5 cm. O lado de cima da folha (adaxial) é de coloração verde-escura (Figura A), enquanto o lado de baixo (abaxial) é de coloração prateada (Figura B) (SERGEEVA *et al.* 2008; NETO *et al.*, 2008).



**Figura 16.** A/B Folhas adultas de oliveira usadas para obter o extrato.

A inflorescência é em racimo e a flor é constituída por quatro sépalas verdes e soldadas que formam um cálice com quatro pétalas brancas, que também são soldadas pela base para formar a corola (NETO *et al.*, 2008).

O fruto, denominado azeitona é uma drupa de tamanho pequeno e forma eliptisoidal, cujas dimensões variam em função da variedade, podendo apresentar entre 1 a 4 cm de comprimento e diâmetro de 0,6 a 2 cm. Possui uma só semente composta de três tecidos fundamentais: endocarpo, (que corresponde ao caroço), o mesocarpo (à polpa), e o pericarpo (à pele). A sua coloração vai de verde a preta, passando por tonalidades de verde-palha a arroxeadas. No ponto de transição de verde-palha a arroxeadas é que apresenta maior rendimento de azeite (OLIVEIRA *et al.*, 2006; NETO, *et al.*, 2008).

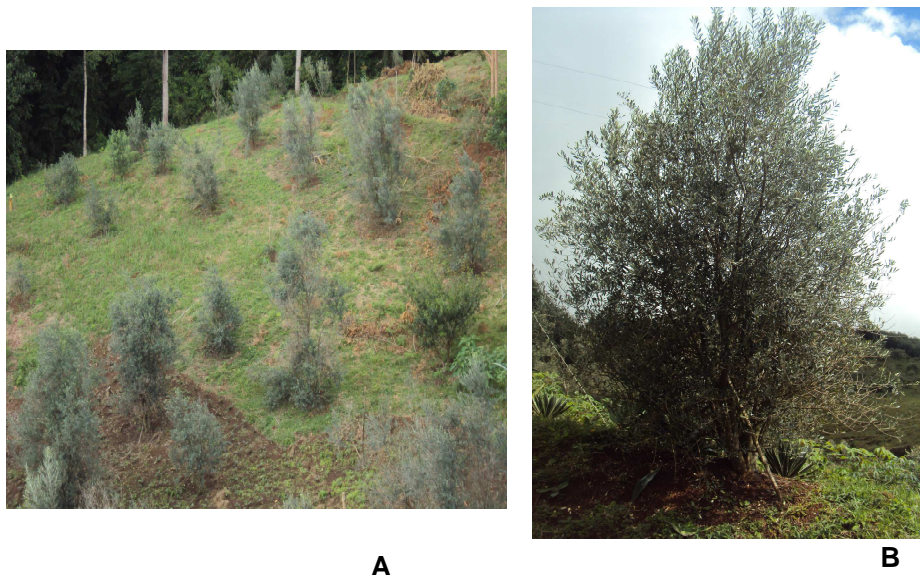
### **2.10.3 Exigência climática e local de plantio**

A oliveira é uma planta de clima temperado; necessita de baixas temperaturas no período que antecede a floração para ocorrência de produções satisfatórias.

Temperaturas de inverno, médias entre 8° C e 10° C, não ultrapassando 21° C, altitudes variáveis (200-1300 m) e regime de chuvas superior a 800 mm anuais são suficientes para produção econômica.

Devem ser usados preferencialmente terrenos planos ou suavemente ondulados para facilitar a colheita e os tratos culturais. Mas o plantio poderá

ser feito em locais com até 50% de declividade e que tenham maior exposição à luz do solar (preferencialmente a face norte do terreno). Evitar plantios em terrenos sombreados, muito encharcados e em vales ou baixas, afastando, assim, riscos de geadas. Dar preferência a terrenos com boa drenagem e solos profundos e muita atenção quanto ao preparo da cova, visto que a oliveira é uma árvore longeva, o que permitirá um bom crescimento e desenvolvimento da planta e, conseqüentemente, boas produções de azeitona (NETO *et al.*, 2008).



**Figura 17.** A/B: Planta da oliveira: (A) terreno com declividade (B) Planta da oliveira adulta.

### **2.11. Composição química e Propriedades farmacológicas e anticarcinogênicas das folhas de oliveira**

Os principais componentes das folhas de oliveiras são os compostos fenólicos, os quais estão naturalmente presentes em vegetais, frutas e chás. (ANTER, *et al.*, 2011). As principais substâncias fisiológicas da folha de oliva são hidroxitirosol, tirosol, ácido caféico, ácido p-coramico, ácido vanílico, valinina, oleuropeina, luteoina, diosmetina, rutina, luteoina-7-glicosilada, apigenina 7-glicosilada, diosmetina 7-glicosilada (KAEIDI *et al.*, 2011; LEE & LEE, 2011, ISIK *et al.*, 2012).

A oliveira (*Olea europaea L.* (família: *Oleácea*)) tem sido usada por mais de 100 anos. O óleo e as folhas são usados com propósito medicinal e foram

introduzidas recentemente na Farmacopéia PhEur 5. Em vários países eles são conhecidos como um remédio popular para hipertensão e diabetes (KAEIDI *et al.*, 2011).

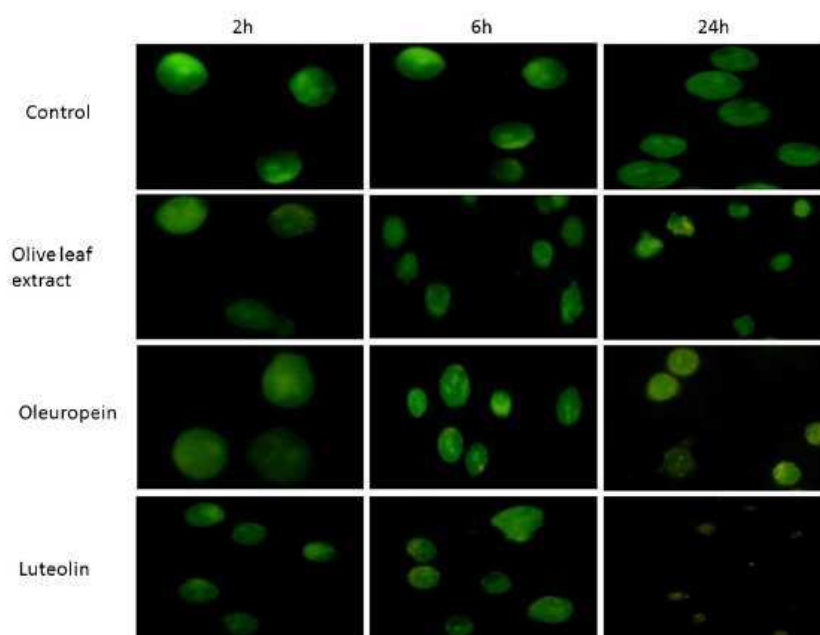
Estudos epidemiológicos concluem que a população da região mediterrânea possui um estilo de vida saudável que reduz a incidência de doenças degenerativas. Uma típica dieta mediterrânea promove menor incidência de doenças, tais como câncer e doenças cardiovasculares. Quanto maior o consumo de peixes, frutas e outros importantes fatores, tais como folhas e óleos de oliva conferem benefícios saudáveis. Olivas de mesa são componentes essenciais para este tipo de dieta e o consumo habitual de folhas e frutos proporciona um suplemento de antioxidantes o qual pode minimizar os efeitos do estresse oxidativo via inibição da peroxidação de lipídeos (LALAS *et al.*, 2011).

O Extrato de oliveira possui várias atividades farmacológicas bem conhecidas por seu efeito hipotensor, propriedade antioxidante, hipoglicemiante, ação cardioprotetora, hipocolesterolêmico, antiarteriosclerótico, antitumoral, radioprotetor, antiinflamatório, antimicrobiano, ação hepatoprotetora, e atividade antiviral (ARANTES-RODRIGUES *et al.*, 2011).

Oleuropeina e seus derivados, tais como hidroxitirosol, tirosol são os principais componentes da folhas de oliveira (*Olea Europaea*) e está presente nos frutos e no óleo. Oleuropeina e seus derivados são responsáveis pelos seus efeitos farmacológicos e apresenta atividade anticlastogênica, antiinflamatória e antioxidante e inibem o crescimento tumoral de vários cânceres (ISIK, *et al.*, 2012; ANTER *et al.*, 2011).

Vários estudos usando compostos fenólicos extraídos da folha de oliveira demonstraram anticarcinogênico contra os seguintes cânceres: mama, colon, estômago e leucemia. Estudos *In vitro* concluíram que o extrato de oliveira tem um efeito anti-genotóxico sobre o DNA, efeito inibitório na invasão e metástase e aumenta a barreira de proteção celular. Outros estudos com a linhagem de câncer de colo HT29 demonstraram que o extrato do fruto da oliveira inibiu a proliferação sem citotoxicidade e induziu apoptose pela via intrínseca o qual foi detectado pela formação de superóxido na mitocôndria (FERNANDES-ARROYO, 2011; AMBER *et al.*, 2011).

Modelos citotóxicos são importantes ferramentas para validar a toxicidades de compostos com potencial atividade terapêutica. Para estudar os efeitos citotóxicos do extrato da folha de oliveira e de alguns fenóis, tais como oleuropeína e luteolina, um modelo usando linhagens leucêmicas HL60 foi adaptado. Geralmente, o efeito citotóxico ocorre via indução de apoptose através de vários fatores, tais como FasL (receptor de Faz), TNF (fator de necrose tumoral) e TRAIL (receptor de TNF indutor de apoptose), agentes genotóxicos, tais como drogas anticâncer e radiação- $\gamma$  e stress oxidativo. Os resultados mostraram que o extrato de oliveira, oleuropeína e luteolina não causaram mutação celular e não foram genotóxicos e reduziram o dano oxidativo do DNA causado pelo peróxido de hidrogênio. Vários mecanismos bioquímicos poderiam explicar este efeito, tais como o bloqueio da ativação de carcinógenos através do aumento da síntese de enzimas envolvidas na desintoxicação, estimulação da etapa de reparo do DNA e intercepção dos carcinógenos antes de sua reação com o DNA (AMBER *et al*, 2011).



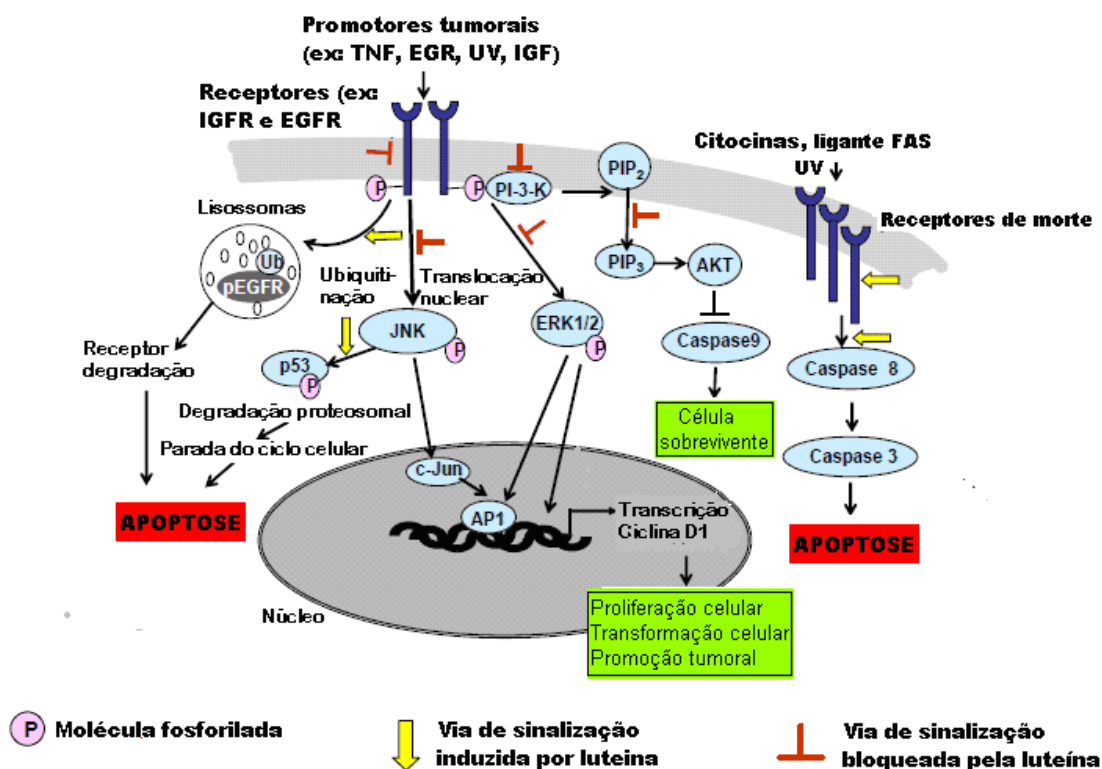
**Figura 18.** Efeito do extrato de folhas de oliveira (EFO), oleuropeína e luteolina sobre a morfologia de células HL60. Células foram expostas a 160  $\mu\text{l/ml}$  de EFO, 640  $\mu\text{l/ml}$  de Oleuropeína e 288  $\mu\text{l/ml}$  de luteolina por 2, 6, 24. As células foram observadas no microscópio de fluorescência. Células apoptóticas foram mostradas nos três tratamentos (ANBER *et al.*, 2010).

A maioria dos componentes do óleo de oliva tem sido identificada como agentes efetivos na intervenção nas fases de iniciação, promoção e

progressão da carcinogênese. Estudos têm mostrado que a oleuropeína inibe o crescimento de células diferenciadas de glioblastoma, de células de eritroleucemia, de células de adenocarcinoma renal, melanoma maligno, adenocarcinoma de col retal e sarcoma (OMAR, 2010).

Han *et al.* (2009) demonstrou que 200 µg/mL de oleuropeína reduziu a viabilidade das células MCF-7 e diminuiu o número de células MCF-7 através da inibição da taxa de proliferação e indução de apoptose celular. Além disso, oleuropeína exibiu efeito bloqueador da fase de transição G1 para S o qual foi manifestado pelo aumento pelo aumento no número de células nas fases G0/G1.

Goulas *et al.* (2009) demonstraram a atividade antiproliferativa de extratos crus de folhas de oliva e fitoquímicos (o composto dominante dos extratos é o oleuropeína) contra linhagens de células cancerígenas em concentrações micromolares. Estes extratos inibiram a proliferação de câncer de mama humano e de carcinoma de bexiga humano.



**Figura 19.** Vias de sinalização de transdução e sua modulação pelo flavonoide luteolína descritas na literatura (SEELINGER, *et al.*, 2008).

## 2.12. Farmacologia antineoplásica

Nos últimos anos o tratamento tem sido principalmente como a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia que em conjunto tem apresentado excelentes resultados (KATZ, 2001).

A quimioterapia contra o câncer refere-se à administração de drogas citotóxicas, capazes de inibir o crescimento ou promover morte celular. Foi introduzida na medicina há mais de cinquenta anos e tem como objetivo erradicar o tumor ou reduzir seu crescimento, diminuindo dessa forma os sintomas relacionados ao câncer, promovendo a cura ou prolongando a vida do paciente. (NYGREN, 2011).

A maioria dos quimioterápicos promove algum tipo de lesão na molécula de DNA, deflagrando o processo de morte celular programada. De modo geral, os quimioterápicos, clinicamente empregados, agem nas células em divisão e são denominados ciclo-específicos. Os agentes não-ciclo específicos são aqueles que são capazes de agir nas células tumorais que estão atravessando o ciclo celular ou em repouso no estágio  $G_0$  (RANG *et al.*, 2004).

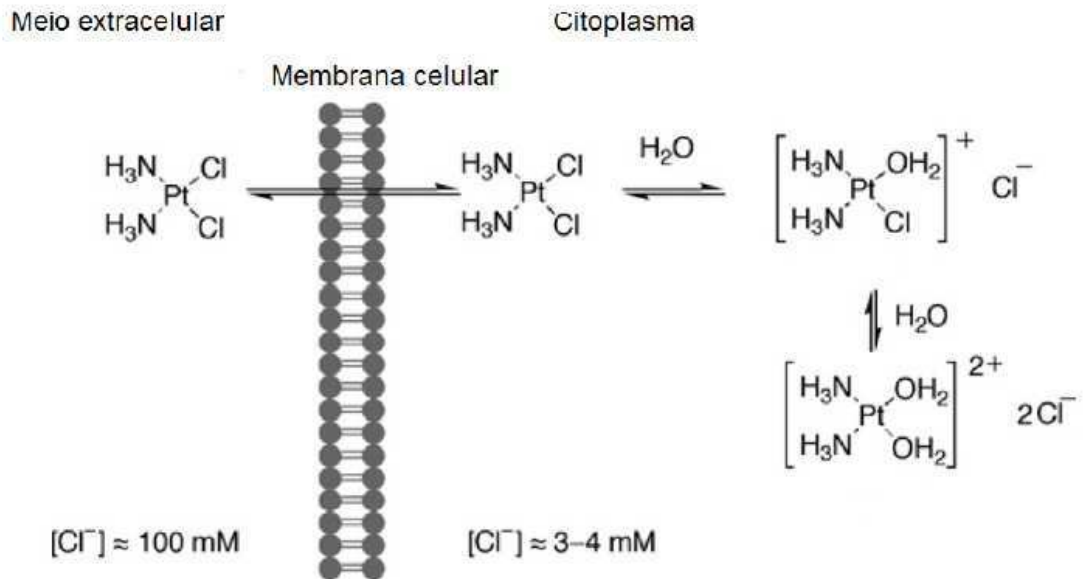
Uma grande limitação da quimioterapia no tratamento do câncer são frequentemente seus efeitos colaterais. Embora os fármacos com ação antitumoral sejam produzidos especificamente contra células cancerígenas, células hematopoiéticas e células epiteliais intestinais normais, e os queratinócitos da matriz capilar são frequentemente suscetíveis aos efeitos tóxicos desses agentes, o que explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia como náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior a infecção (ALMEIDA *et al.*, 2005, COLAN *et al.*, 2009).

Outra limitação da quimioterapia é a resistência específica de alguns tumores a determinados medicamentos aliados ao problema da resistência a múltiplas drogas (MDR), os quais têm sido apontados como uma das principais causas de falha terapêutica e de morte (FREMANDES *et al.*, 2005).

### 2.12.1 Cisplatina

O composto cisplatina foi um marco na introdução de compostos metálicos para o tratamento de câncer e serviu como um estímulo para pesquisa de uma variedade de outros compostos metálicos com propriedades antitumorais e com grande potencial para serem usados na prática clínica contra o câncer. Em 1978, a cisplatina foi aprovada para uso clínico de câncer de ovário e testículo pela FDA (Food and Drug Administration) (THOMPSON & ORVIG, 2006, RANJESWARAM, *et al.*, 2008). A cisplatina ou cisdiaminodicloroplatina (CIS-DPP) marcou os anos setenta representando um dos mais potentes agentes antitumorais usados clinicamente contra uma grandes variedades de tumores sólidos (AVENDANO & MENENDEZ, 2008).

A molécula de cisplatina apresenta dois radicais lábeis de cloro em configuração cis (Figura 20). A concentração alta de cloreto no sangue é suficiente para suprimir a hidrólise da cisplatina, permitindo que a droga chegue às células como uma molécula neutra (REEDIJK, 2003). Já dentro da célula, devido à baixa concentração de cloro, a cisplatina é hidrolisada e os cloretos da cis-DPP são substituídos por moléculas de água, gerando moléculas aquosas positivamente, responsáveis pela espécie ativa do fármaco. A cisplatina carregada positivamente reage com um nucleófilo forte, como o N7 da guanina, formando adutos com o DNA que inibem a sua transcrição e replicação, resultando em quebras e erros de codificação que acabam levando a célula a morte por apoptose (CULLEN *et al*, 2007).



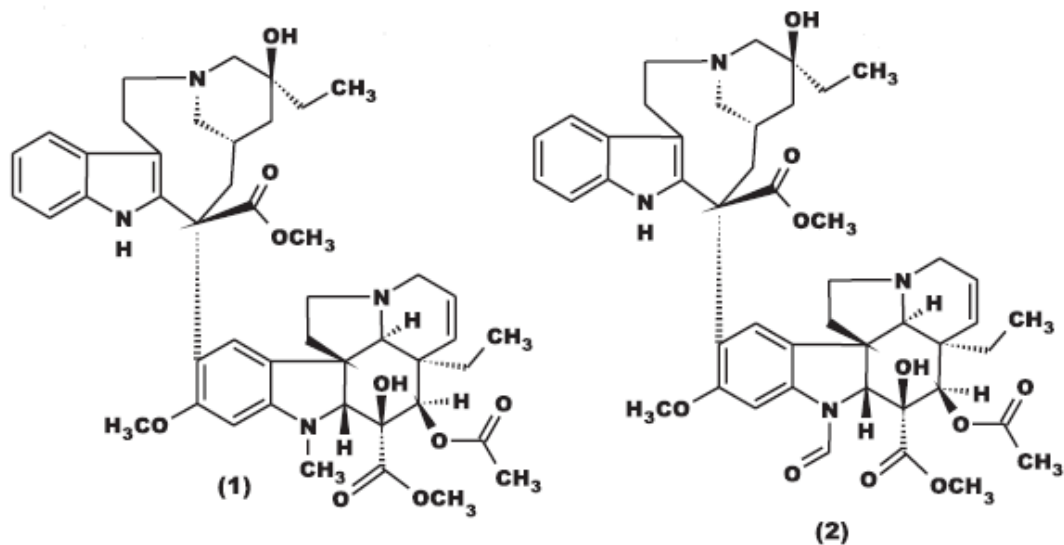
**Figura 20.** Bioativação intracelular da cisplatina (AVENDANO & MENENDEZ, 2008).

Pesquisas demonstram que a cisplatina induz a morte celular tumoral por bloqueia o ciclo celular em G2 e por ativar mecanismo apoptóticos. A cisplatina também pode agir de uma maneira independente da interação com o DNA nuclear. A morte celular induzida pela cisplatina de células epiteliais dos túbulos renais (LLC-PK1) ocorreu devido ao estresse do retículo endoplasmático e ativação da caspase 12, mecanismos comprovadamente ativados pela cisplatina (LUI & BALIGA, 2005).

O sucesso da cisplatina é limitado pelos efeitos colaterais como náusea, vômitos e o mais grave, nefrotoxicidade (MICWHINNEY *et al.*, 2009). Outro fator importante a limitação do tratamento com cisplatina é o desenvolvimento de resistência dos tumores a essas drogas (TORIGOE, 2005).

### 2.12.2 Vincristina

A descoberta de novos anticancerígenos de origem vegetal tem incentivado as pesquisas nessa área. Um dos exemplos mais importantes é o da *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, conhecida também como Vinca, que é utilizada pela população de Madagascar no tratamento de diabetes. Os produtos naturais vegetais (Figura 21) são antibióticos que agem na face M do ciclo celular e tem como maiores representantes os alcalóides vincristina e vimblasatina (BRANDAO *et al.*, 2010).



**Figura 21.** Estrutura de alguns fármacos antimitóticos: (1) vimblastina e (2) vincristina (BRANDAO *et al.*, 2010).

A vincristina é empregada no tratamento de certos linfomas de câncer testicular metastático e geralmente é utilizada em associação com outras drogas, com diferentes mecanismos de ação, como a cisplatina. A vincristina é de grande utilidade no tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil e tem como efeitos colaterais: náuseas, vômitos e mielossupressão (BRANDÃO *et al.*, 2010; MORIYAMA *et al.*, 2012. Compostos semi-sintéticos, derivados destes alcalóides, estão em uso clínico como vindesina, usada no tratamento do câncer de melanoma e carcinoma de pulmão e a vinorelbina, usada no tratamento de câncer de mama metastático e ovariano. Os agentes antimitóticos se ligam a tubulina inibindo a sua proliferação em microtúbulos, impedindo a formação do fuso mitótico o que paralisa a divisão celular (BRANDÃO *et al.*, 2010).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito citotóxico *in vitro* dos flavonoides morina, naringina e rutina e do extrato de folhas de oliveira contra as linhagens leucêmicas humanas (U937, THP-1), linhagens de tumores sólidos: SK-MEL-5 (melanoma), H460 (carcinoma de pulmão) e a linhagem murina B16F10 (melanoma).

