

CRISTIANE SAMPAIO FONSECA

**AVALIAÇÃO, *IN VIVO* E *IN VITRO*, DOS EFEITOS DOS FLAVONÓIDES
QUERCETINA, NARINGENINA E IPRIFLAVONA NA PREVENÇÃO E
TRATAMENTO DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH**

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
2006

CRISTIANE SAMPAIO FONSECA

**AVALIAÇÃO, *IN VIVO* E *IN VITRO*, DOS EFEITOS DOS FLAVONÓIDES
QUERCETINA, NARINGENINA E IPRIFLAVONA NA PREVENÇÃO E
TRATAMENTO DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich**

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: 2 de maio de 2006

Prof. Tanus Jorge Nagem
(Conselheiro)

Prof. Marcelo José Vilela
(Conselheiro)

Prof. Adelson Luiz Araújo Tinoco

Prof^ª. Vera Maria Peters

Prof^ª. Tânia Toledo de Oliveira
(Orientadora)

*A **Deus**, pela presença em todos os momentos
da minha vida,
Aos meus pais **Renato e Iolanda**, pelo amor,
carinho e incentivo durante as etapas da
minha vida,
A minha querida filha **Maria Clara**, pelas
alegrias e pelo estímulo a querer sempre ser
mais.
Ao **Henrique**, pelo carinho e dedicação,
dedico este trabalho,*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo dom da vida, por ter me acompanhado nos momentos mais difíceis, iluminando todos os meus caminhos, me encorajando e me abençoando.

Aos meus pais, Renato e Iolanda, pelo amor, pela dedicação, pelo carinho, apoio, pela formação e pelo exemplo de força, garra, perseverança e honestidade. E, por muitas vezes, terem renunciado aos seus próprios sonhos para que eu realizasse os meus. O que sou devo a eles.

A minha filha Maria Clara, pelos momentos em que não pude lhe dar atenção, pela alegria, carinho e muito amor.

Aos meus irmãos, Cláudia e Renato, que sempre torceram por mim, vibrando com meu sucesso.

Ao Henrique, companheiro e amor de eternos momentos.

A minha orientadora, Dr^a. Prof^a. Tânia Toledo de Oliveira, pela confiança em mim dispensada, pela compreensão, sincera amizade e serenidade e incentivo durante a execução desse trabalho; Professora fascinante: sua ajuda foi muito valiosa para mim. ***“Bons professores são mestres temporários, professores fascinantes são mestres inesquecíveis”***.

Ao Dr. Prof. Marcelo José Vilela, pela co-orientação, pela atenção, pelo fornecimento do tumor de Ehrlich, pelas críticas construtivas, pela utilização do Laboratório do Câncer, e pela confiança que estiveram sempre presentes na nossa convivência.

Ao Dr. Prof. Tânus Jorge Nagem, pela co-orientação, pela amizade e pelo apoio oferecido.

Ao Dr. Prof. Adelson Luiz Araújo Tinoco, por todo incentivo e por acreditar em mim, sempre. Sou eternamente grata aos seus ensinamentos.

A Dr^a. Prof.^a Marlene Isabel Vargas Vilorio, pelos ensinamentos durante a leitura das lâminas.

A Dr^a. Prof^a. Vera Maria Peters, pelas críticas construtivas que engrandeceram ainda mais o meu trabalho.

A Maria Aparecida Leão, pela grande amizade, enorme carinho e por toda a atenção dispensada durante a realização deste trabalho.

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

Ao Hussen Machado pela amizade, apoio e grande ajuda na realização do nosso trabalho. Chegamos ao fim!! Vencemos!!

Aos colegas de curso do Laboratório de Biofármacos, Virgínia Ramos, Rosimar Regina, Ednaldo Queiroga, Aloísio da Silva Pinto, Leonardo Ramos Paes de Lima por toda amizade e apoio.

A todos os estagiários do Laboratório de Biofármacos que muito contribuíram para a realização desta obra, durante o desenvolvimento dos experimentos. A todos muito obrigado! Aos estagiários do laboratório do Câncer, que não mediram esforços para me ajudar. A ajuda de vocês foi imprescindível.

Aos amigos Maria Fernanda, Virgínia, Pedro, Meire, Maria Anete, pela amizade, carinho e imensurável apoio durante as horas boas e ruins dessa longa caminhada.

A Silvana Lages Ribeiro Garcia pelas orientações durante a análise estatística.