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Avaliar se os flavonoides morina, naringina e rutina e do extrato de oliveira nas linhagens de células reduza viabilidade celular em linhagens de células U937, THP-1, SK-MEL-5, B16F10, H460, utilizando dos ensaios colorimétricos MTT, LDH.
2. Avaliar a porcentagem do tipo de morte celular induzida pelos compostos frente às linhagens leucêmicas U937 e THP-1 e de tumores sólidos H460, B16F10 e SK-MEL5 através do uso da técnica de microscopia de fluorescência.
3. Avaliar a alteração do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo.
4. Avaliar a ativação das caspases efetoras-3 e -6.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS.**

### **4.1 Área de coleta do material botânico**

O material botânico foi coletado na Fazenda Jardim das Oliveiras, localizada na Zona da Mata mineira, no sudeste do estado de Minas Gerais.

A fazenda localiza-se na estrada Araponga Estouro, s/n Córrego São Gabriel, Araponga MG (20 40 °S / 42 25 °W). A região é um dos poucos fragmentos contínuos da Mata Atlântica em Minas Gerais; estima-se que 40% de sua área sejam de vegetação primitiva. Esse índice, que pode ser considerado alto, se explica pela densidade da cobertura florestal da serra e por suas características topográficas: relevo acidentado e ocorrência de grotões e vales abruptos. Na região existem montanhas, vales, chapadas, encostas onde nascem diversos cursos d'água que contribuem de maneira significativa para a formação de duas importantes bacias hidrográficas do Estado: a do rio Doce e a do Paraíba do Sul.

O clima da serra tropical de altitude é úmido durante todo o ano e é responsável pela neblina recorrente que cobre a área e pelas temperaturas que variam de 10 a 25 °C, podendo chegar a valores inferiores a 0°C durante o inverno.

Os desníveis altimétricos da fazenda variam entre 1000 a 1300 metros. O solo é representado pelos tipos Cambissolos, Latossolos e Podzólicos. A temperatura anual varia de 16° a 28 °C e pluviosidade média anual de 2.268 mm. A vegetação local é reconhecida como Floresta Ombrófila Densa (LEONI, 2002).

A coleta de material vegetal nos fragmentos florestais foi feita sob a forma de caminhada aleatória, adentrando-se pelo terreno declinado. As espécies foram identificadas pelo Botânico Júlio A. Lombardi.

### **4.2 Material Botânico**

#### **4.2.1 Coleta**

Folhas de indivíduos adultos foram coletadas com o auxílio de tesoura de poda. Amostras testemunhas foram depositadas no herbário Rioclarense

(HRCB), Universidade Estadual Paulista, sob o número de registro VIC: 36.631.

#### **4.2.2 Preparação do Extrato Vegetal**

Folhas de oliveira, da família da *Olea europaea L.*, foram submetidas à secagem em estufa de ventilação forçada, sob temperatura constante de 40°C até estabilização do peso, desta forma foi obtida a matéria seca para os materiais supracitado.

O material desidratado foi triturado em gral com pistilo; neste procedimento foram utilizados 1,0kg de folhas de Oliveira. O material com granulometria reduzido foi depositado em um frasco âmbar e submetido a uma extração por maceração em álcool etílico absoluto (PA) diluído em água destilada 1:1 por sete dias, à temperatura ambiente. O período para a extração exaustiva foi de 30 dias. A cada sete dias o líquido extrator foi filtrado e um novo líquido extrator foi adicionado. O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotativo sob temperatura controlada entre 40 e 50°C. O processo de secagem do extrato das folhas foi finalizado com liofilizador dando origem a um material seco. Ao final, foi verificado o rendimento dos extratos e os mesmos foram armazenados em recipiente plástico opaco, em presença de agente dessecante.

#### **4.3 Experimento in vitro**

As atividades experimentais de viabilidade celular dos compostos testados, quantificação da Lactato Desidrogenase, apoptose, alteração do potencial de membrana mitocondrial e atividades de Caspases sobre as linhagens de células U937, THP-1, B16F10, SK-MEL-5 e H460 foram realizadas no Laboratório de Biologia do Reconhecer da Universidade Estadual do Norte Fluminense Dacy Ribeiro (UENF), situada em Campos do Goytacazes, RJ, em uma parceria com o laboratório de Biofármacos do departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. A Morina, 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazom (MT), vincristina, laranja

de acridina e brometo de etídio foram comprados da Sigma Chemistal (St. Louis, MO, SUA).

#### **4.3.1 Cultura da linhagem de célula de origem tumoral.**

As células U937, (leucemia de origem linfóide), THP-1 (leucemia monocítica), B16F10 (melanoma murino), SK-MEL-5 (melanoma), H450 (carcinoma de pulmão), foram cultivadas em meio D-MEM F12 (Gibco, BRL) suplementado com 20µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). As culturas foram replicadas a cada 2 dias e mantidas em estufa (Forma Scientific Inc., modelo 3159) a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade controlada.

#### **4.3.2 Avaliação *in vitro* da atividade biológica dos extratos contra as células tumorais**

As células U937, THP-1, SK-MEL-5, B16F10, H460, foram plaqueadas em volume de 100 µL/poço ( $1 \times 10^6$  cels/mL) em placas de 96 poços, tratadas com os flavonoides morina, naringina, rutina nas concentrações finais de 50 µM, 100 µM, 200 µM e 400 µM e 800 µM e com o extrato de *Olea europaea L.* nas concentrações finais de 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL e 800 µg/mL para os testes de viabilidade celular com MTT (-3-(4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5- difenil-2-H-brometo de tetrazolium). As células foram mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade controlada. No tempo de 48 horas as células foram avaliadas quanto à inibição de crescimento (MTT) e quanto ao índice da enzima desidrogenase láctica liberada, e após 12, 24, 36 e 48 horas quanto à tipo de morte celular analisados por microscopia de fluorescência. Como controles negativos todas as células foram incubadas com meio DMEM F12 (Gibco, BRL) suplementado com 20µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). Para o extrato as células foram incubadas com DMSO (SIGMA®) a 1%.

#### **4.3.3 Avaliação do efeito citotóxico dos extratos contra às células tumorais**

Após tratamento como no item anterior, a viabilidade celular foi determinada através do microensaio colorimétrico utilizando MTT - [3(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MOSMANN, 1983). As células foram incubadas por 48 horas com os flavonoides e o extrato de oliveira e após o tempo determinado foram adicionados 10 $\mu$ L de MTT (Sigma, 5mg/mL) para cada 100 $\mu$ L de cultivo. As placas foram mantidas na estufa por até quatro horas. Após esse período foram retirados 150 $\mu$ L do sobrenadante de cada poço e depois adicionados 100 $\mu$ L de uma solução de HCl com isopropanol, homogeneizando bem até a completa dissolução dos cristais de sal formados. A placa de 96 poços foi lida em espectrofotômetro (MULTISKAN-EX) utilizando o comprimento de onda de 570nm. Os resultados foram analisados através da absorbância de cada poço e os experimentos realizados em triplicatas.

#### **4.3.4 Quantificação da Lactato Desidrogenase (LDH) liberada pelas células após incubação com os extratos.**

Após tratamento como no item 4.2.3, a viabilidade celular foi determinada através da dosagem da Lactato Desidrogenase (LDH). A determinação da LDH é proporcional ao número de células lisadas por necrose *in vitro*. Para quantificação da LDH foi utilizado o KIT DOLES de mensuração. As células foram plaqueadas com os flavonoides e o extrato de oliveira por 48 horas. Após o tempo de incubação, 50 $\mu$ M do sobrenadante foram transferidos para outra placa onde foram adicionados 100 $\mu$ M da solução A (250 $\mu$ M de alúmen férrico + 400 $\mu$ M de substrato) e incubadas em estufa por 3 minutos. Posteriormente foram adicionados 100 $\mu$ M da solução B (225 $\mu$ M de FMS/NAD + 4275 $\mu$ M de água destilada) e incubadas em estufa por 7 minutos. A placa de 96 poços foi lida em espectrofotômetro (MULTISKAN-EX) à 492nm. Após tratamento com o ensaio MTT, a viabilidade celular foi determinada através da dosagem da Lactato Desidrogenase (LDH).

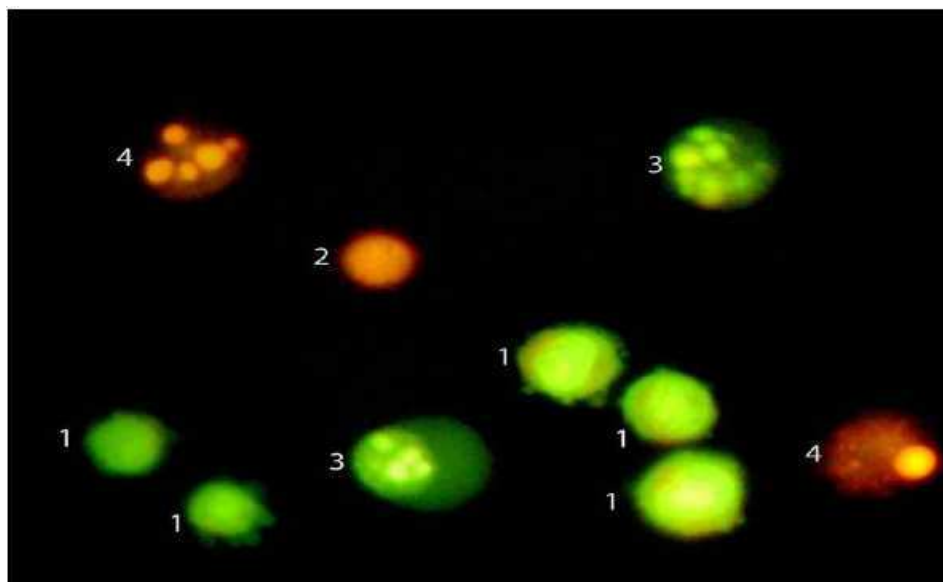
#### 4.3.5 Avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência

As células cultivadas com os compostos conforme os tempos e concentrações indicados, 12, 24 e 36 horas para os flavonoides e 12, 24, 36 e 48 horas para o extrato de oliveira, foram coradas com uma solução de 10 µg/mL laranja de acridina (Sigma) e 10 µg/mL de brometo de etídio (Sigma). Após a montagem em lâmina e lamínulas, as células foram levadas ao microscópio de fluorescência (Axioplan – Zeiss) e contadas aproximadamente 300 células em vários campos escolhidos aleatoriamente, discriminando-se as células apoptóticas, necróticas e normais. Foram feitas duplicatas para cada condição e os experimentos repetidos pelo menos duas vezes.

Foram adotados padrões convencionais com relação à morfologia e coloração das células (Figura 22):

- 1) Células vivas: possuem morfologia do núcleo intacta, DNA corado por laranja de acridina (cor verde).
- 2) Células apoptóticas: condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, DNA corado por laranja de acridina (cor verde), que reflete a membrana plasmática intacta e não permeável ao brometo de etídio.
- 3) Células necróticas-primárias: morfologia do núcleo necrótico, corado por brometo de etídio (cor vermelha).
- 4) Células necróticas-secundárias: condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, DNA corado por brometo de etídio (cor vermelha) e laranja de acridina, que demonstra a permeabilização necrótica da membrana plasmática que permite a entrada do brometo de etídio.

A porcentagem de cada população celular – células normais, apoptóticas e necróticas – em relação ao total foi calculada. Foram consideradas para o cálculo da porcentagem de apoptose as células apoptóticas e as necróticas secundárias, também chamadas de apoptose-necrose.



**Figura 22.** Microscopia de fluorescência de células U937 evidenciando as características para a classificação das células como mencionadas acima: 1 – normal, 2 – Necrose, 3 – Apoptose primária, 4 – Apoptose-necrose (apoptose secundária).

#### **4.3.6 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo (JC-1)**

A constatação do mecanismo de morte celular por apoptose é crucial para o desenvolvimento de novos compostos antitumorais. Como algumas características da apoptose e necrose acabam se sobrepondo, o uso de várias técnicas independentes somam resultados importantes para a confirmação do mecanismo de morte induzido por compostos com atividade antineoplásica. A avaliação do potencial de membrana mitocondrial pode ser feita utilizando o marcador catiônico lipofílico fluorescente JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) que difunde livremente para o interior da célula. Na mitocôndria, que apresenta potencial de membrana normal, a carga residual negativa da matriz mitocondrial, gerada pelo bombeamento de prótons para o espaço intermembranoso, permite o acúmulo deste fluorocromo no interior da mitocôndria.

Quando a concentração do JC-1 se torna elevada na matriz mitocondrial ele forma agregados que fluorescem na região do vermelho. A forma monomérica do JC-1 emite fluorescência verde, assim, em células onde ocorreu o colapso do potencial de membrana mitocondrial não ocorre a formação de agregados de JC-1 e as células apresentam citoplasma com fluorescência verde (Smiley

*et al.*, 1991; Cossarizza *et al.*, 1993). O citômetro de fluxo quantifica as células que possuem mitocôndria normal e com potencial de membrana alterado por meio do detector FL1 (fluorescência 1) que capta luz na região do verde (510-527 nm) e do detector FL2 (Fluorescência 2) que capta luz na região do laranja (585-590 nm). A concentração testada para os compostos pré-selecionados foi de 200 e 400 µM para o flavonoide morina e 400 e 800 µ/ml. As linhagens tumorais foram plaqueadas como descrito no item anterior. Em seguida foi adicionado 500 µL/poço de cada composto avaliado e as células foram incubadas por 48 horas em estufa (37°C e 5% de CO<sub>2</sub>). Após o período de incubação o conteúdo de cada poço (1 mL) foi transferido para eppendorf (2 mL) e centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” incubado por 15 minutos em estufa (37°C e 5% de CO<sub>2</sub>) com 100 µL de solução de JC-1 (25 µg/mL diluído 1:1000 em meio de cultura, Sigma). As células em suspensão foram centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm e lavadas duas vezes com 2 mL de meio de cultura D-MEMF12 (Gibco, BRL). O sobrenadante foi descartado e o “pellet” obtido ressuspensionado em 500 µL de meio de cultura D-MEMF12 (Gibco, BRL) e a leitura foi realizada imediatamente em citômetro de fluxo (FACS Calibur). Os gráficos *Dot-plot* e a porcentagem de células com mitocôndrias normais e comprometidas foram obtidos através do software WinMDI versão 2.9.

#### **4.3.7 Avaliação das caspases**

Para análise das caspases foi utilizado o *Colorimeter Sampler Kit* (Invitrogen) contendo substratos para a caspase-6 e para caspase-3. O protocolo para detecção das caspases seguiu os procedimentos descritos pelo fabricante. Resumidamente, as culturas contendo  $1 \times 10^6$  cels/ml foram incubadas com uma concentração de 400 para os flavonoides ativos e 800 µg/ml para o extrato de oliveira por 24, 36 e 48 horas. Posteriormente as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500rpm e ressuspensionadas em 50 µL do tampão de lise. As amostras foram centrifugadas por 1 min (10.000xg) e em seguida adicionados 50 µL do substrato (4mM). As amostras foram incubadas a 37 °C por 2 horas, no escuro, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (ThermoLabsystemsMultiskan, modelo 352) utilizando o comprimento de onda de 405 nm.

#### **4.3.8 Análise estatística**

Os resultados foram expressos por média  $\pm$  desvio padrão, analisados de forma independente. Os ensaios foram analisados por ANOVA - One-way - seguido de Tukey utilizando o programa Graph Pad versão 5.0. As diferenças significativas foram consideradas como  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliações do efeito dos compostos na viabilidade celular por MTT

Os resultados do teste de viabilidade celular por metabolização do MTT mostraram que o composto morina e o extrato de folha de oliveira foram capazes de reduzir a viabilidade das linhagens leucêmicas U937, THP-1, e da linhagem melanômica SK-MEL-5 de maneira dose dependente para 200, 400 e 800  $\mu\text{M}$  e  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, conforme observado na figura 23. Para as linhagens melanômica B16F10 e carcinoma de pulmão H460 a morina e o extrato de folha de oliveira reduziram significativamente a viabilidade celular nas doses dependentes 400 e 800  $\mu\text{M}$  e 800  $\mu\text{g/ml}$  para os respectivos compostos. O DMSO (dimetilsulfóxido), veículo utilizado para diluição dos compostos, não afetou a viabilidade celular das linhagens testadas.

A redução da viabilidade celular pelos compostos rutina e naringina foi inexpressiva para todas as linhagens de células cancerígenas testadas (Figura 24) não permitindo o cálculo da  $\text{EC}_{50}$ , como pode ser observado na tabela 03.

Vários trabalhos têm mostrado que flavonoides inibem a carcinogênese modulando os reguladores de apoptose, ativando caspases-3, -8 e -9 (RAMOS *et al.*, 2007; LANDIS-PIWOWAR *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2008;; OLA *et al.*, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2011).

O ciclo celular é uma sequência de eventos que permite à célula crescer e replicar (FOSTER, 2008). Seu controle envolve proteínas reguladoras do ciclo celular chamadas de ciclinas (A, B, Ds ou E); quinase dependentes de ciclinas (CDks,) (CDK 1, 2, 4, ou 6) e inibidores de CDK, tais como p21, p27, p53 e retinoblastoma fosforilada (PRb) (SOBRATTEE *et al.*, 2006; KUO *et al.*, 2007; ARAUJO *et al.*, 2011). Qualquer alteração de uma proteína específica do ciclo celular pelo flavonoide pode afetar o crescimento e proliferação das células cancerígenas (RAMOS *et al.*, 2008). Além disto, a regulação do ciclo celular (*checkpoint*) durante a progressão  $\text{G}_1/\text{S}$  e  $\text{G}_2/\text{M}$  são importantes alvos para os flavonoides (ARAUJO *et al.*, 2011). Alguns flavonoides como miricetina e crisina demonstraram propriedades quimoprotetoras contra o câncer coloretal (CRC) apresentando efeitos

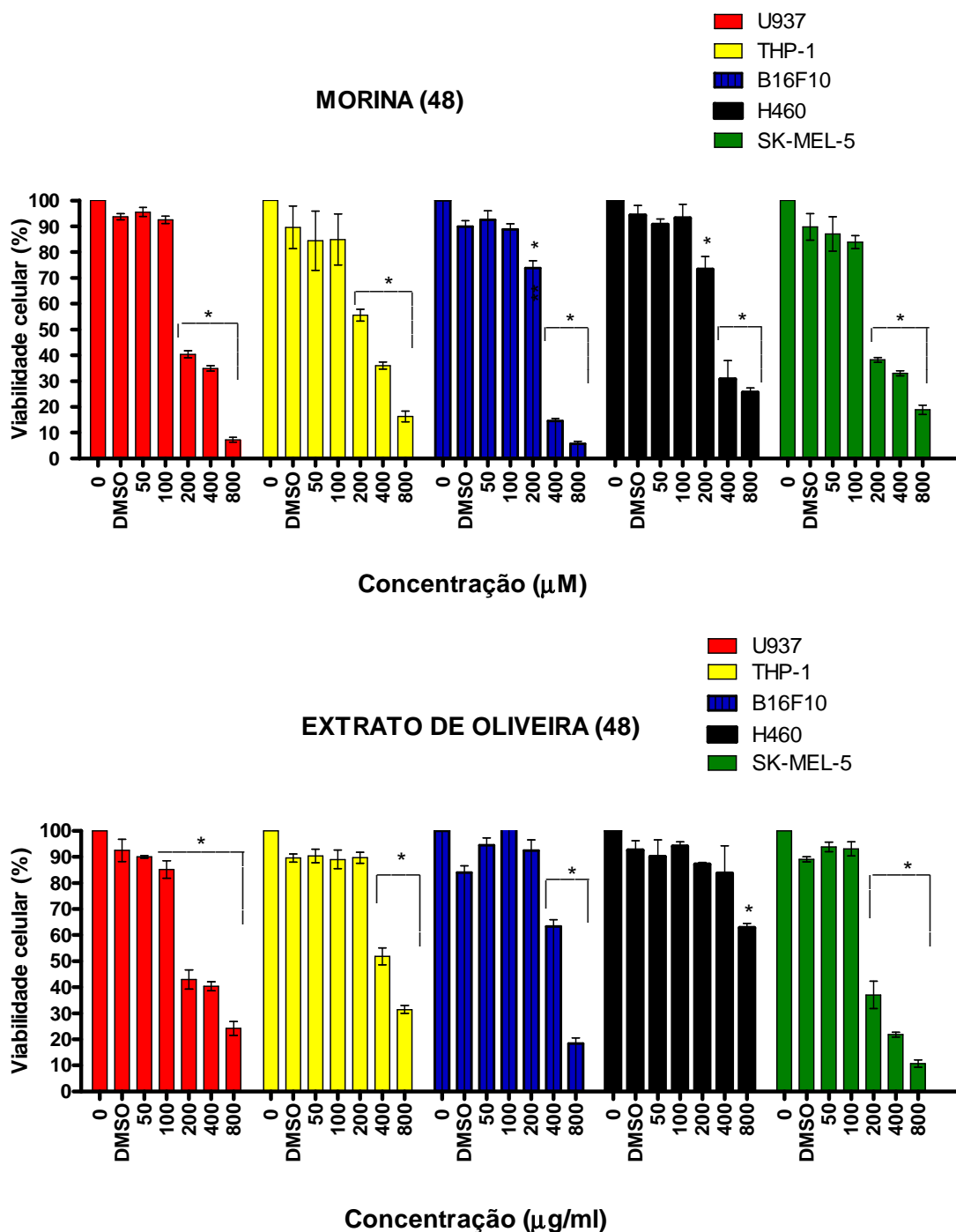
antiproliferativos, induzindo o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, indução de inibidores de CDK via p21 e inibição de radicais livres (SHIN *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2010).