Aos técnicos do Biotério Central da UFV, Sr. Adão e Juliano, pela disponibilidade dos camundongos utilizados nos experimentos.

Aos funcionários da Kit Net Informática, por sempre ter dado prioridade ao meu computador na hora em que precisava.

Ao Eduardo Monteiro, secretário do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela disponibilidade e inestimável ajuda.

A Universidade Federal de Viçosa pela estrutura fundamental fornecida em todas as etapas da minha formação.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

A CAPES pelo fornecimento de bolsa.

A todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram na realização deste trabalho e na conquista de mais esta etapa em minha vida.

BIOGRAFIA

Cristiane Sampaio Fonseca, filha de Renato da Fonseca e Iolanda Sampaio Fonseca nascida em Viçosa, Minas Gerais em 07 de janeiro de 1975.

Em março de 1994 iniciou sua graduação em Nutrição pela Universidade Federal de Viçosa concluindo-a em março de 1999.

Iniciou a Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, em nível de Mestrado nesta mesma instituição em abril de 2001, concluindo-o em agosto de 2002.

Em agosto de 2002 foi aceita no programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, em nível de Doutorado na Universidade Federal de Viçosa.

CONTEÚDO

LISTA DE ABREVIATURAS -----	viii
LISTA DE FIGURAS -----	x
LISTA DE TABELAS-----	xii
LISTA DE QUADROS -----	xiv
LISTA DE GRÁFICOS -----	xv
RESUMO -----	xvii
ABSTRACT -----	xix
1. INTRODUÇÃO -----	1
2.OBJETIVOS -----	3
3. REVISÃO DE LITERATURA -----	5
3.1 Primeira parte – Biologia do câncer -----	5
3.1.1 Gênese da doença-----	5
3.1.2 Invasão -----	8
3.1.3 Metástases -----	10
3.1.4 Tumor de Ehrlich -----	14
3.2 Segunda parte – Bioquímica do câncer -----	17
3.2.1 Flavonóides -----	17
3.2.2 Relação entre flavonóides e câncer -----	21
3.2.3 Ação Antioxidante -----	23
3.2.4 Atividade Estrogênica e Antiestrogênica -----	27

3.2.5 Ação Antiinflamatória -----	30
3.2.6 Angiogênese -----	32
3.2.7 Estudos Epidemiológicos e Nutricionais-----	35
3.2.8 Outros Mecanismos -----	37
4. MATERIAL E MÉTODOS -----	39
4.1 Animais -----	39
4.2 Obtenção e Transplante de células do Tumor Ascítico de Ehrlich -----	40
4.3 Protocolos dos experimentos -----	41
4.3.1 Uso de flavonóides na prevenção do TAE -----	41
4.3.2 Utilização de flavonóides no tratamento de camundongos com TAE -----	43
4.4 Coleta de sangue, de líquido ascítico e remoção do fígado para análise histopatológica -----	44
4.5 Análise do tempo de vida -----	45
4.6 Tratamento com flavonóides das células do Tumor Ascítico de Ehrlich <i>in vitro</i> -----	46
4.7 Análise Estatística -----	47
5. RESULTADOS -----	48
5.1 Uso de flavonóides na prevenção do TAE em camundongos	48
5.2 Uso de flavonóides no tratamento do TAE em camundongos -----	66
5.3 Camundongos que foram inoculados com as células do TAE previamente tratadas com os flavonóides quercetina e ipriflavona -----	81
5.4 Análise histopatológica do fígado dos camundongos -----	97
6. CONCLUSÕES-----	102
7. PERSPECTIVAS FUTURAS -----	104
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	105

LISTA DE ABREVIATURAS

- ALT: Alanina Aminotransferase
AST: Aspartato Aminotransferase
ATP: adenosina trifosfato.
CDK: quinase dependente de ciclina
COX: cicloxigenase
DMEM: Meio de Dulbecco Modificado
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: acido desoxirribonucléico
ER: receptor de estrógeno
GST: glutationa transferase
ILS: percentagem de aumento do tempo de sobrevida
iNOS: óxido nítrico sintase
MAP: proteína quinase mitogênio ativada
MECB: extrato metanólico da planta *Cesalpinia bonducella*
MHC: complexo de histocompatibilidade
MPF: fator promotor de maturação
MST: tempo médio de sobrevida dos animais
MVD: densidade de microvasos
NCI: Instituto Nacional da Câncer - USA
NE: enzima elastase neutrófila
PBS: Solução Salina tamponada com fosfato
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
ROS: espécies reativas de oxigênio