O flavonoide morina é capaz de inibir a proliferação celular em vários tipos de células carcinogênicas inibindo o ciclo celular na fase S em vários tumores como carcinoma oral e em hepatócitos humanos (BROWN, *et al.*, 2003; KUO *et al.*, 2007)

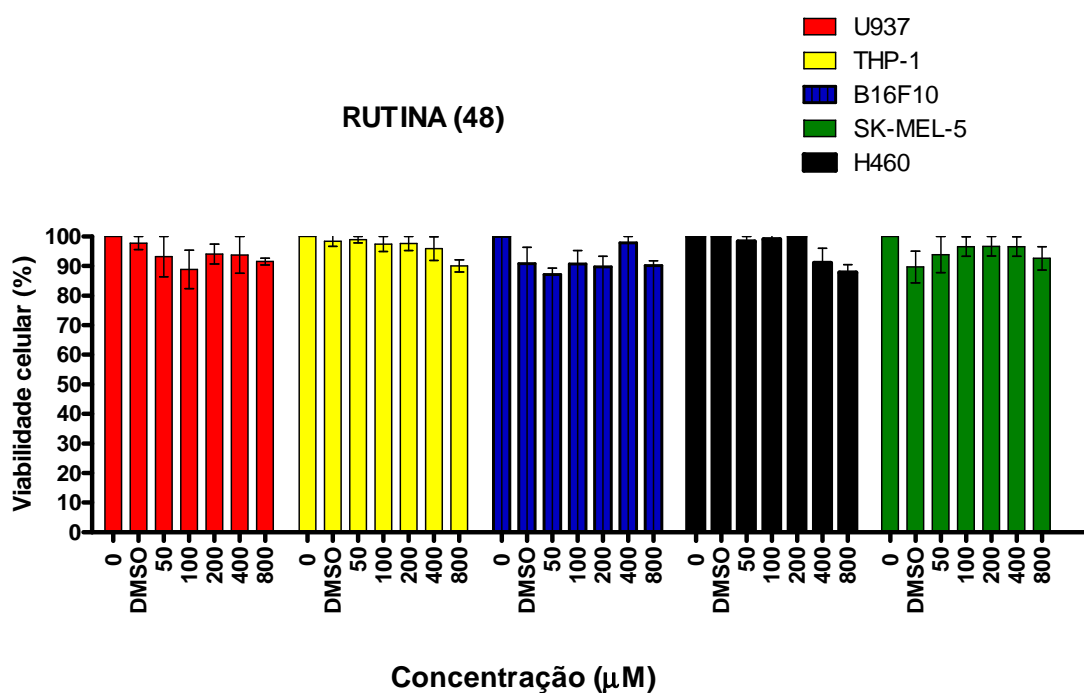
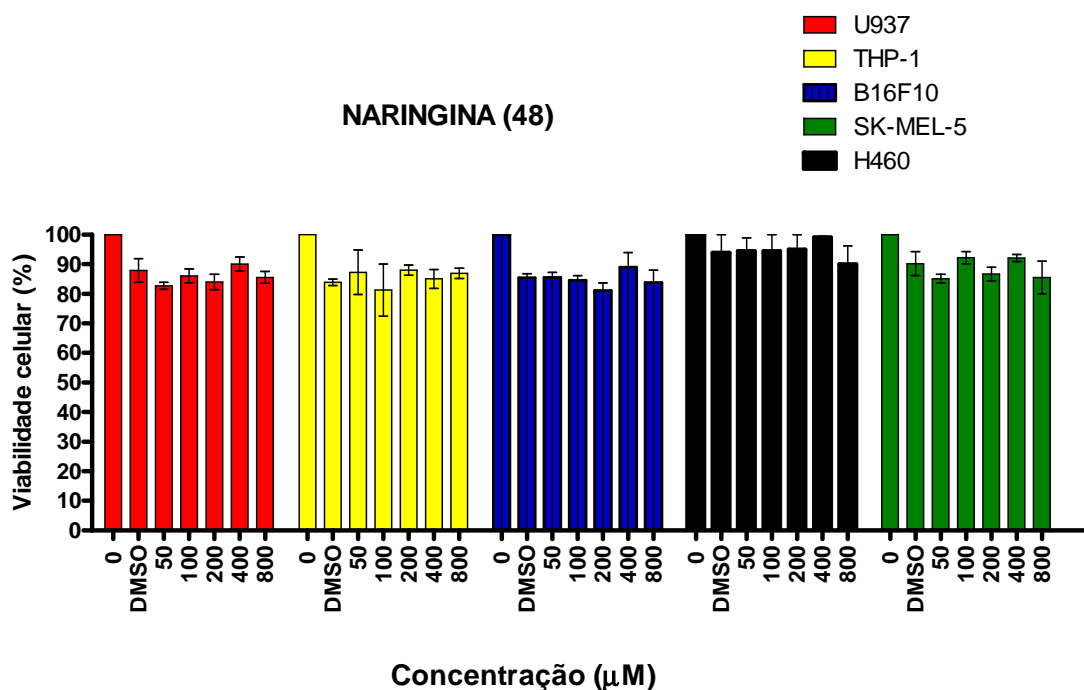
O extrato de oliveira possui uma quantidade apreciada de compostos fenólicos (GRANADOS-PRINCIPAL *et al.*, 2010; BURATTINI *et al.*, 2013). Inúmeros estudos demonstram que o flavonoide luteolina, um dos compostos presente no extrato de oliveira, apresentou várias vias bioquímicas de ação antitumoral tais como o bloqueio do ciclo celular na fase G1/S, redução da atividade da ciclina D1 via fosforilação da proteína e degradação proteossomal (ONG *et al.*, 2010).

Estes resultados podem ter significado por várias razões. Uma delas é que a morina é capaz de suprimir a ativação da STAT3 pela fosforilação no  $\text{Tyr}^{705}$  e  $\text{Ser}^{727}$  ou pela retenção nuclear e inibir a ligação da STAT3 com a molécula de DNA (GUPTA *et al.*, 2013). Vários estudos têm sugerido que o ativador de transcrição 3 (STAT3) desempenha um papel importante na patogênese de vários cânceres por vários motivos: (1) a ativação de STAT3 tem sido relatada em melanomas múltiplos e vários outros tipos de cânceres, (2) STAT3 participa da tumorigênese através da expressão de genes envolvidos na proliferação de células tumorais (ex: c-myc, ciclina D1), genes de sobrevivência (ex: Mcl-1, Bcl-xL, survivina), genes de invasão (ex: matrix metaloproteinase-9) e genes da angiogênese (ex: VEGF) (3) STAT3 é ativado em resposta a vários fatores de crescimento, incluindo IL-6 e EGF, (4) a ativação do STAT3 tem sido relacionada com a resistência ao tratamento terapêutico e diminuição da sobrevivência em pacientes com múltiplo mieloma (AGGARWAL *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2011). O flavonoide morina tem efeitos em várias quinases e fosfatases que atuam na via de ativação da STAT3 (ALAS & BONAVIDA, 2003). Janes Quinase tais como JAK-1 e JAK-2, as quais apresentam elevada expressão em células de melanoma múltiplas, desempenham um papel na ativação da STAT3 (GUPTA *et al.*, 2013). Foi demonstrado que a morina inibe o acúmulo de JAK-1 e JAK-2 em células de mieloma múltiplo e que os grupos

hidroxila presentes no anel B do flavonol foi essencial para a inibição da ativação da STAT3 (GUPTA *et al.*, 2013).



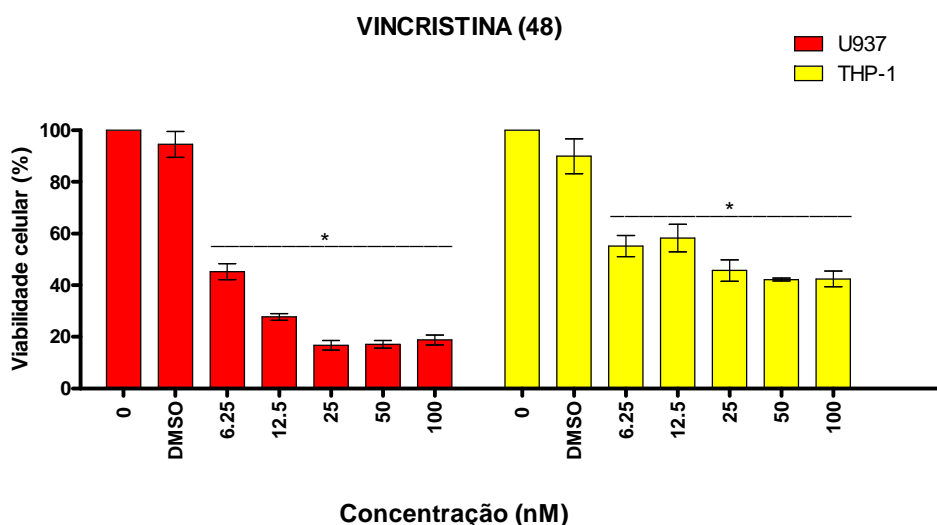
**Figura 23.** Efeito citotóxico do composto morina e do extrato de oliveira contra às células humanas U937, THP-1, , H460, SK-MEL-5 e morina B16F10 após 48 horas de incubação. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 1%. \*P<0.05; valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).



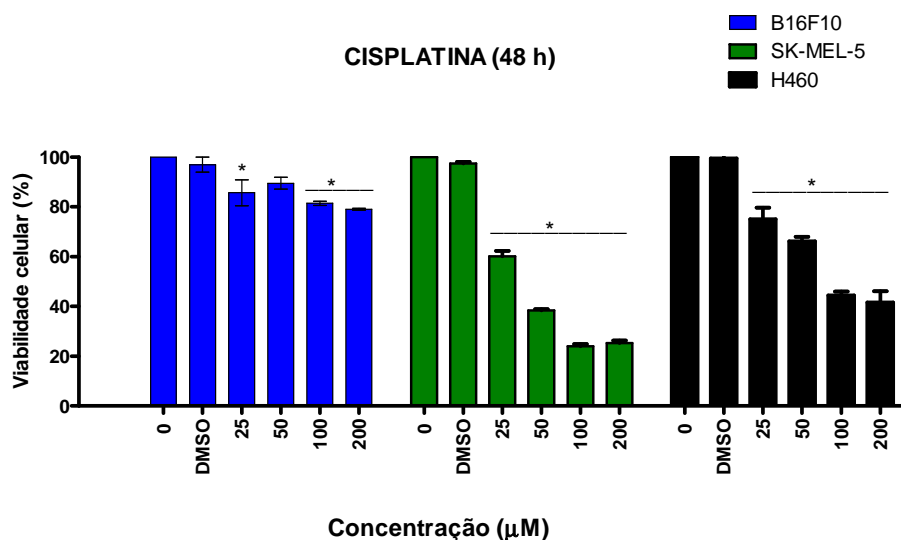
**Figura 24.** Efeito citotóxico do composto naringina e rutina contra as células humanas U937, THP-1, H460, SK-MEL-5 e morina B16F10 após 48 horas de incubação. A avaliação foi feita através do micro ensaio colorimétrico utilizando MTT. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 0,2%. \* $P < 0.05$ ; valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

Como controle positivo, foi avaliado o efeito citotóxico do composto orgânico vincristina, para linhagens de células leucêmicas (U937 e THP-1), na

concentração nM (Figura 25) e do composto cisplatina para as linhagens B16F10, SK-MEL-5 e H460, (Figura 26).



**Figura 25.** Efeito citotóxico do composto vincristina (controle positivo) contra as células humanas U937, THP-1, após 48 horas de incubação. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 0,2%. \*P<0.05, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).



**Figura 26.** Efeito citotóxico do composto cisplatina contra a célula morina B16F10 e as humanas H460, SK-MEL-5 após 48 horas de incubação. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 0,2%. \*P<0.05, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

Para efeito de uma melhor comparação da atividade dos compostos contra às diferentes células testadas foi calculado a dose efetiva 50% com base no teste de viabilidade, MTT (concentração dos compostos capaz de

induzir morte em 50% das células tratadas). A  $EC_{50}$  foi determinada utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0 através da curva de regressão não linear, a partir dos dados apresentados nas figuras 22, 23, 24 e 25.

Analisando os dados da tabela 03 pode-se observar que o composto morina apresentou os menores valores de  $EC_{50}$  para todas as linhagens de células testadas, sendo portanto, o composto de menor concentração capaz de matar 50% das células testadas. Pela tabela percebe-se também que o extrato de oliveira apresentou menor valor de  $EC_{50}$  para a SK-MEL-5.

**Tabela 3.** Dose efetiva ( $EC_{50}$  ( $\mu\text{M}$  e  $\mu\text{g/ml}$ )) dos compostos baseados no ensaio de citotoxicidade celular por MTT.

<b>Compostos</b>						
<b>Linhagens</b>	<b>Morina (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Extrato de oliveira (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Naringina (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Rutina (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Vincristina (nM)</b>	<b>Cisplatina (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>U937</b>	220,3 $\pm$ 1,08	254,7 $\pm$ 1,09	> 800	> 800	6.46 $\pm$ 1,13	ND*
<b>THP-1</b>	254,8 $\pm$ 1,11	475,3 $\pm$ 1,08	> 800	> 800	26,15 $\pm$ 1,24	ND*
<b>SK-MEL-5</b>	203,2 $\pm$ 1,13	191,7 $\pm$ 1,08	> 800	> 800	ND*	18,57 $\pm$ 1,08
<b>B16F10</b>	253,6 $\pm$ 1,05	479,0 $\pm$ 1,06	> 800	> 800	ND*	>100
<b>H460</b>	318.8 $\pm$ 1,08	>800	> 800	> 800	ND*	55.87 $\pm$ 1,10

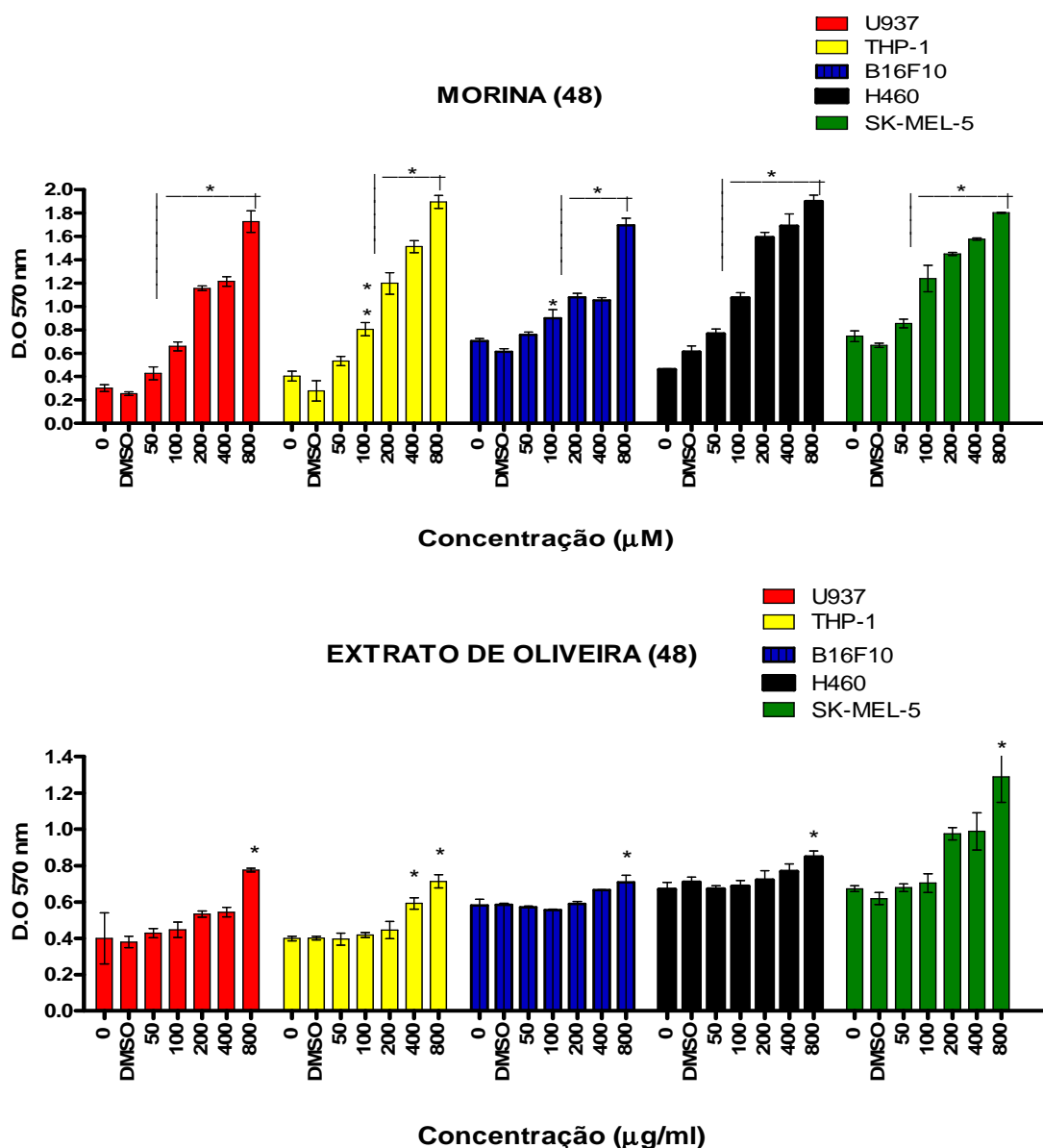
\*ND – Não determinado

## **5.2 Avaliações da viabilidade celular pela liberação de lactato desidrogenase**

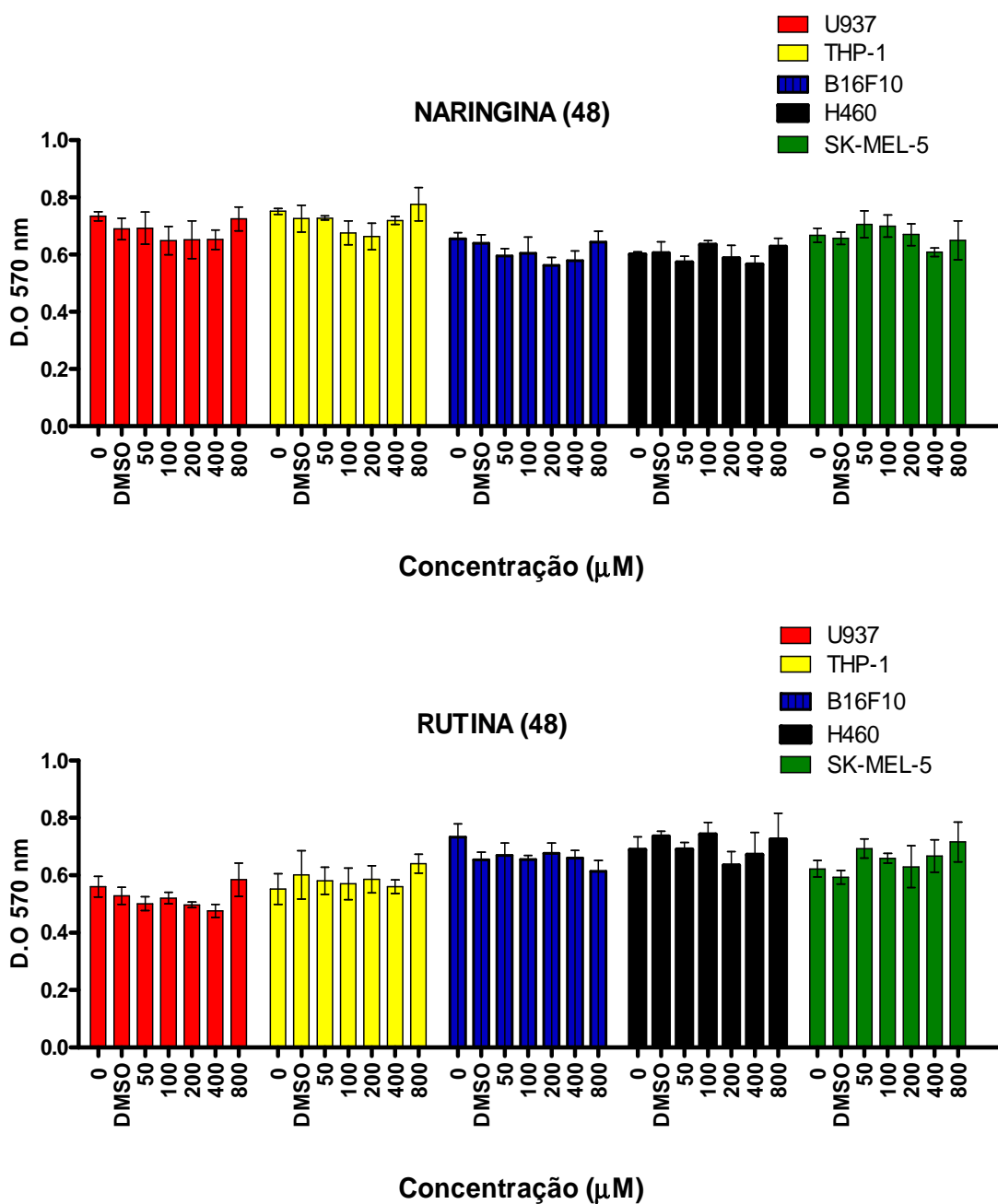
Na figura 27 e 28 podemos observar que todas as linhagens tratadas com o composto morina apresentaram aumento de liberação da enzima LDH nas concentrações 400  $\mu\text{M}$  e 800  $\mu\text{M}$ . O extrato de folha de oliveira obteve um ligeiro aumento da liberação da LDH para as linhagens de células U937, THP-1, S-KMEL-5, B16F10. Já as células H460, tratadas com o extrato de

folha de oliveira e todas as células tratadas com os compostos naringina e rutina não foram capazes de liberar estas enzimas, indicando que a membrana plasmática destas células permaneceu intacta e normal após tratamento (Figura 28).

Este resultado indica ruptura da membrana plasmática nas maiores concentrações o que confirma a redução da viabilidade celular pelo método de MTT. Sua presença sugere morte celular por necrose. Entretanto, este resultado pode ser um artefato, uma vez que células em apoptose *in vitro* podem entrar em necrose posteriormente.



**Figura 27.** Avaliação da liberação da LDH (desidrogenase láctica). O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 1%. \*P<0.05, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).



**Figura 28.** Avaliação da liberação da LDH (desidrogenase láctica). O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 0,2%. \*P<0.05, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

## 5.3 Avaliação do tipo de morte celular

### 5.3.1 Microscopia de Fluorescência

Esta avaliação foi realizada com a finalidade de se determinar o mecanismo de morte celular induzida pelos compostos orgânicos.

A morfologia nuclear (condensação perinuclear da cromatina, colapso nuclear e fragmentação) permitiu-nos distinguir células apoptóticas de células viáveis e necróticas. Foi observado que o flavonoide morina e o extrato da folha de oliveira promoveram alto percentual de apoptose em todas as linhagens de células testadas.

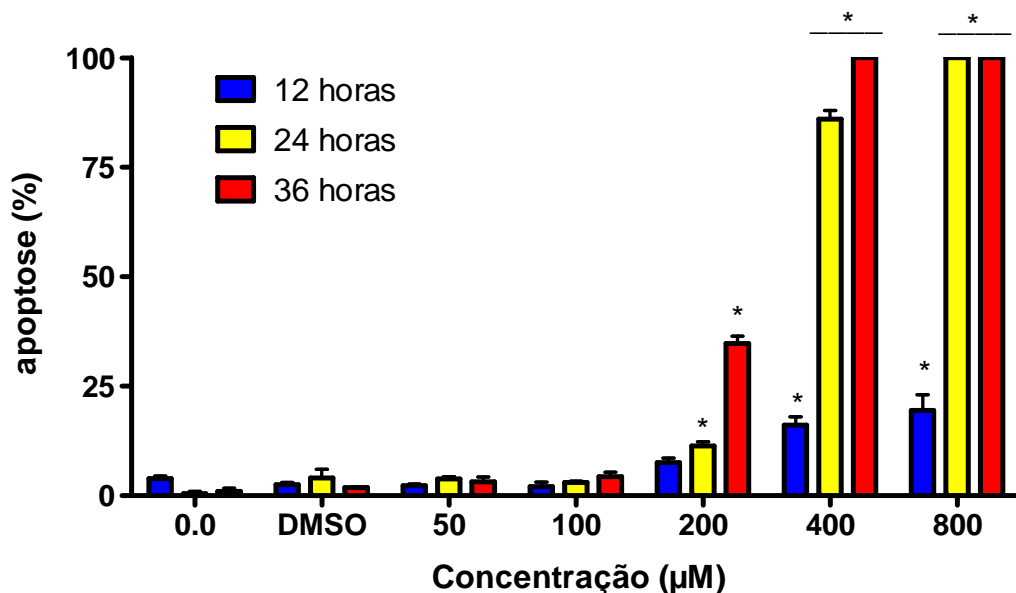
As características morfológicas das linhagens U937, THP-1, S-KMEL-5, B16F10 e H460 foram observadas por microscopia de fluorescência nos tempos de 12, 24, 36 para morina e 12, 24, 36 e 48 horas para o extrato de oliveira. Os resultados de indução de morte celular por apoptose para a linhagem de células cancerígenas testadas são apresentados na figura 29 e 30.

Avaliando-se as diferentes concentrações nos tempos estudados, observou-se que, de forma geral, a indução de apoptose é um processo tempo e concentração dependentes. Vários estudos comprovaram que a maioria dos fármacos antitumorais promoveu a morte das células cancerígenas através da apoptose. Deste modo, compostos que promovem apoptose como via de indução de morte celular são fortes candidatos a fármacos com ação antitumoral (ONRUBIA *et al.*, 2012). Flavonoides são compostos promissores, pois atuam como moléculas supressoras da carcinogêneses em função de suas propriedades antioxidantes, antiproliferativas e antiinflamatórias (KILANI-JAZIRI *et al.*, 2011; JASH & BRAHMACHARI, 2013).

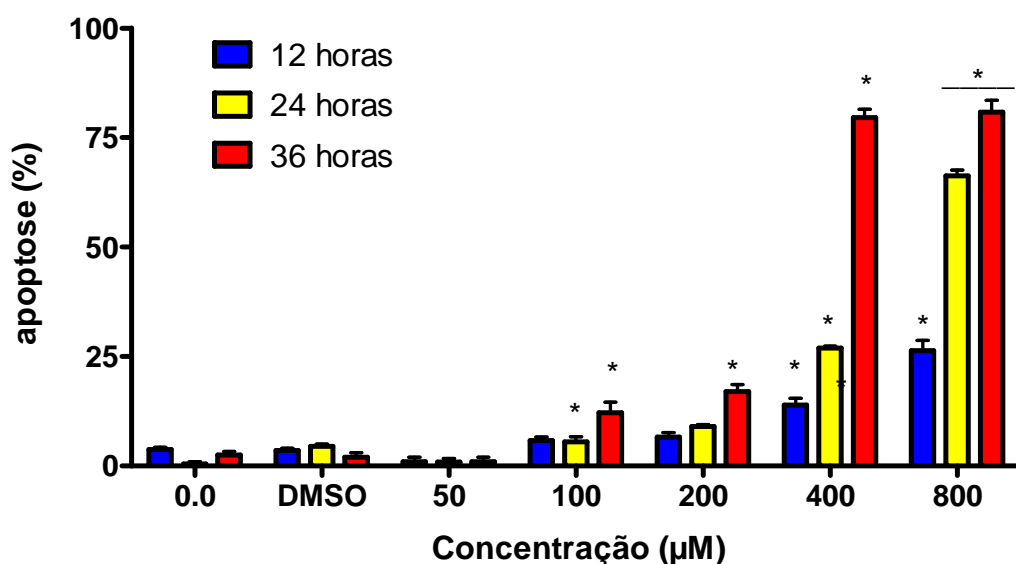
É bem conhecido que as mitocôndrias desempenham um importante papel na regulação de apoptose (PORTT *et al.*, 2010). A apoptose pode ser dividida em vias mitocôndria-dependente e independente, via intrínseca e extrínseca, respectivamente. No entanto, disfunções mitocondriais, incluindo a perda de potencial de membrana mitocondrial, a permeabilidade, transição e liberação de citocromo C da mitocôndria para o citosol, estão associadas com a apoptose (DUPREZ *et al.*, 2009; WHELAN *et al.*, 2010). Assim, o tratamento

com morina pode induzir apoptose pela via intrínseca em células HL-60 (KUO *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2011).

### MORINA (U937)



### MORINA (THP1)



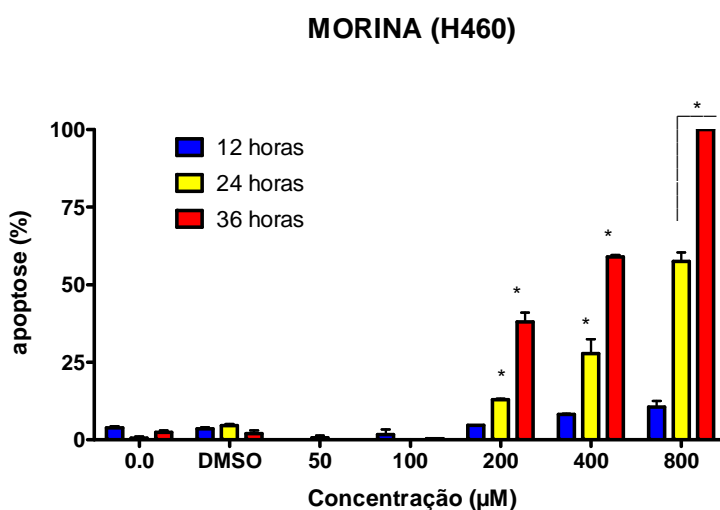
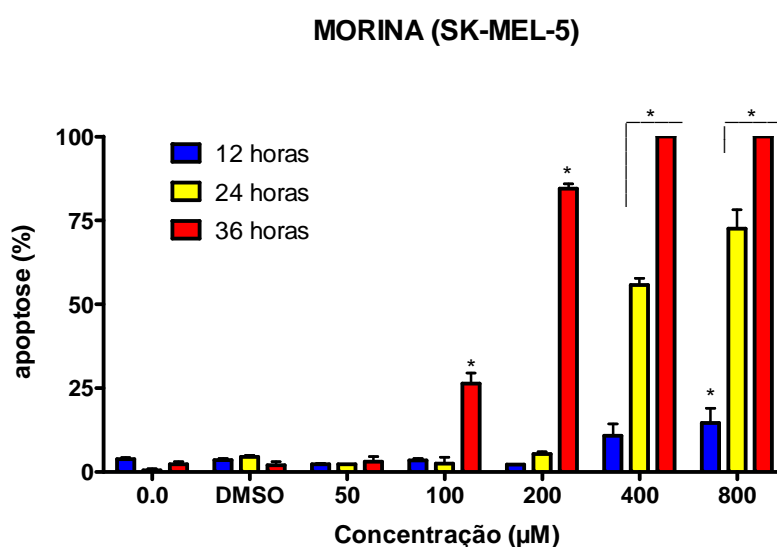
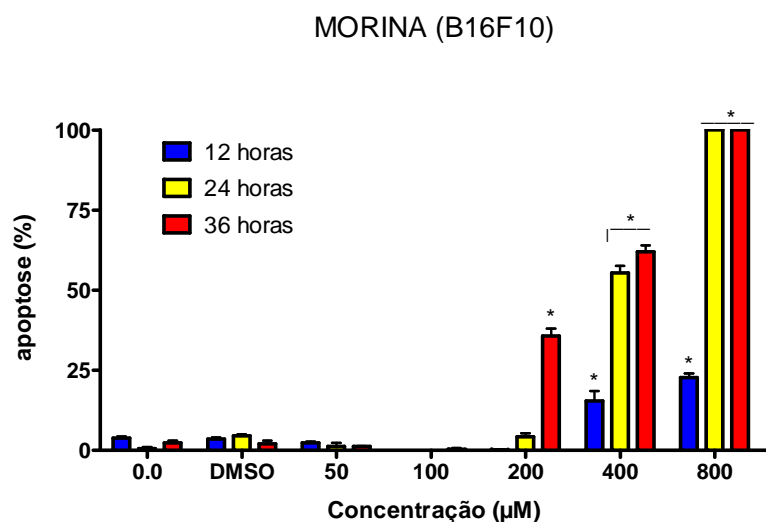
**Figura 29.** Porcentagem de apoptose induzida pelo composto morina nas linhagens neoplásicas U937, THP-1 determinada por microscopia de fluorescência em três tempos diferentes, 12, 24, 36. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 0,2%. \*P<0.05, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

A figura 29 mostra a porcentagem de apoptose induzida pelo composto morina em duas linhagens de células tumorais humanas (U937 e THP-1). Observa-se através dos gráficos que o composto foi capaz de induzir a apoptose nas linhagens de célula U937 nas concentrações 200, 400 e 800  $\mu\text{M}$  no período de tempo 24 e 36 horas chegando a 100 % para a linhagem U937 na concentração 800  $\mu\text{M}$  em 36 horas. O percentual de apoptose também é estatisticamente significativo para a linhagem de célula tumoral THP-1, apesar de menos sensível ao composto, nas mesmas concentrações e períodos de tempo.

Observando as figuras 29 e 30 percebe-se que o composto morina inicia o processo de morte celular por apoptose em todas as linhagens de células testadas, nas primeiras 12 horas, nas concentrações 400 e 800  $\mu\text{M}$ .

Apoptose é um mecanismo de morte celular que protege contra o câncer por remover células geneticamente danificadas (PORTT *et al.*, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2011). Sendo assim, resistência a apoptose é uma marca do câncer (ARAÚJO *et al.*, 2011). As duas principais vias da apoptose são (a) extrínsecas, mediada por receptores de morte CD95/Fas/Apo1, receptor de tumor de necrose tumoral (TNF) 1 e 2, e receptor de morte 3 a 6 e (b) intrínsecas, mediada pela mitocôndria (YOUNG *et al.*, 2005; FULDA *et al.*, 2006; REUTER *et al.*, 2008). Na mitocôndria, a propagação de sinais apoptóticos é regulada por proteínas tais como membros da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x e Bcl-w, que exercem efeito antiapoptótico, e Bid, Bad, Bak e Bim, que exercem efeitos apoptóticos) (YANEZ *et al.*, 2004, REUTER *et al.*, 2008; ARAUJO *et al.*, 2011). Estudos recentes comprovaram que morina induziu o bloqueio do ciclo celular na fase G<sub>2</sub>/M e promoveu apoptose pela via intrínseca em células leucêmicas HL-60, (KUO *et al.*, 2007).

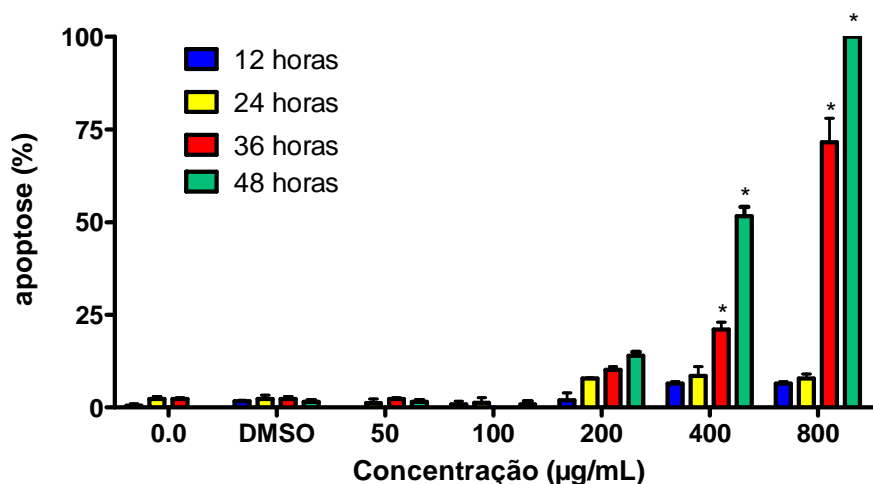
Estudos *in vitro* concluíram que o extrato de oliveira tem um efeito anti-genotóxico sobre o DNA, efeito inibitório na invasão e metástase e aumenta a barreira de proteção celular. Outros estudos com a linhagem de câncer de colo HT29 demonstraram que o extrato do fruto da oliveira inibiu a proliferação sem citotoxicidade e induziu a apoptose pela via intrínseca mitocondrial (AMBER *et al.*, 2011).



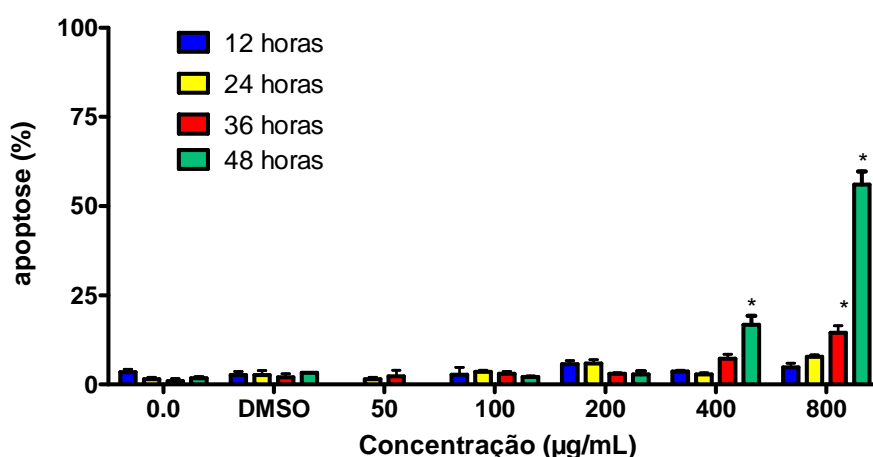
**Figura 30.** Porcentagem de apoptose induzida pelo composto morina nas linhagens neoplásicas B16F10, S-KMEL-5, H460. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 0,2%. \* $P < 0.05$ , valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

Já na figura 30, observa-se que a porcentagem de apoptose induzida pelo composto morina em três linhagens de células tumorais humanas (B16F10, SK-MEL-5 e H460) foi capaz de induzir a apoptose nas concentrações 200, 400 e 800  $\mu\text{M}$  no período de tempo 24 e 36 horas chegando a 100 % para as três linhagens de células tumorais no período de tempo de 36 horas. A linhagem de célula tumoral SK-MEL-5 mostrou ser a mais sensível ao composto, nas mesmas concentrações e períodos de tempo.

#### EXTRATO DE OLIVEIRA (U937)



#### EXTRATO DE OLIVEIRA (THP1)



**Figura 31.** Porcentagem de apoptose induzida pelo composto extrato de oliveira nas linhagens neoplásicas U937, THP-1. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 1%. \* $P < 0.05$ , valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

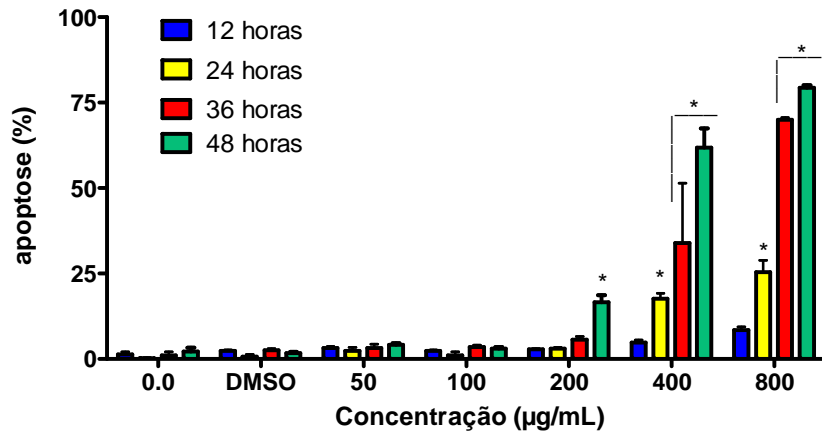
Observando as figuras 30 e 31 percebe-se que o extrato de oliveira inicia o processo de morte celular por apoptose em todas as linhagens de células testadas, nas primeiras 24 horas, sendo expressivamente significativos entre 36 e 48 horas, nas concentrações 400 e 800 µg/ml.

A figura 31 mostra a porcentagem de apoptose induzida pelo extrato de oliveira em duas linhagens de células tumorais humanas (U937 e THP-1). Observa-se através dos gráficos que o composto foi capaz de induzir a apoptose nas linhagens de célula U937 nas concentrações 400 e 800 µg/ml no período de tempo 36 e 48 horas chegando a 100 % para a linhagem U937 em 48 horas. O percentual de apoptose também é significativo para a linhagem de célula tumoral THP-1, apesar de menos sensível ao composto, nas mesmas concentrações e períodos de tempo.

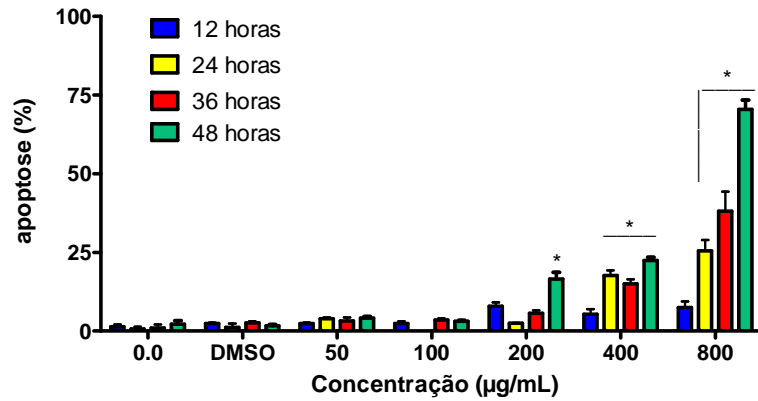
Estudos com extrato da folha de oliveira demonstraram que os efeitos citotóxicos de alguns fenóis, tais como oleuropeína e luteolina, ocorrem via indução de apoptose através de vários fatores, tais como FasL (receptor de Fas), TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) e TRAIL (receptor de TNF indutor de apoptose). Oleuropeína e luteolina não causam mutação celular, não são genotóxicos e reduzem o dano oxidativo do DNA causado pelo peróxido de hidrogênio. Vários mecanismos bioquímicos poderiam explicar este efeito, tais como o bloqueio da ativação de carcinógenos através do aumento da síntese de enzimas envolvidas na desintoxicação, estimulação da etapa de reparo do DNA e intercepção dos carcinógenos antes de sua reação com o DNA (HAMDI & CASTELLON, 2005; AMBER *et al.*, 2011).

O efeito antitumoral dos compostos fenólicos do extrato de oliveira tem sido estudado devido a sua capacidade de inibir a proliferação e promover a apoptose em várias linhagens de células, por diversos mecanismos. Estudos comprovam que os compostos fenólicos de óleo de oliva inibem a proliferação celular, bloqueiam a fase G1 do ciclo celular, com o proporcional aumento das fases G0/G1 e a concomitante diminuição na fase S e G2/M em células leucêmicas do tipo HL-60 (CASABURI *et al.*, 2013).

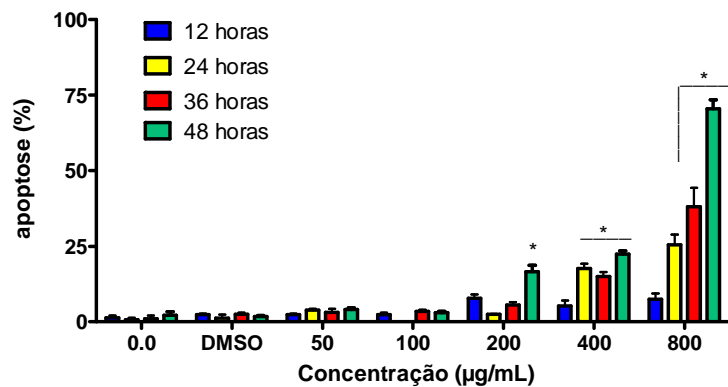
### EXTRATO DE OLIVEIRA (B16F10)



### EXTRATO DE OLIVEIRA (SK-MEL-5)

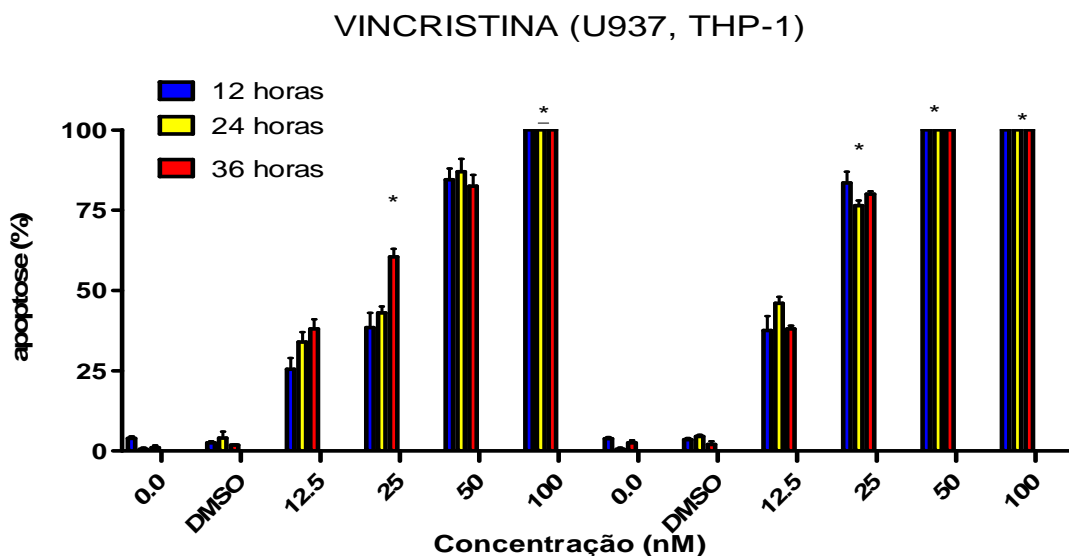


### EXTRATO DE OLIVEIRA (H460)

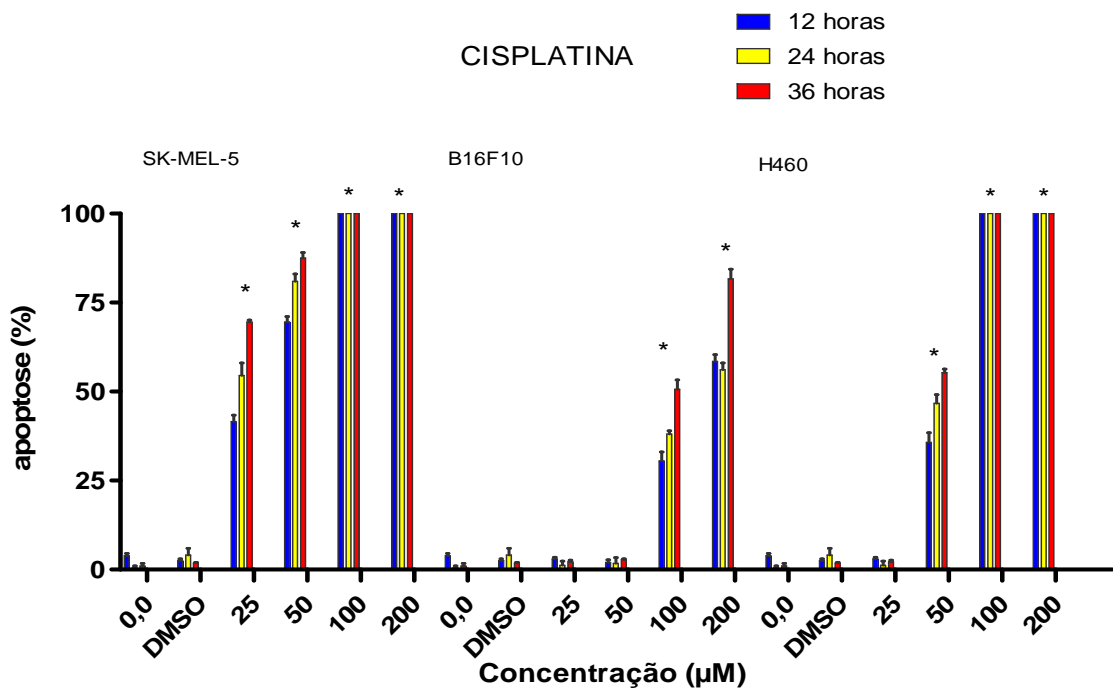


**Figura 32.** Porcentagem de apoptose induzida pelo composto extrato de oliveira nas linhagens neoplásicas B16F10, SK-MEL-5, H460 determinada por microscopia de fluorescência em quatro tempos diferentes, 12, 24, 36 e 48. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 1%. \*P<0.05, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

Já na figura 32, observa-se que a porcentagem de apoptose induzida pelo extrato de oliveira, entre as três linhagens de células tumorais humanas (B16F10, SK-MEL-5 e H460), foi capaz de induzir a apoptose nas concentrações 400 e 800 µg/ml no período de tempo 36 e 48 horas chegando a 100 % para as três linhagens de células tumorais na concentração 800 µg/ml, em 48 horas. A linhagem de célula tumoral SK-MEL-5 mostrou ser a mais sensível ao composto, nas mesmas concentrações e períodos de tempo.



**Figura 33.** Porcentagem de apoptose induzida pelo composto vincristina (controle positivo) nas linhagens neoplásicas U937, THP-1 determinada por microscopia de fluorescência em três tempos diferentes, 12, 24, 36. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 0,2%. \* $P < 0.05$ , valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).



**Figura 34.** Porcentagem de apoptose induzida pelo composto cisplatina (controle positivo) nas linhagens neoplásicas U937, THP-1 determinada por microscopia de fluorescência em três tempos diferentes, 12, 24, 36. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 0,2%. \* $P < 0.05$ , valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

#### 5.4 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM)

Os gráficos *Dot-plots* representam os parâmetros de intensidade de fluorescência verde (FL1) e vermelha (FL2). A porcentagem de células com dissipação do potencial mitocondrial de membrana foi determinada a partir da redução da intensidade de fluorescência vermelha das amostras. Os resultados referentes à análise do PMM estão apresentados nas 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 e 44 para linhagem U937, THP-1, S-KMEL-5, B16F10, H460. Para melhor visualizar os resultados obtidos, os gráficos *Dot-plots* foram divididos em quatro quadrantes (A, B, C, D). Pode-se observar, nos grupos controle para todas as linhagens avaliadas, que a população celular se concentra predominantemente no quadrante "C" que corresponde a região do gráfico *Dot-plot* onde se encontram as células mitocôndrias viáveis (FL2).