TAE: Tumor Ascítico de Ehrlich

TGF: peptídeos regulatórios de crescimento

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Etapas no processo de formação de metástase -----	12
Figura 2	Estrutura básica do fenil-benzo- γ -pirona -----	19
Figura 3	Doenças associadas a ROS -----	24
Figura 4	Estrutura química da quercetina -----	26
Figura 5	Estrutura do 17- β -estradiol e da genisteína -----	28
Figura 6	Estrutura química da baicaleína -----	29
Figura 7	Crescimento de túbulos, representado a formação de vasos imaturos -----	33
Figura 8	Administração de flavonóides por gavage. -----	41
Figura 9	Inoculação intraperitoneal de células tumorais -----	42
Figura 10	Corte de tecido hepático de animal normal que recebeu ração, onde são observados hepatócitos e espaço sinusóide -----	100
Figura 11	Corte de tecido hepático de animal com TAE que recebeu ração, onde são observados hepatócitos, espaço sinusóide, e presença de células tumorais aderidas -- -----	100
Figura 12	Corte de tecido hepático de animal com TAE que recebeu medicamento Neotaxel [®] , onde são observados hepatócitos, espaço sinusóide, e presença de células tumorais aderidas -----	100
Figura 13	Corte de tecido hepático de animal com TAE que recebeu o flavonóide quercetina, onde são observados hepatócitos, espaço sinusóide, e presença de células tumorais aderidas -----	100

- Figura 14 Corte de tecido hepático de animal com TAE que recebeu o flavonóide ipriflavona, onde são observados hepatócitos, espaço sinusóide, e presença de células tumorais aderidas ----- 101
- Figura 15 Corte de tecido hepático de animal com TAE em que as células foram tratadas previamente com o flavonóide quercetina, onde são observados hepatócitos, espaço sinusóide, e presença de células tumorais aderidas ----- 101
- Figura 16 Corte de tecido hepático de animal com TAE em que as células foram tratadas previamente com o flavonóide ipriflavona, onde são observados hepatócitos, espaço sinusóide, e presença de células tumorais aderidas ----- 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Prevenção do TAE pelo uso de flavonóides medidos pelos valores médios de proteínas totais (g/dL) -----	48
Tabela 2	Prevenção do TAE pelo uso de flavonóides medidos pelos valores médios de AST (U/mL) -----	50
Tabela 3	Prevenção do TAE pelo uso de flavonóides medidos pelos valores médios de ALT (U/mL)-----	52
Tabela 4	Prevenção do TAE pelo uso de flavonóides medidos pelos valores médios de albumina (g/dL) -----	54
Tabela 5	Efeito de flavonóides na prevenção do TAE em camundongos. Viabilidade celular e volume do líquido ascítico-----	56
Tabela 6	Atividade preventiva de flavonóides e o tempo de vida de camundongos com TAE -----	65
Tabela 7	Tratamento do TAE com o uso de flavonóides medidos pelos valores médios de proteínas totais (g/dL) -----	66
Tabela 8	Tratamento do TAE com o uso de flavonóides medidos pelos valores médios de AST (U/mL) -----	68
Tabela 9	Tratamento do TAE com o uso de flavonóides medidos pelos valores médios de ALT (U/mL) -----	69
Tabela 10	Tratamento do TAE com o uso de flavonóides medidos pelos valores médios de albumina (g/dL) -----	70
Tabela 11	Efeito de flavonóides no tratamento do TAE em camundongos. Viabilidade celular e volume do líquido ascítico -----	72

Tabela 12	Atividade dos flavonóides sobre o tempo de vida de camundongos com TAE -----	80
Tabela 13	Células do TAE tratadas com o flavonóide quercetina (10 μ M -10 mM)-----	81
Tabela 14	Células do TAE tratadas com o flavonóide ipriflavona (500 μ M -500 mM)-----	83
Tabela 15	Valores médios de proteínas totais do soro sanguíneo de camundongos que receberam as células do tumor ascítico de Ehrlich tratadas com diferentes flavonóides -----	85
Tabela 16	Valores médios de AST do soro sanguíneo de camundongos que receberam as células do tumor ascítico de Ehrlich tratadas com diferentes flavonóides -----	86
Tabela 17	Valores médios de ALT do soro sanguíneo de camundongos que receberam as células do tumor ascítico de Ehrlich tratadas com diferentes flavonóides -----	87
Tabela 18	Valores médios de albumina no soro sanguíneo de camundongos com as células do tumor ascítico de Ehrlich tratadas com diferentes flavonóides e -----	88
Tabela 19	Viabilidade celular e volume do líquido ascítico em camundongos que receberam as células do TAE tratadas com flavonóides -----	89
Tabela 20	Atividade dos flavonóides sobre o tempo de vida de camundongos com TAE -----	97