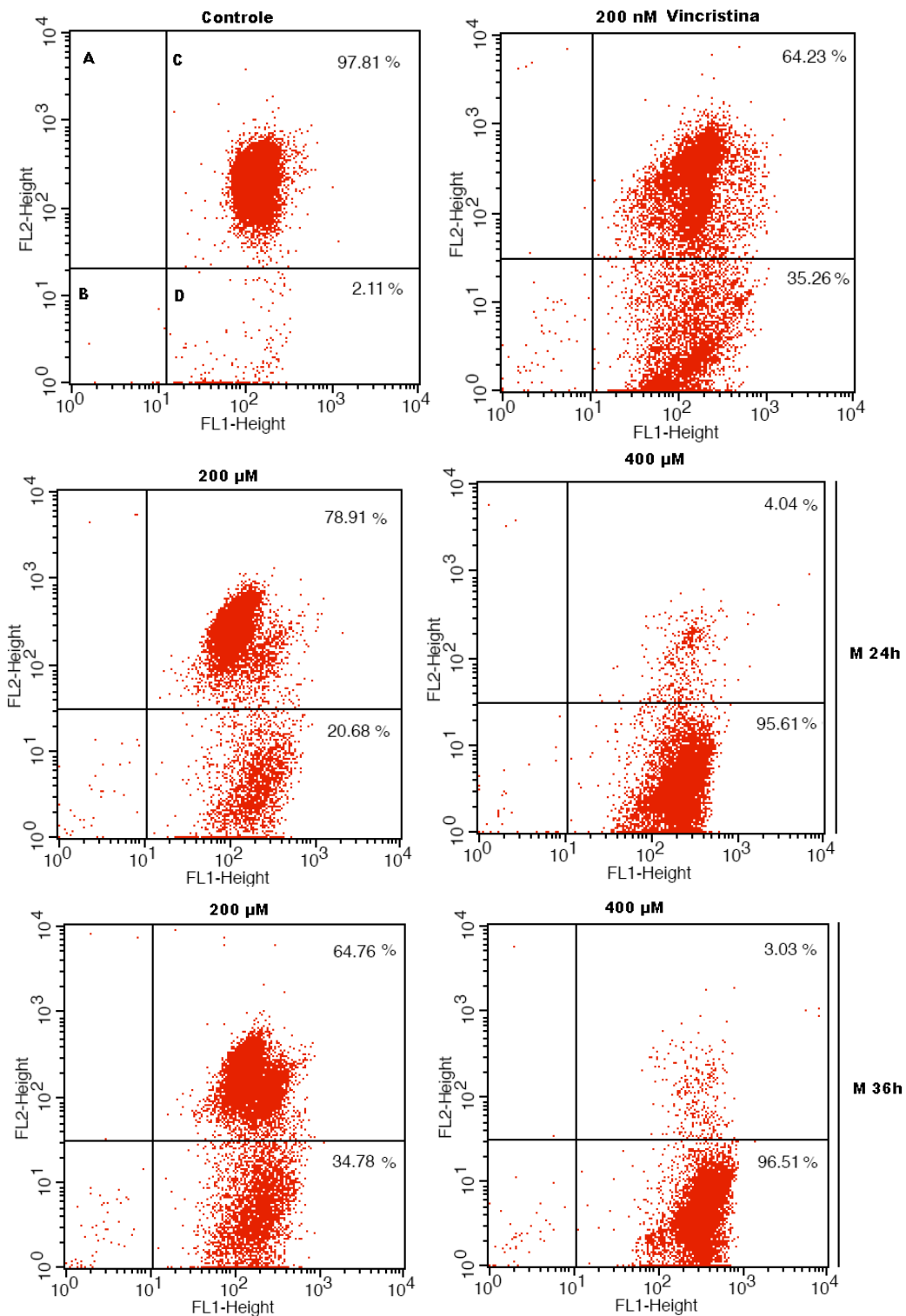
Para todas as células das linhagens submetidas ao tratamento com o composto orgânico morina e o extrato de oliveira e os compostos vincristina e

cisplatina (controles positivos) foi verificado um deslocamento da população celular do quadrante “C” para o quadrante “D”, onde se observa células com dissipação do potencial mitocondrial de membrana (FL1) nas concentrações 200 e 400  $\mu\text{M}$  nos intervalos de tempo 24 e 36 horas. O composto morina foi capaz de reduzir o potencial de membrana mitocondrial em mais de 90 % para a linhagem U937, e acima de 60 % para as linhagens THP-1, B16F10 e S-KMEL-5 na concentração 400  $\mu\text{M}$  em 36 horas (Figura 35, 36, 37, 38, 39).

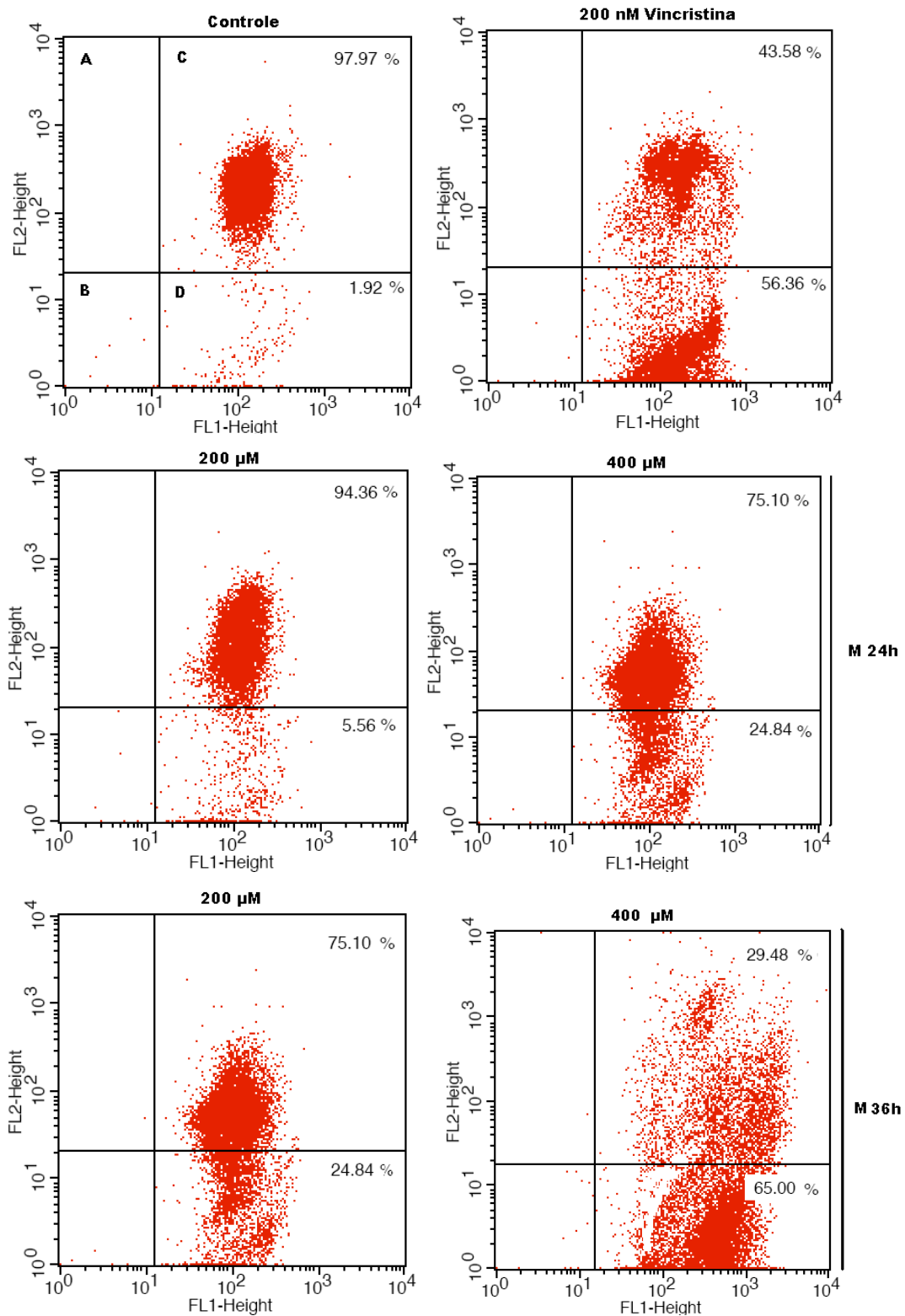
O mesmo resultado pode ser observado para o extrato de oliveira nas concentrações de 400 e 800  $\mu\text{g/ml}$  nos intervalos de tempo 36 e 48 horas. O Extrato de oliveira foi capaz de reduzir o potencial de membrana mitocondrial em mais de 80 % para a linhagem U937 e B16F10, e acima de 40 % para as linhagens THP-1, SK-MEL-5, H460 na concentração 800  $\mu\text{M}$  em 48 horas (Figura 40, 41, 42, 43, 44).

Estes resultados indicam que a apoptose pode estar sendo deflagrada pela via mitocondrial, uma vez que os dois compostos testados demonstraram comprometer o PMM para ambas as linhagens estudadas. Os resultados do teste de viabilidade celular, que avalia a capacidade da mitocôndria em reduzir o MTT, corroboram com os resultados obtidos para avaliação da integridade mitocondrial a partir do JC-1, uma vez que confirmou alterações no potencial de membrana que comprometem a funcionalidade da mitocôndria.

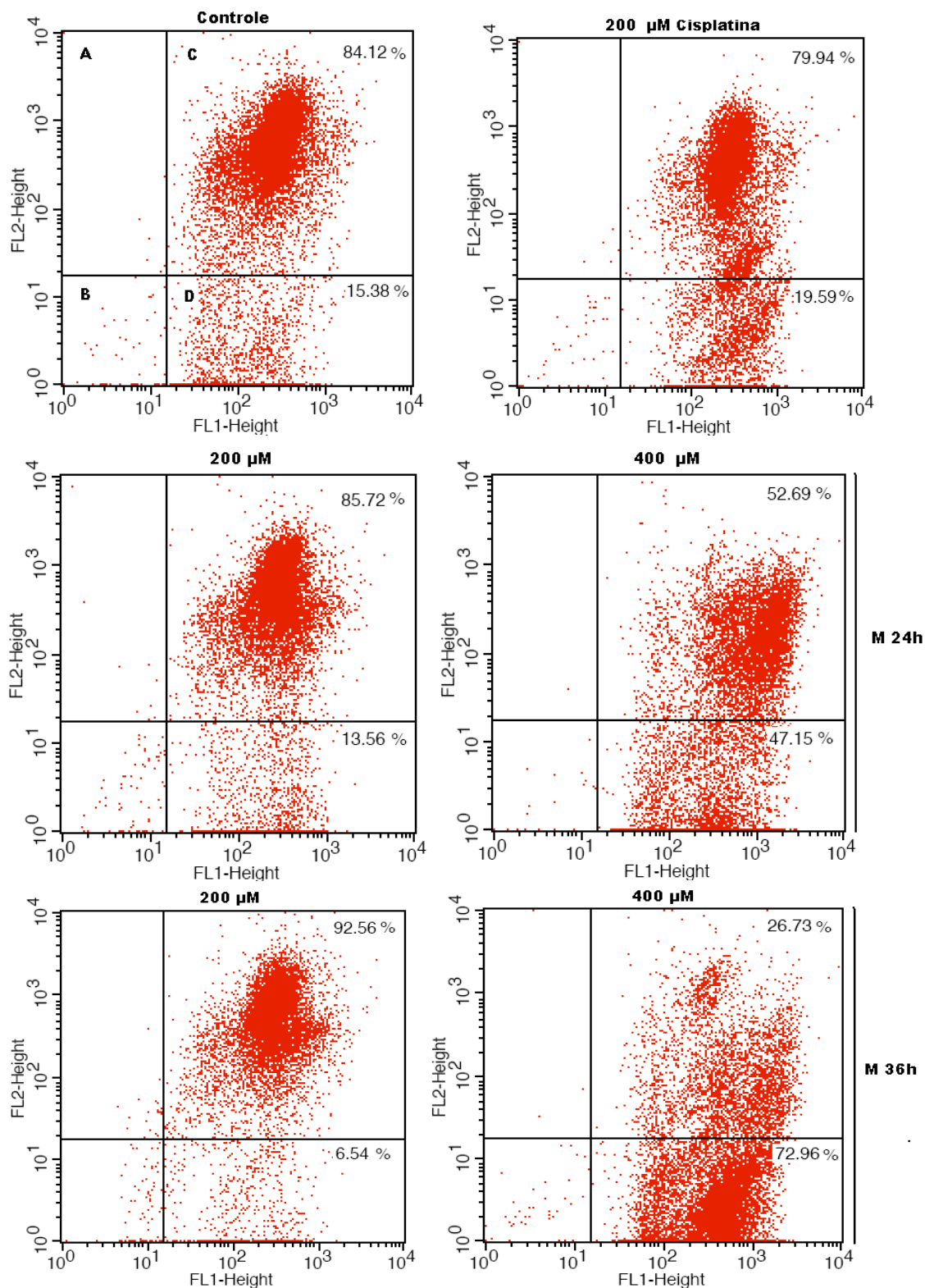
A mitocôndria é uma organela celular responsável pela produção aeróbica de ATP que ocorre a partir de cadeia respiratória onde o citocromo C atua como aceptor de elétrons. O gradiente eletroquímico de membrana mitocondrial pode ser afetado pela formação de poros na membrana externa por meio de dímeros formados pelas proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bad e Bid), o que acarreta em extravasamento do citocromo C para o citosol, que por sua vez, pode deflagrar o processo de apoptose (SMILEY *et al.*, 1991). A alteração do potencial de membrana é um passo importante na indução da apoptose pela via mitocondrial. Os compostos morina e extrato de oliveira contra as linhagens de células carcinogênicas estudadas comprometem o potencial da membrana mitocondrial.



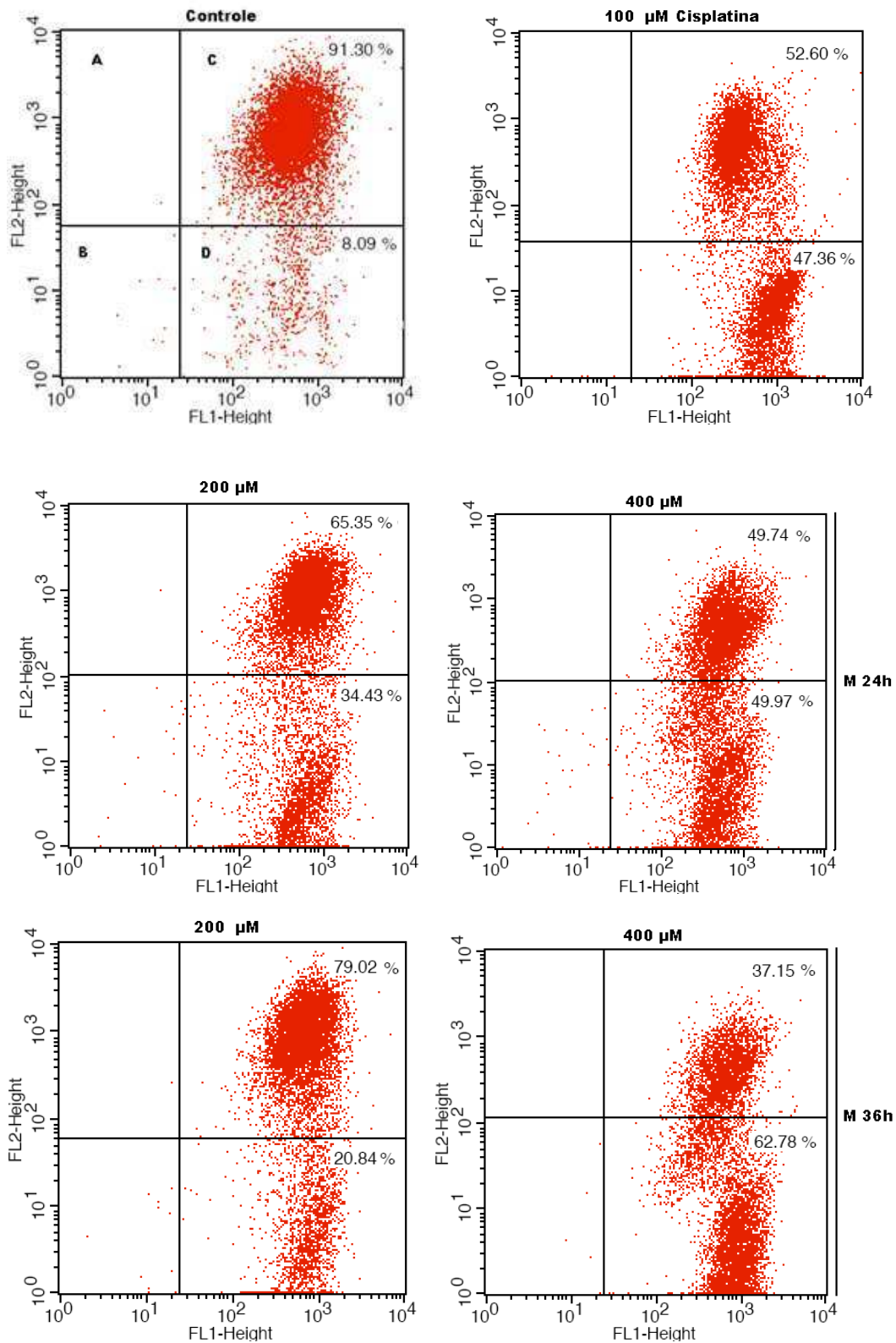
**Figura 35.** Dot-plots da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células U937 submetidas a incubação de 24 e 36 horas com o composto morina (M). Quadrante C, células possuindo mitocôndrias com potencial de membrana normal, quadrante D, células possuindo mitocôndrias com perda do potencial de membrana.



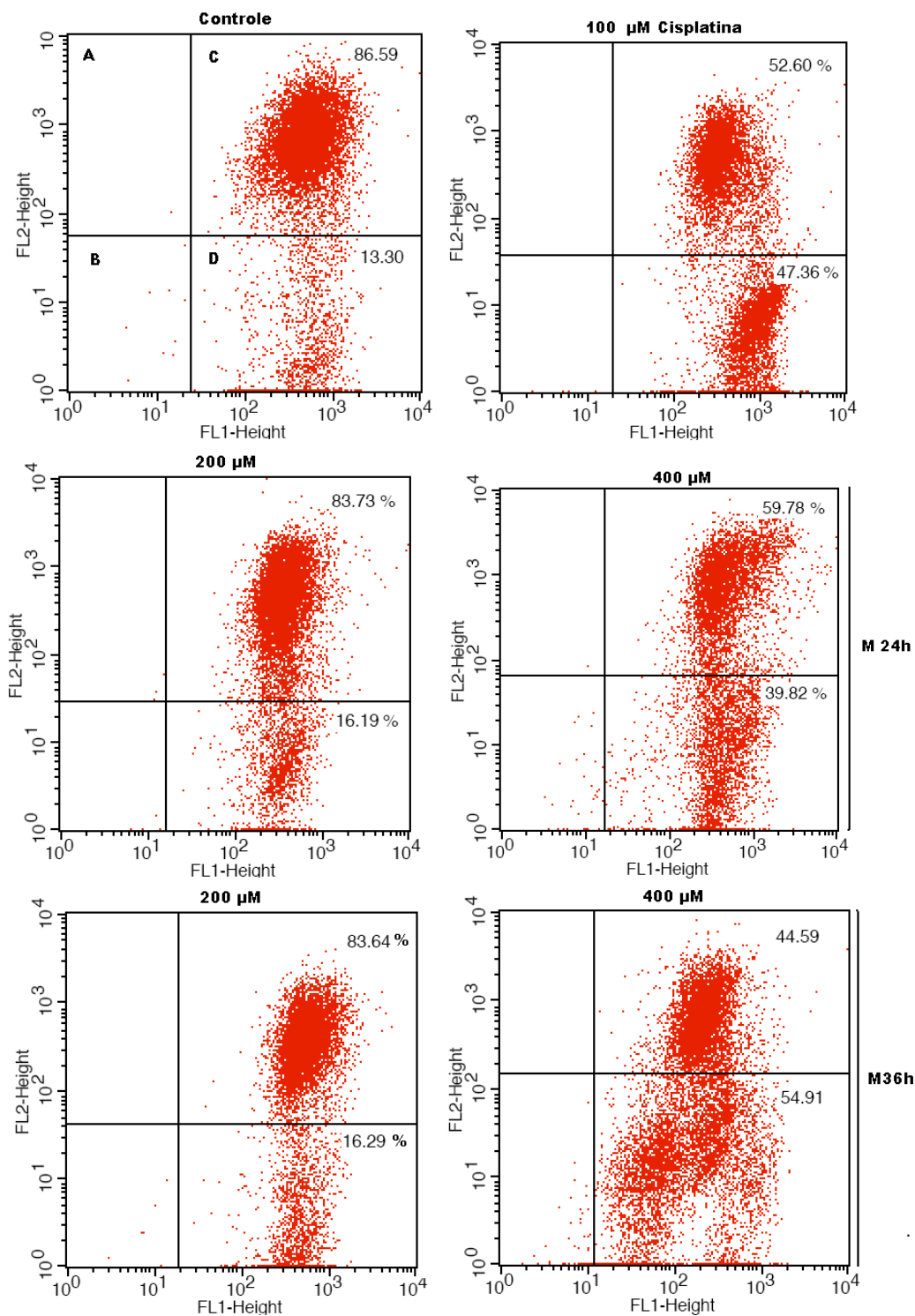
**Figura 36.** Dot-plots da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células THP-1 submetidas a incubação de 24 e 36 horas com o composto morina (M). Quadrante C, células possuindo mitocôndrias com potencial de membrana normal, quadrante D, células possuindo mitocôndrias com perda do potencial de membrana.



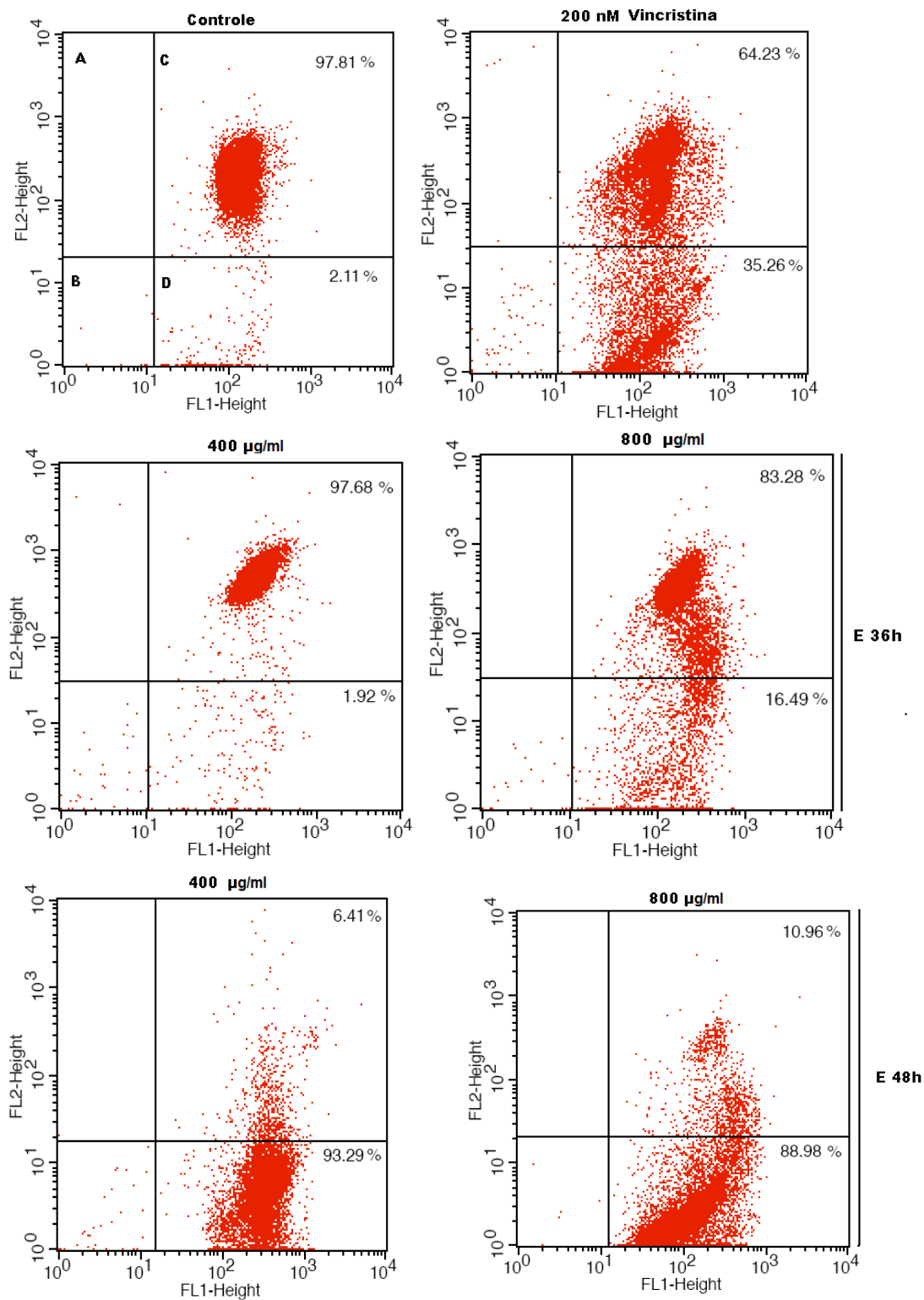
**Figura 37.** Dot-plots da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células B16F10 submetidas a incubação de 24 e 36 horas com o composto extrato de morina (M). Quadrante C, células possuindo mitocôndrias com potencial de membrana normal, quadrante D, células possuindo mitocôndrias com perda do potencial de membrana.



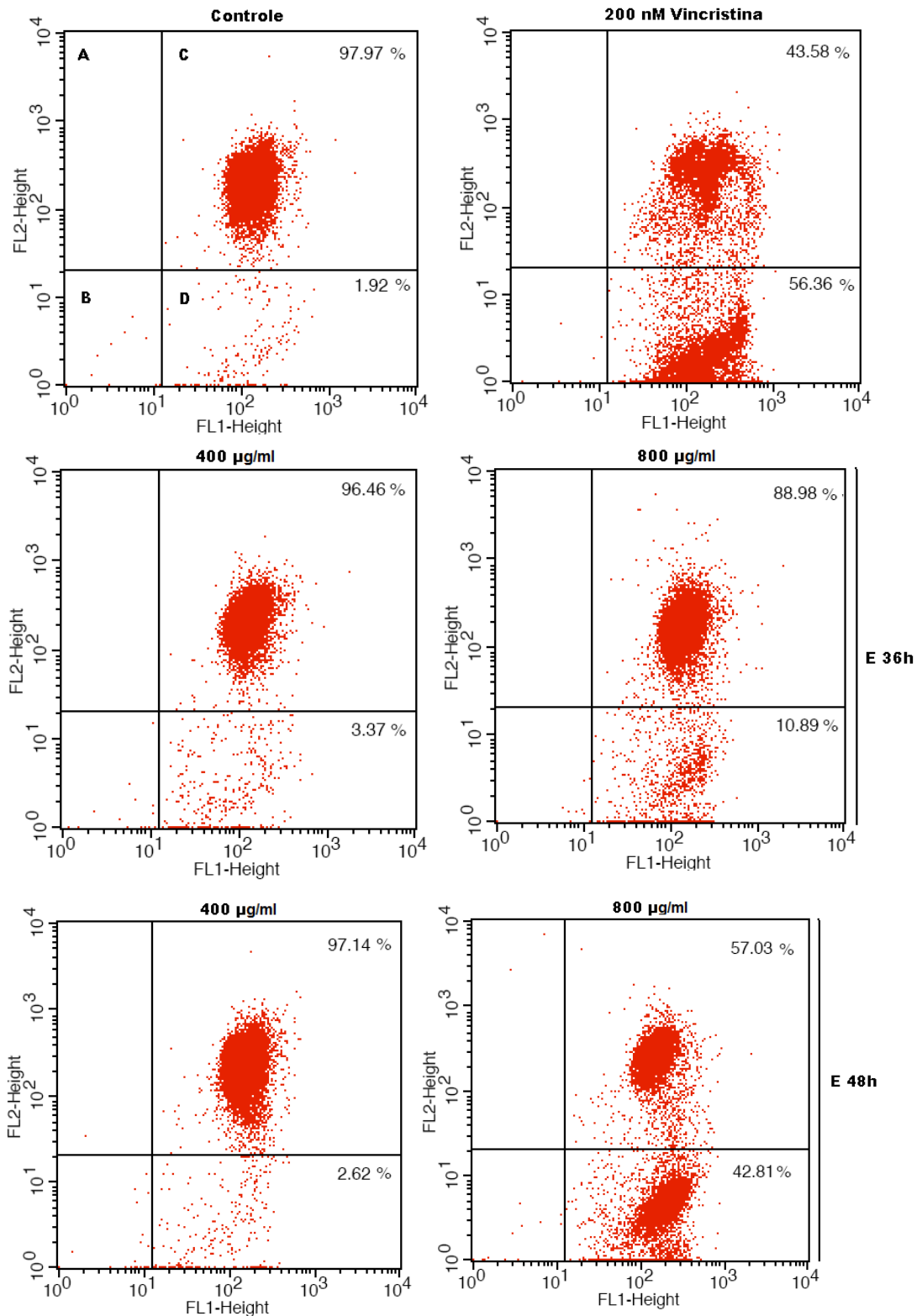
**Figura 38.** *Dot-plots* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células S-KMEL-5 submetidas a incubação de 24 e 36 horas com o composto morina (M). Quadrante C, células possuindo mitocôndrias com potencial de membrana normal, quadrante D, células possuindo mitocôndrias com perda do potencial de membrana



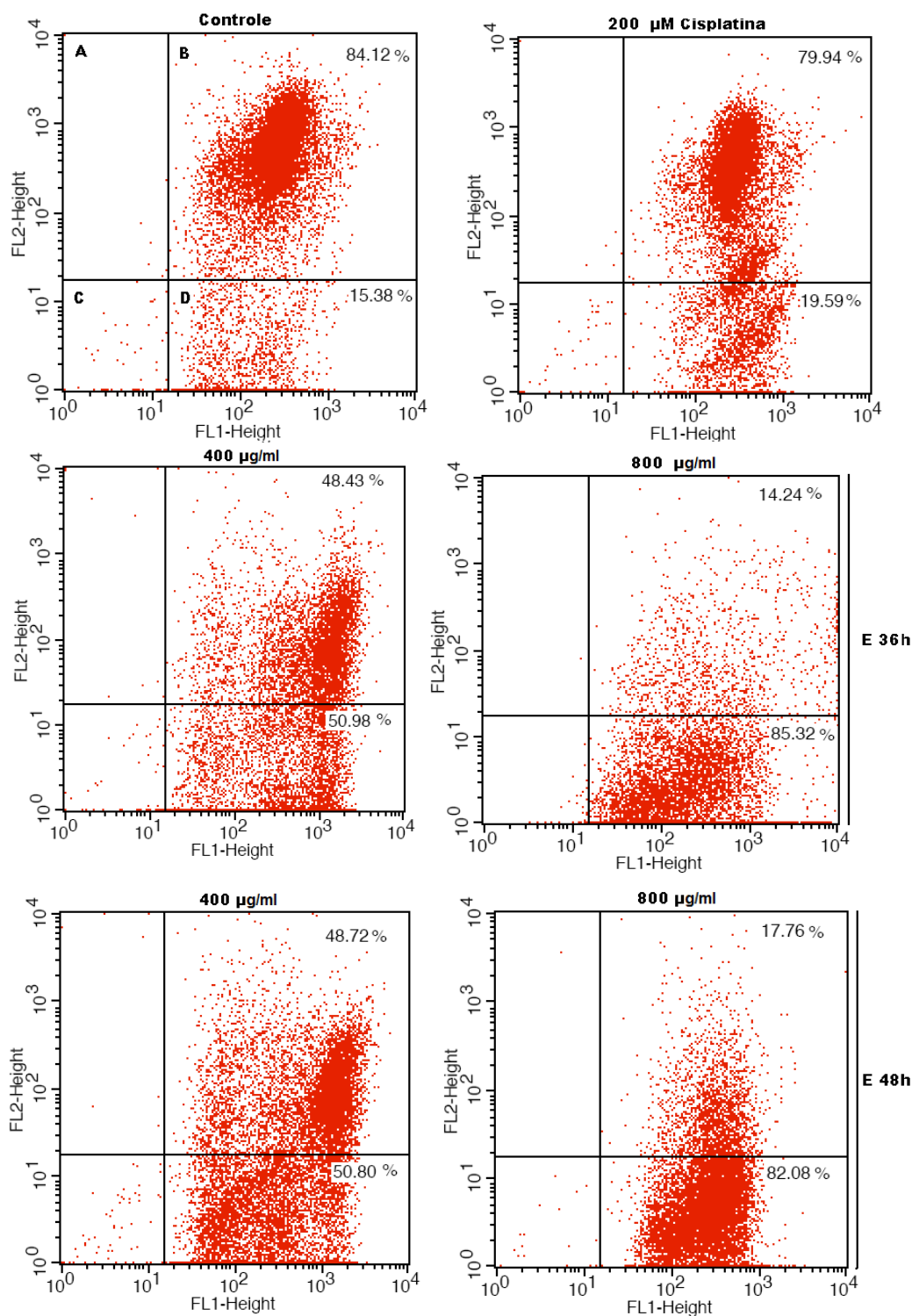
**Figura 39.** Dot-plots da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células H460 submetidas a incubação de 24 e 36 horas com o composto extrato de morina (M). Quadrante C, células possuindo mitocôndrias com potencial de membrana normal, quadrante D, células possuindo mitocôndrias com perda do potencial de membrana.



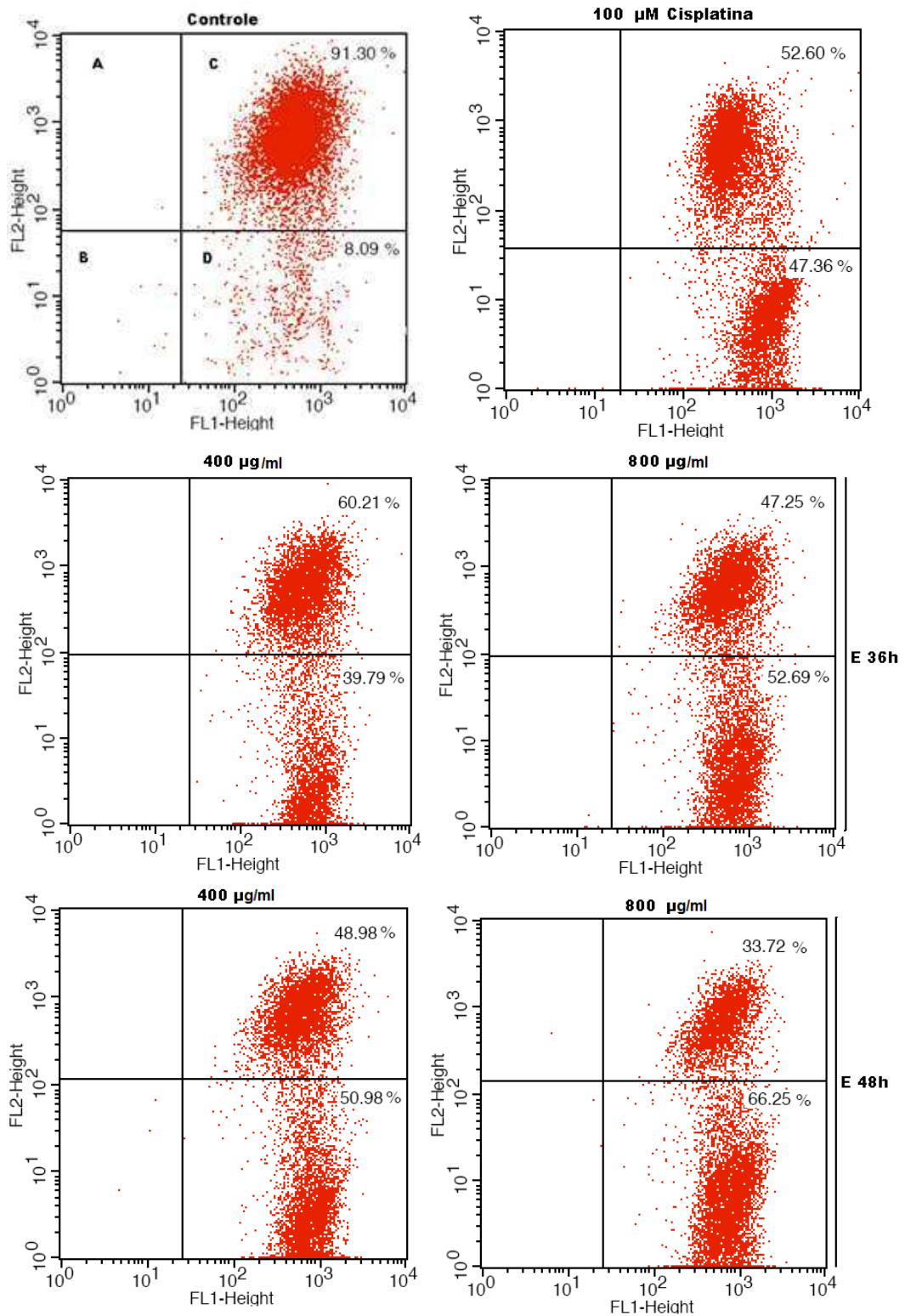
**Figura 40.** *Dot-plots* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células U937 submetidas a incubação de 36 e 48 horas com o composto extrato de folha de oliveira (E). Quadrante C, células possuindo mitocôndrias com potencial de membrana normal, quadrante D, células possuindo mitocôndrias com perda do potencial de membrana.



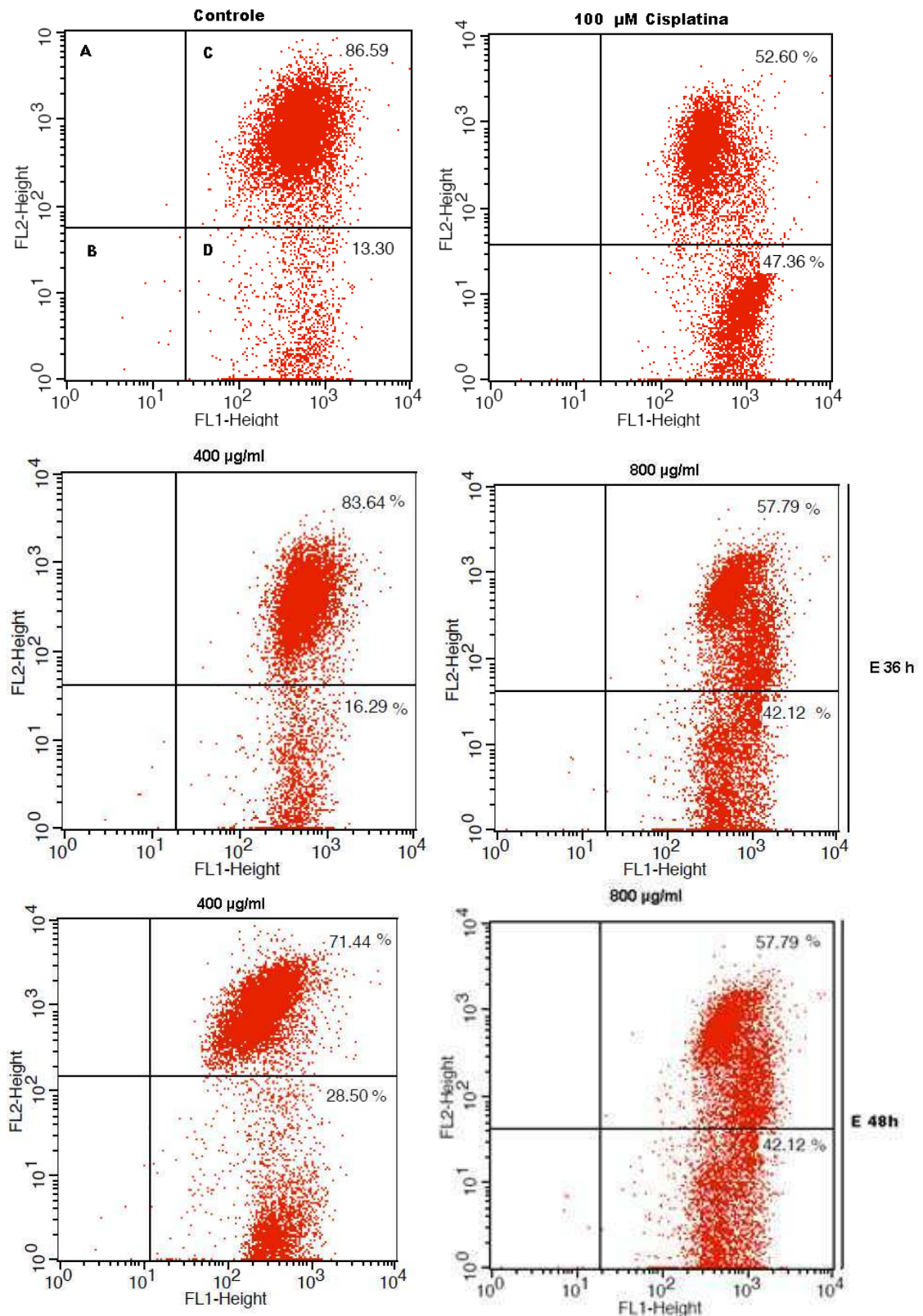
**Figura 41.** *Dot-plots* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células THP-1 submetidas a incubação de 36 e 48 horas com o composto extrato de folha de oliveira (E). Quadrante C, células possuindo mitocôndrias com potencial de membrana normal, quadrante D, células possuindo mitocôndrias com perda do potencial de membrana.



**Figura 42.** *Dot-plots* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células B16F10 submetidas à incubação de 36 e 48 horas com o composto extrato de extrato de folhas de oliveira (E). Quadrante C, células possuindo mitocôndrias com potencial de membrana normal, quadrante D, células possuindo mitocôndrias com perda do potencial de membrana.



**Figura 43.** *Dot-plots* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células SK-MEL-5 submetidas a incubação de 36 e 48 horas com o composto extrato de extrato de folhas de oliveira (E). Quadrante C, células possuindo mitocôndrias com potencial de membrana normal, quadrante D, células possuindo mitocôndrias com perda do potencial de membrana.



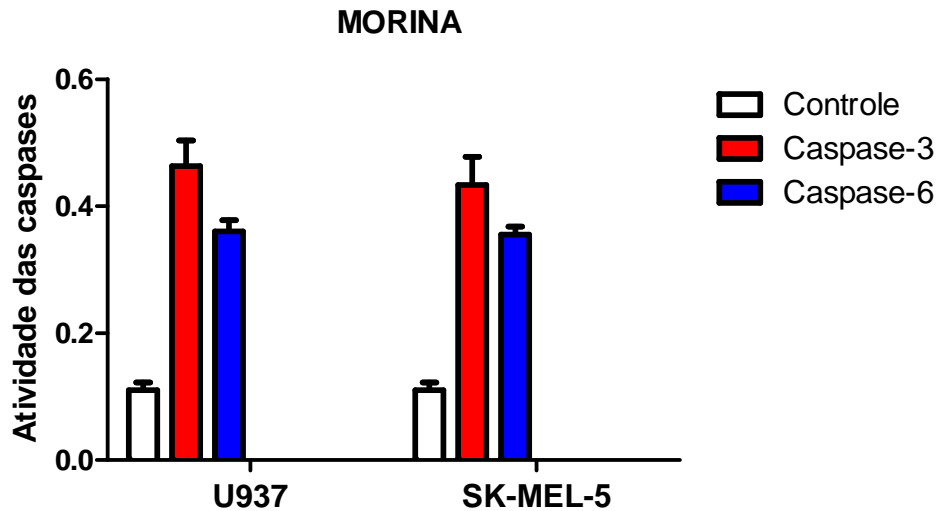
**Figura 44.** *Dot-plots* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células H460 submetidas a incubação de 36 e 48 horas com o composto extrato de extrato de folhas de oliveira (E). Quadrante C, células possuindo mitocôndrias com potencial de membrana normal, quadrante D, células possuindo mitocôndrias com perda do potencial de membrana.

Através da alteração do potencial de membrana foi possível observar indução de apoptose pela via mitocondrial. A avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi realizada utilizando o marcador catiônico lipofílico fluorescente JC-1. Os resultados demonstraram que o flavonoide morina e o extrato de oliveira comprometeram a funcionalidade da mitocôndria de todas as linhagens testadas após 48 horas de tratamento quando comparado com linhagens sem o tratamento. O composto morina e extrato de oliveira induziu apoptose através do comprometimento mitocondrial em mais de 40 % nas concentrações 400  $\mu$ M e 800  $\mu$ g/mL.

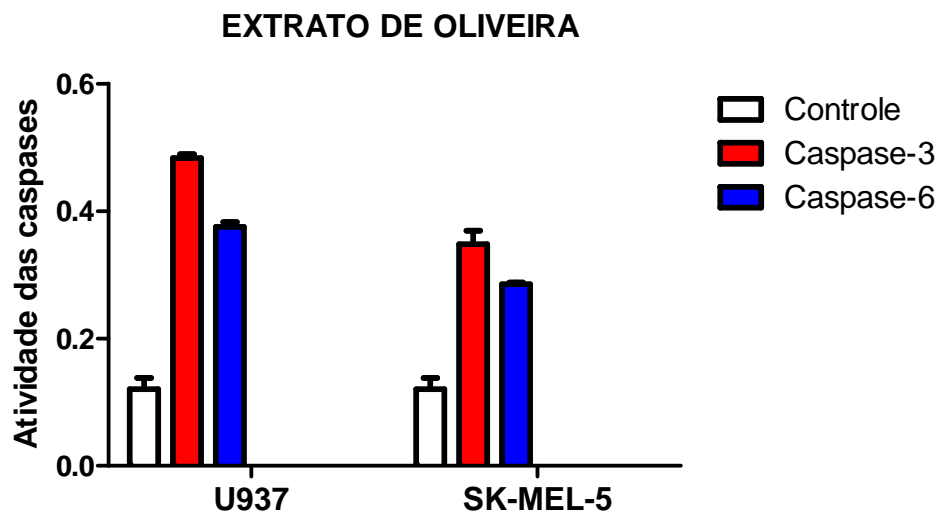
Uma explicação para o efeito redutor do potencial de membrana mitocondrial da morina é sua atividade antioxidante. Em processo respiratório aeróbico o oxigênio atua como acceptor final de elétrons, mas durante processos oxidativos biológicos ou em circunstâncias patológicas podem ser transformados em espécies reativas do oxigênio (EROs) (MACHADO *et al.*, 2008, FERREIRA, 2010). A síntese excessiva de EROs altera a expressão e ativação de enzimas antioxidantes, o potencial de membrana mitocondrial levando a morte celular por apoptose, dano ao DNA, e instabilidade genômica, os quais levam a tumorigênese (KUA *et al.*, 2007). Estudos realizados por KAPOOR & KAKKAR (2012) demonstraram que o flavonoide morina foi capaz de restaurar a expressão e a atividade de enzimas antioxidantes, tais como, catalase, GXP e da GSH (SINGH *et al.*, 2012 TANEDA *et al.*, 2102). Os grupos hidroxila, presentes na estrutura do flavonoide morina, desempenharam um importante papel na formação de EROS e ajuda na manutenção da integridade mitocondrial prevenindo a alteração do potencial de membrana mitocondrial (ZHANG *et al.*, 2011).

### **5.5 Avaliação da atividade de caspases-3 e -6**

A caspase-3 representa uma das proteases chaves para desencadeamento da apoptose. De acordo com as figuras 45 e 46, pode-se observar que o composto morina e o extrato de oliveira foram capazes de ativar, significativamente, as caspases-3 e -6 para a linhagem de célula U937 e SK-MEL-5 o que comprova sua capacidade de promover morte celular por apoptose.



**Figura 45.** Atividade das caspases-3 e -6 induzida pelo composto morina na linhagem celular humana U937 após 48 horas de incubação. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 0,2 %. \*P<0.05, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).



**Figura 46.** Atividade das caspases-3 e -6 induzidas pelo extrato de oliveira contra a linhagem de célula humana U937 e SK-MEL-5, após 48 horas de incubação. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 0,2%. \*P<0.05, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

Os resultados obtidos com a análise das caspases-3 e -6 confirmam um aumento da atividade da caspases-3 e -6 para o composto morina e para o extrato de oliveira, após 48 horas de tratamento. Estes resultados

corroboraram com os resultados obtidos por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo, evidenciando o efeito citotóxico através da indução de morte celular por apoptose de maneira concentração dependente após 48 horas de tratamento para a linhagem celular U937.