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Antioxidantes quimioprotetores de frutas e vegetais ---	18
Quadro 2	Estrutura química de alguns flavonóides e ocorrência natural em plantas -----	19
Quadro 3	Fitoquímicos associados com a prevenção do câncer --	22
Quadro 4	Distribuição de animais em cada grupo e seus respectivos tratamentos -----	42
Quadro 5	Distribuição de animais em cada grupo e seus respectivos tratamentos -----	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Efeito dos flavonóides na prevenção do TAE. Células tumorais viáveis -----	56
Gráfico 2	Efeito dos flavonóides na prevenção do TAE. Células tumorais mortas- -----	57
Gráfico 3	Efeito dos flavonóides na prevenção do TAE. Células tumorais totais -- -----	61
Gráfico 4	Efeito dos flavonóides na prevenção do TAE. Viabilidade celular -----	62
Gráfico 5	Efeito dos flavonóides na prevenção do TAE. Volume do líquido ascítico -----	63
Gráfico 6	Prevenção dos flavonóides e mortalidade de camundongos com TAE -----	64
Gráfico 7	Efeito dos flavonóides no tratamento de camundongos com TAE. Células viáveis -----	73
Gráfico 8	Efeito dos flavonóides no tratamento de camundongos com TAE. Células mortas -----	74
Gráfico 9	Efeito dos flavonóides no tratamento de camundongos com TAE. Células totais--- -----	76
Gráfico 10	Efeito dos flavonóides no tratamento de camundongos com TAE. Viabilidade celular -----	77
Gráfico 11	Efeito dos flavonóides no tratamento de camundongos com TAE. Volume do líquido ascítico-----	78

Gráfico 12	Mortalidade de camundongos com TAE tratados com flavonóides -----	79
Gráfico 13	Viabilidade celular (%) de acordo com diferentes concentrações do flavonóide quercetina -----	82
Gráfico 14	Viabilidade celular (%) de acordo com diferentes concentrações do flavonóide ipriflavona-----	83
Gráfico 15	Células viáveis presentes no líquido ascítico de camundongos com TAE que receberam células tratadas com flavonóides -----	90
Gráfico 16	Células mortas presentes no líquido ascítico de camundongos com TAE que receberam células tratadas com flavonóides -----	91
Gráfico 17	Células totais presentes no líquido ascítico de camundongos com TAE que receberam células tratadas com flavonóides -----	92
Gráfico 18	Viabilidade celular no líquido ascítico de camundongos com TAE que receberam células tratadas com flavonóides -----	93
Gráfico 19	Volume do líquido ascítico de camundongos com TAE que receberam células tratadas com flavonóides - -----	94
Gráfico 20	Mortalidade de camundongos com TAE com as células tratadas com diferentes flavonóides -----	95

RESUMO

FONSECA, Cristiane Sampaio. D.S., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2006.

Avaliação, *in vivo* e *in vitro*, dos efeitos dos flavonóides quercetina, naringenina e ipriflavona na prevenção e tratamento do Tumor Ascítico de Ehrlich.
Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Conselheiros: Marcelo José Vilela e Tanus Jorge Nagem.

Todos os anos surgem, no mundo, milhares de novos casos de câncer em seres humanos. No Brasil, estima-se para o ano de 2006 mais de 470.000 novos casos. Estudos relatam que muitos produtos naturais são estudados como agentes quimioprotetores contra vários cânceres de ocorrência mundial. Os flavonóides exercem efeitos benéficos na prevenção do câncer, devido a habilidade de inibir o ciclo celular, a proliferação celular, estresse oxidativo e induzir detoxificação de enzimas e apoptose. A descoberta da transplantação dos tumores favoreceu o estudo do comportamento de vários cânceres. O tumor ascítico de Ehrlich (TAE) foi o modelo utilizado nesse estudo em camundongos Swiss, inoculados com as células de tumor por via intraperitoneal, para avaliar o efeito dos flavonóides quercetina, naringenina e ipriflavona na prevenção do aparecimento desse tumor, bem como a quercetina e ipriflavona para tratar os camundongos com TAE e impedir o crescimento das células desse tumor *in vitro*. Os camundongos foram tratados com 10mg/kg dos flavonóides por 20 dias. No 21º dia, os animais foram inoculados por via intraperitoneal com $1,66 \times 10^4$ células em PBS pH 7,4.