É bem conhecido que as caspases desempenharam um papel crítico na iniciação de apoptose (KUO *et al.*, 2007; CHEN & DEBNATH, 2009). De acordo com as especificidades, as caspases podem ser agrupados em "iniciadores" apoptóticos, tais como a caspase-8, e "efetores de apoptose", tais como a caspase-3 (LIU *et al.*, 2011). Pesquisas demonstraram que a apoptose induzida por morina promoveu a ativação de caspase-3 e -9, Bax, expressão e liberação de citocromo C de mitocôndria e a diminuição da expressão de Bcl-2 em células HL-60. Pesquisas demonstram que a apoptose induzida por morina pode envolver uma via mitocôndria-dependente e mecanismo mediada por caspase-3 (KUO *et al.*, 2007).

Estudos têm comprovado que compostos presentes no extrato de oliveira, tais como hidroxitirosol e oleuropeína são capazes de ativar o mecanismo de morte celular programada por apoptose em vários tipos de cânceres (BURATTINI *et al.*, 2013).

Nossos resultados mostraram que o flavonoide morina reduz viabilidade celular, induz apoptose, diminui o potencial de membrana mitocondrial e ativa caspase-3 e -6 para as linhagens de células testadas. Estas observações estão em concordância com estudos que demonstraram que morina foi capaz de regular a saída do citocromo C mitocondrial e aumentar a atividade das caspase-3, -8 e -9, o qual sugere que morina promoveu apoptose através das vias intrínsecas e extrínsecas (GRECO *et al.*, 2006, GUPTA *et al.*, 2013). Recente estudo desenvolvido por KUO *et al.*, (2007) apresentou resultados semelhantes onde a morina promoveu a viabilidade celular, bloqueou a produção de EROs, diminuiu o potencial de membrana mitocondrial, promoveu a ativação de caspases-3 e -9 e induziu apoptose via mitocôndria-dependente de maneira tempo e concentração dependentes.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o flavonoide morina e o extrato de folhas de oliveira apresentaram atividade citotóxica contra as linhagens de células leucêmicas humanas U937 e THP-1, células melanômicas humana SK-MEL-5 e murina B16F10 e carcinoma pulmonar humano H460, diminuindo significativamente a viabilidade celular de maneira concentração dependente. Os resultados permitiram concluir que estes compostos induziram morte celular por apoptose, sendo, o composto morina mais ativo para as células leucêmicas U937 e THP-1 de maneira tempo e concentração dependente e o extrato de oliveira mais ativo para as linhagens U937 e SK-MEL-5 também de maneira tempo e concentração dependente.

Os resultados obtidos mostram que o flavonoide morina e o extrato de oliveira são promissores na busca por novos agentes antineoplásicos, no entanto mais testes devem ser realizados a fim de elucidar as vias de indução de apoptose promovida por este composto nestas linhagens neoplásicas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptosis switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, p. 1324-1337, 2007.

AGGARWAL BB, SETHI G, AHN KS, SANDUR SK, PANDEY MK, KUNNUMAKKARA AB, et al. Targeting signal-transducer-and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution. **Ann N Y Academic Science**, v. 1091, p. 151–69, 2006.

ALAS S, BONAVIDA B. Inhibition of constitutive STAT3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 316–26, 2003.

ALBERCHT, H., BRODBECK-HUMMEL, D., HOEVER, M., NICKEL, B., REGENASS, U. Cellular Assays in Drug Discovery. **Molecular Biology in Medicinal Chemistry**, p. 3-39, 2004.

ALBERG, A. J.; SAMET, J. M. Epidemiology of lung cancer. **Journal clinical Oncology**, v.14, p.3175-85, 2005.

ALBRECHT, H., BRODBECK-HUMMEL, D., HOEVER, M., NICKEL, B., REGENASS, U. Cellular Assays in Drug Discovery. **Molecular Biology in Medicinal Chemistry**, p. 3-39, 2004.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A. REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química nova**, v. 28, n. 1, p. 118-128, 2005.

AL-NUMAIR, K. S.; CHANDRAMOHAN, G.; VEERAMANI, C.; ALSAIF, M. A. Morin, a flavonoid, prevents lysosomal damage in experimental myocardial ischemic rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6 , n.18, p.3445-3449, 2012.

ALVARENGA, A. A.; CHALFUN, N.N.J.; GONÇALVES, E. da S. Enraizamento de estados semilenhosas de oliveira em câmara úmida com aquecimento de substato. **Informe Agropecuário**. Azeitona e azeite de oliva: tecnologias de produção, Belo Horizonte. v.27, n.231 p.40-46, 2006.

AMADO, N. G.; FONSECA, B. F.; CERQUEIRA, D. M.; NETO, V. M. ABREU, J. G. Flavonoids: potencial Wnt/beta-catenin signaling modulators in câncer. **Life Sciences**, v.89, n.15-16, p.545-54, 2011.

AMBER, J.; BERDMAR, Z. F.; PULIDO, M. V.; PEYRAS, S. D.; MILLAN, M. M.; MORANGA, A. A.; SERRANO, A. M.; CASTRO, M. D. L. A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptotic-inducing properties of olive-leaf extracts. **Mutation Research**, v.723, p.165-70, 2011.

AMBER, J.; BERDMAR, Z. F.; PULIDO, M. V.; PEYRAS, S. D.; MILLAN, M. M.; MORANGA, A. A.; SERRANO, A. M.; CASTRO, M. D. L. A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptotic-inducing properties of olive-leaf extracts. **Mutation Research**, v.723, p.165-70, 2011.

AMBER, J.; BERDMAR, Z. F.; PULIDO, M. V.; PEYRAS, S. D.; MILLAN, M. M.; MORANGA, A. A.; SERRANO, A. M.; CASTRO, M. D. L. A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptotic-inducing properties of olive-leaf extracts. **Mutation Research**, v.723, p.165-70, 2011.

ANDREW, T. Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. **Apoptosis**, v. 13, p. 1-9, 2008.

ANTROUTSOPOULOS, V. P.; PPAKIRIAKOU, A.; VOURLIOMIS, D.; TSATSAKIS, A. M.; SPANDIDOS, D. A. Dietary flavonoids in câncer therapy and prevention: substrats and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. **Pharmacology & Therapeutics**, v.126, p.9-20, 2010.

ARANTES-RODRIGUES R, HENRIQUES A, PIRES MJ, COLAÇO B, CALADO AM, REMA P, COLAÇO A, FERNANDES T, DE LA CRUZ PL, LOPES C, FIDALGO-GONÇALVES L, VILELA S, PEDROSA T, PEIXOTO F, OLIVEIRA PA. High doses of olive leaf extract induce liver changes in mice. **Food Chemistry Toxicology**. v. 49, n. 9, p. 1989-97, 2011.

ARAÚJO JR, GONÇALVES P, MARTEL F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. **Nutrition Research**, v.31, n.2, p.77-87, 2011.

ARLO J. MILLER, M.D., PH. D., AND MARTIN C. MIHM, JR., M.D. Mechanisms of disease:Melanoma. **Review: The New England Journal of Medicine**, v.355, p.51-65, 2006.

ATTOUB, B.; HASSAN, A. H.; VANHOECKE, B.; IRATNI, R.; TAKAHASHI, T., GABEN, A., BRACKE, M.; AWAD, S.; JOHN, A.; KAMALBOOR, A. H.; SULTAN, M. A. A.; ARAFAT, K.; GESPACH, C.; PETROIANU, G. Inhibition of cell survival, invasion, tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin in human epithelioid cancer cells. **European journal of pharmacology**, v. 651, p.18-25, 2011.

AVEDANO, C.; MENENDEZ, J. C.; **Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs**. 1. Ed. Boston: Elsevier, 2008. 442p.

AVILA, A. ; GROENEWALD, J. Z.; TRAPERO, A.; CROUS, P. W. Characterisation and epitypification of *Pseudocercospora cladosporioides*, the causal organism of Cercospora leaf of olives. **Mycological Research**, v.109, p.881-888, 2005.

BANDARCHI, B., MA, L., NAVAB, R., SETH, A., RASTY, G. From Melanocyte to Metastatic Malignant Melanoma. **Dermatology Research and Practice**, v.10, p.1-8, 2010.

BLUM, D. AURELIUS, O.; BARACOS, V. E.; SOLHEIM, T. S.; TAN, B. H. L.; STNE, P.; KAASA,; FEARON, K.; STRASSER, F. Cancer cachexia: a systematic literature review of items and domains associated with involuntary weight loss in cancer. **Critical Review in Oncology/Hematology**, v.80, n.1, p. 114-44, 2011.

BOGENRIEDER T, HERLYN M. Molecular biology of cutaneous melanoma. **Cancer Biomark**. v. 9, n.1-6, p.267-86, 2010.

BRANDÃO H. N.; DAVID J. P.; COUTO R. D.; NASCIMENTO J. A. P.; DAVID J. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v.33, n.6, p.1359-1369, 2010.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Portal**, 2007. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal>>

BROOKS, S. A., LOMAX-BROWNE, H. J., CARTER, T. M., KINCH, C. E., AND HALL, D. M. Molecular interactions in cancer cell metastasis. **Acta Histochemistry**, v.112, p.3-25, 2010.

BROWN J, O'PREY J AND HARRISON PR: Enhanced sensitivity of human oral tumours to the flavonol, morin, during cancer progression: Involvement of the akt and stress kinase pathways. **Carcinogenesis**, v. 24, p.171-177, 2003.

BURATTINI, S.; SALUCCI, S.; BALDASSARRI, V.; ACCORSI, A.; PIATTI, E.; MADRONA, A.; ESPARTERO, J. L.; CANDIRACCI, M.; ZAPPIA, G.; FALCIERI E. Anti-apoptotic activity of hydroxytyrosol and hydroxytyrosyl laurate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p.248–256. 2013.

CALTAGIRONE, S.; ROSSU, C.; POGGI, A.; RANELLETI F. O.; NATALI, P. G.; BRUNETTI, M.; AIELLO, F. B.; PIANTELLI, M Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potencial. **Institute Journal of Cancer**, v.87, p.595-600, 2000.

Cancer control series - World Health Organization 2006. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241546999\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241546999_eng.pdf). Consultado em 20 de Novembro de 2012.

CARRERA-GONZ\_ALEZ M.P., RAM\_IREZ-EXP\_OSITO, M.J., M.D. MAYAS; MART\_INEZ-MARTOS J.M. Protective role of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol on cancer **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, p.92-99. 2013.

CASABURI I, PUOCI F, CHIMENTO A, SIRIANNI R., RUGGIERO C, AVENA P PEZZI V Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: A review of in vitro studies. *Molecular Nutrition Food Research*. 2013, 57, 71–83.

CHA, S. S., SHIN, Y. T., EUN, S. J., KIM, K. D., AND JEON, H., Anti-metastatic Properties of the Leaves of *Eriobotryajapônica*. **Arch. Pharmacology Research**, v.34, p.425-436, 2011.

CHEN , N.; DEBNATH, J. Autophagy and tumorigenesis. **FEBS Letters**, v.584 p.1427-1435. 2009.

CHEN H-J.; CHUNG, C.; CHIANG, W.; LIN, Y. Anti-inflammatory effects and chemical study of flavonoid-enriched fraction from adlay bran. **Food Chemistry**, v.126, p.1741-1748, 2011.

CHENG, Y.; QIU, F.; IKEJIMA, T. Molecular mechanisms of oridonin-induced apoptosis and autophagy in murine fibrosarcoma L929 cells. **Autophagy**, v.5, p.430-443, 2009.

CHENG, Y.; QIU, F.; YE, Y.C.; GUO, Z. M.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T Autophagy inhibits reactive oxygen species-mediated apoptosis via activating p38-nuclear factor-kappa B survival pathways in oridonin-treated murine fibrosarcoma L929 cells. **FEBS Journal**, v.276, p.1291-1306, 2009.

CHERRA III, S. J.; DAGDA, R. K.; CHU, C.T Review: autophagy and neurodegeneration: survival at a cost? **Neuropathology Appl. Neurobiology**, v.36, p.125-132, 2010.

CHI, H. F.; CHIH, T.T., HSIAN, Y.M Bullatacin, a potent antitumour annonaceous acetogenin, induces apoptosis through a reduction of intracellular cAMP and cGMP levels in human hepatoma 2.2.15 cells. **Biochemistry Pharmacology**, v. 65, p. 319-327, 2003.

CHOUDHARY, I. M Bioactive flavonoids from the leaves of *Lawsonia alba* (Henna). **Phytochemistry letters**, v.4, n.4, p. 454-458, 2011.

COTRAN, R.S., Kumar, V., Collins, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6.ed. Guanabara: Rio de Janeiro, 2005. 1251p.

CRIMI, M.; ESPOSTI M., D Apoptosis-induced changes in mitochondrial lipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1813, p.551-57, 2010.

CULLEN, K. J.; YANG, Z.; SHUMAKER, L. GUO, Z Mitochondria as critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in heard and neck cancer. **Journal of Bionergetics and Biomembranes**, v.39, p.43-50, 2007.

DE BERNARDINIS, R.J.; LUM, J.J.; HATZIVASSILIOU, G.; THOMPSON, C. B The biology of câncer: Metabolismo reprogramming fuels cell growth and proliferation. **Cell Metabolism**, v.7, p.11-20, 2008.

DUARTE, R. L. M. PASCHOL, M. E. M Marcadores moleculares do câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. **Journal, Brazilian Pneumology**, v.32, p.56-65, 2005.

DUPREZ, L. WIRAWAN, E.; BERGHE, V. T VANCENABEELE, Mayor cell death pathways at a glance. **Microbes and Infection**, v.11, p.1050-1062, 2009.

DUPREZ, L. WIRAWAN, E.; BERGHE, V. T VANCENABEELE, Mayor cell death pathways at a glance. **Microbes and Infection**, v.11, p.1050-1062, 2009.

EBY, A. G. Treatment of acute lymphocytic leukemia using zinc adjuvant chemotherapy and radiation – a case history and hypothesis. **Medical Hypothesis**, v.64, p.1124-1126, 2005.

EISENBERG, T.; KNAUER, H.; SCHAUER, A., BUTNER, S.; RUCKENSTUHL, C., CARMONA-GUTIERREZ, D.; RING, J.; SCHROEDER, S.; MAGNES, C.; ANTONACCI, L.; FUSSI, H.; DESZCZ, L.; *et al.*, Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. **Nature Cellular Biology**, v.11, p.1305-1314, 2009.

FERNANDES, J.; Rumjanek, V.M.; Castilho, R.O.; Kaplan, M.A.; Gattass, C.R., Alternativas contra o câncer. Ácido extraído de planta medicinal popular demonstra capacidade antitumoral. Disponível em: <[http://www.sbpoc.com.br/noticias/not\\_140504.htm](http://www.sbpoc.com.br/noticias/not_140504.htm)> Consultado em: 26 dez 2005.

FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. C. **Oncologia Molecular**. 1.ed. Rio de Janeiro: Ateneu. 2004. 470p.

FERREIRA, L. M. R Cancer metabolism: the Warburg effect today, review. **Experimental and Molecular Pathology**, v.89, n.3, p. 372-80, 2010.

FILHO, V. W.; MIRRA, A. P.; LOPEZ, R. V. M.; ANTUNES, L. F. Tabagismo e câncer no Brasil: evidence and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.13, p.175-187, 2010.

FISCHER, K. et al. Inhibitory effect of tumor cell-lactic acid on human T. **Cells Blood**. v.109, p.3812-3819, 2007.

FOLEY, C. J, LUO, C., CALLAGHAN, K., HINDS, P. W., COVIC, L., KULIOPULOS, A. Matrix metalloprotease-1a promotes tumorigenesis and metastasis. **Journal Biological Chemistry**, v.287, n.29, p.2430-8, 2012.

FOSTER, I. A cell cycle defect, **Radiography**, v.14, p.144-149, 2008.

FOYE, W. O.; SENGUPTA, S. K.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Principles of Medicinal Chemistry**, eds. Williams & Wilkins: Baltimore, 1996. 822-845p.

FRANCO, R. M.; PARRA, E. R.; TAKAGAKI, T. Y.; SOARES, F. A.; CAPELOZZI, V. L. Detecção de micrometástases em câncer de pulmão não-pequenas células estágio pNO: um método alternativo combinado imunohistoquímico e análises em microsséries. **Journal, Brazilian Pneumology**, v.34, p.129-135, 2008.

FREZZA, C.; GOTTLIEB, E. Mitochondria in cancer: Not just innocent bystanders. **Seminars in Cancer Biology**, v.19, p.4-11, 2009.

FULDA, S. Exploiting apoptosis pathways for the treatment of pediatric cancers. **Pediatric Blood Cancer**. v. 53, p. 533-536, 2009.

FULDA, S.; DEBATIN K.M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy, **Oncogene**, v. 25 p. 4798–4811. 2006.

GALLUZZI, L. I., VITALE, J. M., ABRAMS, E. S., ALNEMRI, E. H., BAEHRECKE, M. V., BLAGOSKLONNY, T. M., DAWSON, V. L., DAWSON, W. S., EL-DEIRY, S., FULDA, E., GOTTLIEB, D. R., GREEN, M. O., HENGARTNER, O., KEPP., KNIGHT, S., KUMAR, S. A LIPTON, X., LU, F., MADEO, W., MALORNI, P., MEHLEN, G., NUNEZ, M. E., PETER, M., PIACENTINI, D. C., RUBINSZTEIN, Y., SHI, H.U., SIMON, P., VANDENABEELE, E., WHITE, J., YUAN, B., ZHIVOTOVSKY, G., MELINO., KROEMER. G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Review. **Cell Death and Differentiation**, p.107–120, 2012.

GAROLFO, A.; AVESANI, C., M.; CAMARGO, K. G. *et al.* Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Revista de Nutrição**. v.17, n.4, p.491-505, 2004.

GATENBY R.A., VINCENT T.L., GILLIES R.J. Evolutionary dynamics in carcinogenesis. **Mathematical Models and Methods in Applied Sciences**. 15:1–20. 2005.

GHOSH, R. LIPSON K. L.; SARGENT, K. E.; MERCURIO, A. M.; HUNT, J. S.; RON, D., URANO, F. Transcription regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway, **Plos One**. 5. e9575. 2010.

GOLAN, D. E., ARMSTRONG, A. W., ARMSTRONG, E. J., TASHJUAN, A. H. **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 914 p.

GOLAN, D. E., ARMSTRONG, A. W., ARMSTRONG, E. J., TASHJUAN, A. H., GONCALVES JR, ARAUJO P, PINHO MJ, MARTEL F. In vitro studies on the inhibition of colon cancer by butyrate and polyphenolic compounds. **Nutrition Cancer**. v. 63, n.2, p. 282-294, 2011.

GOTTLIEB, R. A.; MENTZER, R. M.; Autophagy during cardiac stress: joys and frustrations of autophagy. **Ann Review Physiology**, v.72, p.45-59. 2010.

GOULAS, V.; EXARCHOU, V.; TROGANIS, A.N.; PSOMIADOU, E.; FOTSIS, T.; BRIASOULIS, E.; GEROTHANASSIS, I. P. Phytochemicals in olive-leaves extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cell. **Mol Nutrition Food Research**, v.53, p.600-08, 2009.

GRANADOS-PRINCIPAL, S., QUILES, J.L., RAMIREZ-TORTOSA, C.L., SANCHEZ-ROVIRA, P., RAMIREZ-TORTOSA, M.C., Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. **Nutrition Review**. v. 68, n.4, p. 191–206. 2010.

GRASSI, D.; DESIDERI, G.; FERRI, C. Flavonoids: Antioxidants against atherosclerosis. **Nutrientes**, v.2, p.889-902, 2010.

GRECO C, D'AGNANO I, VITELLI G, VONA R, MARINO M, MOTTOLESE M, et al. c-MYC deregulation is involved in melphalan resistance of multiple myeloma: role of PDGF-BB. **Intitute of Jounal Immunopathol Pharmacology**, v.19, p.67–79, 2006.

GUPTA S. C., PHROMNOI K, AGGARWAL B. B. Morin inhibits STAT3 tyrosine 705 phosphorylation in tumor cells through activation of protein tyrosine phosphatase SHP1. **Biochemical Pharmacology**, v.85, p.898–912. 2013.

GUPTA S.C., KANNAPPAN R., REUTER S., KIM J.H., AGGARWAL B.B. Chemosensitization of tumors by resveratrol. **Ann N Y Acad Sci** ;1215:150–60. 2011.

HAMDY H. K.; CASTELLON R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.334 p.769–778. 2005.

HAMEROFF, S. R. A new theory of the origin of cancer: quantum coherent entanglement, centrioles, mitoses, and differentiation. **Biosystem**, v.77, p.119-136, 2004.

HAN, J.; TALORETE, T.P.; YAMADA, P.; ISODA, H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7. **Cytotechnology**, v.59, p.45-53, 2009.

HARTWELL, D.; JONES, J.; LOVEMAN, E.; HARRIS, P.; CLEGG, A.; BIRD, A. Topotecan for relapsed small cell lung cancer: A systematic review and economic evaluation. **Cancer Treatment Review**, v.37, p.242-249, 2011.

HERST, P. M.; BERRINDGE, M.V.; Cell surface oxygen consumption: a major contributor to cellular oxygen consumption in glycolytic cancer cell lines. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1767, p.170-177, 2010.

HOFMANN, B, U., WESTPHAL, R, J., MUIJEN, P, N, G., AND RUITER, J, D. Matrix Metalloproteinases in Human Melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v.115, p. 337–344, 2000.

HOLENRIEDER, S.; STIEBER, P. Circulating apoptotic markers in the management of non-small cell lung cancer. **Cancer Biomark**, v.6, p.197-210, 2010.

HOWE, H, L., WINGO, P, A., THUN, M, J., RIES, L, A., ROSENBERG, H, M., FEIGAL, E, G., EDWARDS, B, K. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. **Journal of Nat Cancer Institute**, v.93, p.824-842., 2001.

HUANG JH, HUANG CC, FANG JY, YANG C, CHAN CM, WU NL, et al. Protective effects of myricetin against ultraviolet-B–induced damage in human keratinocytes. **Toxicology In Vitro**, v.24 p.21–28. 2010.

HUNG, J. ; HSU Y.; KO. Y.; TSAI Y. ; YANG C.; HUANG, M.; KU P. Didymin, a dietary flavonoid glycoside from citrus fruits, induces Fas-mediated apoptotic pathway in human non-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo. **Lung Cancer**. v.68, p.366-374, 2010.

INCA, Ministério da Saúde: Incidência do Câncer no Brasil. Disponível em <http://www.inca.gov.br/> Acesso em: 18 de maio de 2012.

ISIK, S.; KARAGOZ, A.; KARAMAN, S.; NERGIZ, C. Proliferative and apoptotic effects of olive extracts on cell lines and healthy human cells. **Food Chemistry**, v.134, n.1, p.29-36, 2012.

JARIWALLA, R. J. Microcompetition and the origin of cancer. **European Journal of Cancer**, v.41, p.15-19, 2005.

JASH S. K. & BRAHMACHARI G. Recent progress in the research of naturally occurring flavonoids: A look through **Journal Organic Biomolecular Chemistry**, v.1, p.65-168. 2013.

JONES, R. G. Tumor suppressors and cell metabolism: a price for cancer growth. **Genes & Development**, v.23, p.53-548, 2009.

JOPE R.S.; YUSHAITIS, C. J.; BEUREL, E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3): inflammation, disease and therapeutics. **Neurochemistry Research**, v.32, p.577-595, 2007.

- JUNIOR. C.B.G.; KLUMBE. E. C.; MAIA. C. R. P53 and hematological malignancies, **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.48, n.3, p.419-27, 2002.
- KAEIDI, A.;MAHANI, S., E.; SHEIBANI, V.; ABBASNEJAD, M.; RASAULIAN, B.; HAJIALIZADEH, Z.; AFRAZI, S. Olive leaf extract attenuates early diabetic neuropathic pain through prevention of high glucose-induced apoptosis. **Journal Ethnopharmacology**, v.136, n.1, p.188-96, 2011.
- KAPOOR, R.; KAKKAR, P. Protective Role of Morin, a Flavonoid, against High Glucose Induced Oxidative Stress Mediated Apoptosis in Primary Rat Hepatocytes. **Plos One**, v. 7, e41663. 2012.
- KERBEL, R. FOLKMAN, J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. **Nature Review**, v.2, p.727-739, 2002.
- KHLEBNIKOV, I., SCHEPETKIN, I.A., DOMINA, N.A., KIRPOTINA, L.I., QUINN, M.T., Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. **Andrei, Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, p.1749–1770, 2007.
- KILANI-JAZIRI S, FRACHET V, BHOURI W, GHEDIRA K, CHEKIR-GHEDIRA L, RONO Flavones inhibit the proliferation of human tumor cancer cell lines by inducing apoptosis. **Drug Chemical Toxicology**, 35, n.1, p.1-10. 2011.
- KLIMOVA, T.; CHAMDEL, N. S. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF, **Cell Death Differ**. v. 15, p. 660-666 2008.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiological Reviews**. v. 87, p. 99-163, 2007.
- KROEMER, G.; LEVINE, B. Autophagy cell death: the story of a misnomer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, p.1004-1010, 2010
- KUMAR, V; COTRAN, RS; ROBBINS, SL. **Patologia Básica**. Rio de Janeiro: KUO H., CHANG L., LIN Y., LU H., YANG J., LEE J., CHUNG J. Morin Inhibits the Growth of Human Leukemia HL-60 Cells *via* Cell Cycle Arrest and Induction of Apoptosis through Mitochondria Dependent Pathway, **Anticancer Research** v.27 p.395-406, 2007.
- KUO, H.; CHANG, L.; LIN, Y.; LU, H.; YANG, J. S.; LEE; J.; CHUNG J. Morin Inhibits the Growth of Human Leukemia HL-60 Cells *via* Cell Cycle Arrest and Induction of Apoptosis through Mitochondria Dependent Pathway. **Anticancer Research**. v.27, p.395-406. 2007.
- LANDIS-PIWOWAR K.R., MILACIC V., DOU Q.P. Relationship between the methylation status of dietary flavonoids and their growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities in human cancer cells. **Journal Cell Biochemistry**, v.105 p.514–523. 2008.

LEE, O.; LEE, B. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea L.* leaf extracts. **Bioresearch Technology**, v.101, p.3751-54, 2010.

LEITE, J. P. V. Química dos produtos naturais: uma abordagem biossintética. In: (Ed.) **Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas**. 1.ed, São Paulo Atheneu. 2010. 47-97p.

LEVINE, B., KROMER, G. Autophagy in aging, disease ad death: the true identity of a cell death impostor. **Cell Death & Differentiation**, v.16, p.1-2, 2009.

LIN, Y.; WU, J.; CHEN, H.; MAO, Y.; LIU, Y.; MOA, Q.; YANG, K.; ZHENG, X., XIE, L. Cyclin-dependet kinase 4 is a novel target in microRNA-195-mediated cell cycle arrest in bladder cancer cells, **FBRS Letters**, v.586, p.442-447, 2012.

LIU, J.; LIN, M.; YU, J.; LIU, B. BAO, J. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutic **Cancer Letters**, v.300, p.105-114, 2011.

LIU, J.; LIN, M.; YU, J.; LIU, B. BAO, J. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutic **Cancer Letters**, v.300, p.105-114, 2011.

LIU, L., MA, H., YANG, N., TANG, Y., GUO, J., TAO, W. DUAN, J.,A serial of natural flavonoides as thombin inhibitors: Structure-activity relationship. **Trombosis Research**, v.126, p.3685-78, 2010.

LOPES-LAZARO, M. The Warburg effects: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen? **Anticancer Agents Medical Chemistry**, v.8, p.305-312, 2008.

LUI, H. BALIGA, R. Endoplasmic reticulum stress-Associated caspases 12 metiates cisplatin-induced LLC-PK1 cell apoptosis. **Journal Am Soc Nephrol**. v.16, p.1985-1992, 2005.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonoide e seu potencial terapêutico. **Boletim Cento Biologia Reprodução**, v.27, p. 33-39, 2008.

MADDIKA, S.; ANDE, S.; WIECHEC, E. HANSEN, I. L.; WESSELBORG, S.; LOS, M. AKt-mediated phosphorylation of CDK2 regulates its dual role cell cycle progression and apoptosis. **Journal Cell Science**, v.121, p. 979-988, 2008.

MADEO, F.; EISENBERG, T.; BUTNER, S.; RUCKENSTUHL, C.; KROEMER, G. Spermidine: a novel autophagy inducer and longevity elixir. **Autophagy**, v. 6, p.160-162, 2010.

MAHABELESHWAR G. H., BYZOVA T.V. Angiogenesis in melanoma. **Semin Oncology**, v.36, n.6, p.6555-65, 2007.

MALTA, D. C. MOURA, E. C., SILVA, S. A., OLIVEIRA, P. P. V.; SILVA, V. L. C. Prevalência do tabagismo em adultos residentes nas capitais dos estados no Distrito Federal, Brasil, 2008. **Jornal Brasillian Pneumology**, v.36, p.75-83, 2010.

MANDERY K, BUJOK K, SCHMIDT I, KEISER M, SIEGMUND W, BALK B, KÖNIG J, FROMM MF, GLAESER H. Influence of the flavonoids apigenin, kaempferol, and quercetin on the function of organic anion transporting polypeptides 1A2 and 2B1. **Biochemistry Pharmacology**, v.80, p.1746-53, 2010.

MANNA, S. K.; AGGARWAL, R. S.; SETHI, G.; AGGARWAL, B. B.; RAMESH, G. T. Morin (3,5,7,2',4'-Pentahydroxyflavone) Abolishes Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation Induced by Various Carcinogens and Inflammatory Stimuli, Leading to Suppression of Nuclear Factor- $\kappa$ B-Regulated Gene Expression and Up-regulation of Apoptosis. **Clin Cancer Research**, v.13, n.7, p. 2290–2297, 2007.

MASTERS, G.A; KYONG, O.H. Clinical Presentation of Lung Cancer – Malignant Tumors of the Lung. **Editors Jean Paul Scullier and Willard Fry. Springer**, v.9, p.119-38, 2004

McDONALD SL.; SILVER, A. The opposing roles of Wnt-Sa in cancer. **Br Journal Cancer**, v.101, p.209-214, 2009.

MELO, M.J.S. Clinica e imagem do cancro do pulmão – Tratado de Pneumologia (Edits.: Maria JM Gomes e Renato Sotto Mayor). **Sociedade Portuguesa de Pneumologia**, v.85, p.1137-48, 2003.

MEURMAN, J. H.; Infeccious and dietary risk factors of oral cancer. **Oral Oncology**, v.46, p.411-413, 2010.

MIYAMOTO, S.; YASSUI, Y.; OHIGASHI, H.; TANAKA, T.; MURAKAMI, A. Dietary flavonoids suppress azoxymethame-induced colonic preneoplastic lesions in male C57BL/Ksj-db/dl mice. **Química-Biological Interactions**, v.183, p.273-283, 2010.

MOLINARI, M. Cell cycle checkpoint and their activation in human cancer, **Cell Proliferation**, v.33, p.261-274, 2000.

MONZON, G, J., DANCEY, J. Targeted agents for the treatment of metastatic melanoma. **OncoTargets and Therapy**. v.5 p.31–46, 2012.

MOORE, N.; LIFE, S. Quiescent, slow-cycling stem cell proliferation in cancer: a review of the evidence and discussion of significance. **Journal of Oncology**, p.1-11. 2011.

MORENO, S, V., Emerging molecular targets in melanoma invasion and metastasis. **Pigment Cell Melanoma Research**, v.26, n.1, p.39-57, 2012.

MORIYAMA B., HENNING S. A., LEUNG J., FALADE-NWULIA O., JAROSINSKI P., PENZAK S. R., WALSH T. J. Adverse interactions between

antifungal azoles and vincristine: review and analysis of cases. **Mycoses**, v.55, p.290–297, 2012.

MORSELLI, E.; GALLUZZI, L.; KEPP, O.; VICENCIO J.M.; CRIOLLO, A., MAIRICI, M.C.; KROEMER, G., Anti- and pro-tumor functions of autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1793, n.9, p.1524-32, 2009.

MORSELLI, E.; MAIURI, M. C.; MARKAKI, M.; MEGALOU, E.; PASPARAKI A.; PALIKARAS, K.; CRIOLLO, A.; GALLUZZI, L.; MALIK, S.A.; VITALE, I.; MICHAUD, M.; MADEO, F.; TAVERNARAKIS, N.; KROMER, G. The life span-prolonging effect of sirtuin-1 is mediated by autophagy. **Autophagy**, v.6, p.186-188, 2010.

MOUNTZIOS, G.; DIMOPOULOS, M.; SORIA, J.; SANOUDOU, D.; PAPADIMITRIOU C. A. Histopathologic and genetic alterations as predictors of response to treatment and survival in lung cancer: **A Review of Published Data**, v 75, p 94-100, 2010.

MOUNTZIOS, G.; FOUREST, P.; SOFIA, G. Mechanisms of disease: signal transduction in lung carcinogenesis – a comparison of smokers and never smokers. **Nature Clinical Practical Oncology**, v 5, p 610-618, 2008.

MULVIHILL, E. E.; HULFF, M. W. Antiatherogenic properties of flavonoids: implications for cardiovascular health. **Can Journal Cardiology**, v.26, p.17A-21A, 2010.

MYLONIS, I.; LAKKA, A.; TASAKALOF, A.; SIMOS, G. The dietary flavonoid kaempferol effectively inhibits HIF-1 activity and hepatoma cancer cell viability under hypoxic conditions. **Biochemical and Biophysical Research communication**, v.398, p.74-78, 2010.

NAFISI, S., SABOURY, A. A., KERAMAT, N., NEALT, J-C, TAJMIR-RIAAHI, H. A. Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. **Journal of Molecular Structure**, v.827, p.35-43, 2007.

NASO, L. G.; LEZAMA, L.; ROJO, T.; ETCHEVERRY, S. B.; VALCARCEL, M.; ROURA, M.; SALADO, C.; FERRER, E. G.; WILLIAMS, P. A. M. Biological evaluation of morin and its new oxovanadium(IV) complex as 4 antioxidant and specific anti-cancer agents. **Chemico-Biological Interactions**, p.1-13. 2013.

NELSON, D. L.; COX, M.M. **Lehninger Principles Biochemistry**. 5.ed. W. H. Freeman: New York, 2008. 1100p.

NETO, J. V.; OLIVEIRA, A. F. O.; OLIVEIRA, N. C.; DUARTE, H. S. S.; GONÇALVES, E. D. Aspectos técnicos da cultura da oliveira. **Boletim Técnico**. Belo Horizonte: Epamig. 2008. 56p.

NYCREN, R. DNA Measurement and cell cycle analysis by Flow cytometry. **Current Issues in Molecular Biology**. v.3, p.67-70. 2001.

- OLA M.S., NAWAZ M., AHSAN H., Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis, *Mol. Cell Biochemistry*, v.351 p.41–58. 2011.
- OLIVEIRA, A. F.; ABRAHÃO, E. Botânica e morfologia da oliveira (*Olea europaea* L.) **Informe Agropecuário**. Azeitona e azeite de oliva: tecnologias de produção, Belo Horizonte, v.27, n.231, p.13-17. 2006.
- OLIVEIRA, P. A.; COLAÇO, R.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; DE-LA-CRUZ, L. F.; LOPES, C. Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.44, p.79-121, 2007.
- OMAR, S. H. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. **Scientia Pharmaceutica**, v.78, p.133-154, 2010.
- ONG. C.; ZHOU, J.; ONG, C.; SHEN, H. Luteolin induces G1 arrest in human nasopharyngeal carcinoma cells via the Akt-GSK-3 $\beta$ -Cyclin D1 pathway. **Cancer letters**, v.298, p.167-175, 2010.
- ONG. C.; ZHOU, J.; ONG, C.; SHEN, H. Luteolin induces G1 arrest in human nasopharyngeal carcinoma cells via the Akt-GSK-3 $\beta$ -Cyclin D1 pathway. **Cancer letters**, v.298, p.167-175, 2010.
- ONRUBIA, M., CUSIDÓ R. M., RAMIREZ, K., HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, L., MOYANO, E., BONFILL, M., PALAZON J. Bioprocessing of Plant in Vitro Systems for the Mass Production of Pharmaceutically Important Metabolites: Paclitaxel and its Derivatives. **Current Medical Chemistry**, v.12, n.7, p. 887-890, 2012.
- ORTEGA, D. O. SÀNCHEZ-ARAGÓ, M., GINER-SÀNCHEZ, D.; SANCHEZ-CENIZO, L.; WILLER, I.; CUEZVA, J.M. Glucose avidity of carcinomas. **Cancer Letters**, v.276 p.125-135, 2009.
- PARK, H. J.; KIM, M. J.; HA, E.; CHUNG, J. H. Apoptotic effect of hesperidin through caspase-3 activation in human colon cancer cell, SNUC-C4. **Phitomedicine**, v.15, p.147-151, 2008.
- PATHANIA, D.; MILLARD, M.; NEAMATI, N. Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cell metabolism. **Advanced Drug Deliverd Reviews**, v.61, p.1250-1275, 2009.
- PHILIPP, E. E.; ABELE, D.; Masters of longevity: lessons from long-lived bivalves - a mini review. **Gerontology**, v.65, p.55-65, 2010.
- PICK, A.; MULLER, H.; MAYER, R.; HAENISCH, B.; PAJEVA, I. K.; WEIGT, M.; BONICH, H.; MULLER, C. E.; WIESE, M. Struture-activity relationships of flavonoids as inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). **Biorganic & Medical Chemistry**. v.19, p.2000-2012, 2011.
- PISINGER C, GODTFREDSSEN NS. Is there a health benefit of reduced tobacco consumption? A systematic review. **Nicotine Tob Research**. v.9, n.6, p.631-46, 2007.

PLANKAR, M.; JERMAN, I.; KROSOVEC, R.; Can we ignore coherence? **Biophysics and Molecular Biology**. v. 12, p.1-11, 2011.

POLLOCK J.; EDWARD B. G. Management of Small-Cell Lung Cancer: Time to Move Forward. **Oncology**. v. 24, n.11, p.1046-7, 2010.

PORTT, L.; NORMAN, G.; CLAPP, C.; GREENWOOD, M.; GREENWOOD, M. T. Anti-apoptosis and cell survival: a review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 18, n.3, p.238-59, 2010.

QIAN, B.; ZHANG, H.; ZHANG, L.; XIAOYIN, Z. YU, H. CHEN, K. Association of genetic polymorphisms in DNA repair pathway genes with non-small cell lung cancer risk. **Lung Cancer**, v.73, p.138-146, 2011.

QUISPE, A.; ZAVALA. D.; ROJAS, J.; GOYA, L. Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of human hematoma cell line (HepG2). **Journal Agric. Food Chem**, v.53, p.1271-80, 2005.

RADIAU, M.; KOSSAL, M.; BRAUD, M.; CHALABI, N.; SATIH, S.; BIGNON Y.; BERNARD-GALLON, D. J. Genistein and daidzein act on panel of genes implicated in cell cycle and angiogenesis by polymerase chain reaction arrays in human prostate cancer cell lines. **Cancer Epidemiology**, v.34, p.200-206, 2010.

RAMOS S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v.18 p.427-42. 2007

RAMOS S., Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signaling pathways. **Molecular Nutrition Food Research**. v.52, p.507-26. 2008.

RANG, H. P., DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p 904.

REEDIJK, J. FICHTINGER-SCHEPMAM, A. M. J.; OOSTEROM, A. T. V.; PUTTE, P. V. Medicinal applications of heavy-metal compounds. **Structure and Bonding**, v.16, p.52-3,. 1987.

REMOIZE, C., Biola, A., Pallardy, Y. M., Breard, J. Apoptosis: identification of dying cells. **Cell Biology and Toxicology**, v.14, p.111-120, 1998.

REUTER S, EIFES S, DICATO M, AGGARWAL BB, DIEDERICH M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. **Biochemistry Pharmacology**, v.76 p.1340-51. 2008.

RUANO-RAVINA, A., FIGUEIRAS, A.; BARROS-DIOS, J. M. Lung cancer and related risk factors: an update of the literature. **Public Health**. v.117, p.149-156, 2003.

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

SANCHEZ-ARAGÓ, M.; CHAMORRO, M; CUEZVA, J. C. Selection of cancer cells with repressed mitochondria triggers colon cancer progression. **Carcinogenesis**, v.34, p.567-576, 2010.

SCHOROTHER, M.; KAUFMAN, R.J. The mammalian unfolded protein response. **Annual Review of Biochem**, v.74, p.739-789, 2005.

SCHULZ, T.J.; THIERBACH, R.; VOIGT, A.; DREWES, G.; MIETZNER B, STEINBERG, P.; PFEIFFER, A. F. H.; RISTOW, M. Induction of Oxidative Metabolism by Mitochondrial Frataxin Inhibits Cancer Growth. **Journal Biological Chemistry** 281: 977–981. 2006.

SERGEEVA, V.; BRAUN, U.; SPOONER-HART, R.; NAIR, N. First report of *Pseudocercospora cladosporioides* on olive (*Olea europaea*) berries in Australia, **Australasian Plant Disease Notes**, v.3, n.1, p.24, Apr. 2008.

SHIN E. K., KWON H. S., KIM Y. H., SHIN H. K., KIM J. K. Chrysin, a natural flavone, improves murine inflammatory bowel diseases. **Biochemistry Biophysic Research Community**, v.381 p.502–507. 2009.

SHRODER, M.; KAUFMAN, R. J.; The mammalian unfolded protein response. **Annual Review Biochemistry**, v.74, p.739-789, 2005.

SIEGELIN, M. D.; GAISER, T.; HABEL, A.; SIEGELIN, Y. Myricetin sensitizes malignant glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by down-regulation of the short isoform of FLIP and bcl-2. **Cancer Letters**. v.283, p.230-238, 2009.

SINGH B.K., TRIPATHI M., CHAUDHARI B.P., PANDEY P.K., KAKKAR P. Natural terpenes prevent mitochondrial dysfunction, oxidative stress and release of apoptotic proteins during nimesulide-hepatotoxicity in rats. **PLoS One**, v. 7, e34200. 2012.

SOOBRAATTEE M. A., BAHORUM T., ARUOMA O. I., chemoprevention actions of polyphenolic compounds in cancer. **Biofactors**. v.27 p.19-35. 2006.

STERNLICHT, M. D., WERB, Z: How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Review Cell Dev Biol**, v. 17 p. 463-516, 2001.

SU, Y. SIMMEN, F. A.; XIAO, R.; SIMMEN, R. C. Expression profiling of rat mammary epithelial cells reveals candidate signaling pathways in dietary protection from mammary tumors. **Physiology Genomics**, v.30, p.8-16, 2007.

SUTHERLAND, K. D., PROOS, T.; BROUNS, I.; ADRIAENSEN, D.; SONG, J.; BERNS, A. Cell of origin of small cell lung cancer: inactivation of Trp53 and Rb1 in distinct cell types of adult mouse lung. **Cancer cell**, v.19, p.754-764. 2011.

SWIATKOWSKA, B. Modifiable risk factors for the prevention of lung cancer. **Rep Pract Oncol Radiother**. v.12, p.119-127, 2007.

TANEDA S, HONDA K, TOMIDOKORO K, UTO K, NITTA K, et al. Eicosapentaenoic acid restores diabetic tubular injury through regulating oxidative stress and mitochondrial apoptosis. **American Journal Physiology Renal Physio**, v. 299, p.F1451–F1461. 2010.

TARHINI, A, A., AGARWALA, S, S., Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease. **Dermatol Ther**, v.19, p.19-25, 2006.

THOMPSON, K. H.; ORVIG. C. Metal complexes in medicinal chemistry new vistas and challenges in drug desing. **Dalton Transactions**, p.761-764. 2005.

TORIGOE, T. IZUMI, H.; YOSHIDA, Y.; TANABE, M.; YOSHIDA, T.; IGARASHI, T.; NIINA, I.; WAKASUG, T. MOMII, Y.; KUWANO, M.; KOHNO, K. Cisplatin resistance and transcription factors. **Current Med. Chemistry Anti-cancer Agents**, v.5, p.15-27. 2005.

TORQUATO, E. B.; CARVALHO, W.R. Tratamento do carcinoma de pulmão de não pequenas células. Estádios I e II. In: **Câncer do Pulmão**. São Paulo: Atheneu, 2005. Cap. 6. 89-97 p.

UDDIN, N.; SIDDIQUI, B. S.; BEGUM, S.; BHATTI, H. A.; PARVEEN, S.; VELVHETI, V. GOVINDAN, R. Hedgehog signaling pathway and lung cancer. **Journal thoracic oncology**, v.2, p.7-9, 2007.

VERFAILLIE, T.; GARG, A. D.; AGOSTINIS, P. Targeting ER stress induced apoptosis and inflammation in cancer. **Cancer Letters**. 2010.

VERMEULEN, K.; BERMEMAN, Z. N.; VAN BOCKSTAELE, D. R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Proliferation**. v.36, p.165-75, 2003.

VIDYA P. R.; SENTHIL M. R.; MAITREYI S.; RAMALINGAM K.;, KARUNAGARAN D.; NAGINI S. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF-κB inhibition. **European Journal Pharmacology**. v.649, n.1-3, p. 84-91, 2010.

VILLANUEVA J, HERLYN M. Melanoma and the tumor microenvironment. **Current Oncology Reports**. v.10, n.5, p.439-46, 2008.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRINGETA, P. S. Flavonoides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.23, p.141-149, 2008.

WANG, J. C. Y. Good cells gone bad: the cellular origins of cancer,. **Tends in molecular Medicine**, v.16, p.145-151, 2010.

WHELAN, R. S.; KAPLINSKIY, V.; KITSIS, R. N. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. **Annual Reviews of Physiology**, v.72, p.45-59., 2010.

XU W.; LIU, J.; LI, C.; WU, H.; LIU, Y. Kaempferol-7-O- $\beta$ -D-glucoside (KG) isolated from *Smilax china* L. rhizome induces G2/M phase arrest apoptosis on HeLa cells in a p53-independent manner. **Cancer Letters**. v 264, p.229-240, 2008.

YAN, R.; CAN, Y., CHEN C.; DAI, H. YU S.; WEI J. LI, H. YANG B. Antioxidant flavonoids from the seed of *Oroxylum indicum*. **Fitoterapia**. v.82, p.841-848, 2011.

YANEZ, J.; VICENTE, V.; ALCARAZ, M.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCIA, O; CANTERAS, M.; et al. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. *Nutrition Cancer*. v.49 p.191–199. 2004.

YONG, C. D.; ANDERSON, S. M. Sugar and fat – that's where it's at: metabolic changes in tumors. **Brest Cancers Research**. v.202, p.1-9, 2008.

YOUNG G. P., HU Y., LE LEU R. K., NYSKOHUS L., Dietary fibre and colorectal cancer: a model for environment-gene interations. **Molecular Nutrition & Food Research**. v.49, p.571-84, 2005.

YOUNG, C.D.; ANDERSON, S.M. Sugar and fat – that's where it's at: metabolic changes in tumors. **Breast Cancer Research**. 10:202. 2008.

YU J.; WANG, Z.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B.; ZHANG, L. PUMA mediates the apoptosis response to p53 in colorectal cancer cells. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v.100, p.1931-1936, 2003.

ZHANG R., KANG K.A., KANG SS., PARK J.W., HYUN J.W. Morin (29,3,49,5,7-pentahydroxyflavone) protected cells against c-radiation-induced oxidative stress. **Basic Clinical Pharmacologic Toxicological**, v.108, p.63–72, 2011.

ZHANG, Y.; LIU, S.; MICHANIN, C.; FENG, Y.; CHARLAT, O.; MICHAUD, G. A.; SHI, M. S. X.; HILD M., BAUER, A.; MYER, V. E.; FINAN, P. M.; PORTER, J. A. RNF146 is a poly (ADP-ribose)-directed E3 ligase that regulates axin degradation and WNT signaling. **Nature Cell Biology**, v.13, p.623-640, 2011.