No experimento que visava o tratamento do tumor, a inoculação das células precedeu o uso diário dos flavonóides quercetina e ipriflavona. Após 18 dias de inoculação das células, foi coletado sangue dos animais e todo líquido ascítico formado na cavidade abdominal. Os níveis de proteínas totais, das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e albumina foram medidos utilizando kits enzimáticos e para contagem das células utilizou Hemocitômetro de Neubauer usando a técnica de exclusão pelo azul de tripano. No experimento que objetivava a prevenção, observou-se aumento nos valores médios de proteínas totais dos animais usando a naringenina; redução da atividade de AST quando usada a ipriflavona e de ALT quando associada a quercetina + naringenina. O uso da quercetina, naringenina e quercetina+naringenina provocaram um aumento nos valores médios de albumina. Ocorreu uma redução na viabilidade das células tumorais presentes no líquido ascítico com o uso de todos os flavonóides testados. Os animais com TAE tratados com a quercetina apresentaram aumento na atividade de AST e na concentração de albumina. Quando tratados com a ipriflavona, houve uma redução na atividade da ALT. Quanto à viabilidade das células tumorais, houve uma redução, independente dos flavonóides usados. Os estudos *in vitro* mostraram que com o aumento da concentração dos flavonóides quercetina e ipriflavona houve uma menor viabilidade celular. E quando os animais foram inoculados com as células do TAE previamente tratadas com 100 μ M de quercetina e ipriflavona, houve um aumento nos valores médios de proteínas totais e albumina no soro sanguíneo dos animais e uma redução na atividade das enzimas AST e ALT quando as células inoculadas foram tratadas com a quercetina. Os flavonóides quercetina e naringenina possuem uma atividade antitumoral significativa de acordo com o critério da NCI, onde se conclui que o seu uso como preventivo deva ser indicado.

ABSTRACT

FONSECA, Cristiane Sampaio. D.S., Universidade Federal de Viçosa, May of 2006.

Evaluation, *in vivo* and *in vitro*, of the effects of the flavonoids quercetin, naringenin and ipriflavon in the prevention and treatment of the of Ehrlich.ascitic tumor. Adviser: Tânia Toledo of Oliveira. Counselors: Marcelo José Vilela and Tanus Jorge Nagem.

Every year appears, in the world, thousands of new cases of cancer in human beings. In Brazil, he/she is considered more than 470.000 new cases for the year of 2006. Studies tell that many natural products are studied as agents quimioprotetors against several cancers of world occurrence. The flavonoids exercise beneficial effects in the prevention of the cancer, due to ability to inhibit the cellular cycle, the cellular proliferation, oxidative stress and to induce detoxification of enzymes and apoptose. The discovery of the transplantation of the tumors favored the study of the behavior of several cancers. The Ehrlich.ascitic tumor (TAE) it was the model used in that study in mice Swiss, inoculated with the tumor cells by road intraperitoneal, to evaluate the effect of the flavonóides quercetin, naringenin and ipriflavon in the prevention of the emergence of that tumor, as well as the quercetin and ipriflavon to treat the mice with TAE and to impede the growth of the cells of that tumor *in vitro*. The mice were treated with 10mg/kg of the flavonoids by 20 days. In the 21^o day, the animals were inoculated by road intraperitoneal with $1,66 \times 10^4$ cells in PBS pH 7,4. In the experiment that sought the treatment of the tumor, the inoculation of the cells it preceded the daily use of the flavonóides quercetin and ipriflavon. After 18 days of inoculation of the cells, it was collected blood of the animals and all liquid ascítico formed in the abdominal cavity. The levels of total proteins, of the enzymes aspartato aminotransferase (AST) and

alanina aminotransferase (ALT) and albumin was measured using enzymatic kits and for count of the cells it used Hemocitometro of Newbauer using the exclusion technique for the tripan blue. In the experiment that aimed at the prevention, increase was observed in the medium values of total proteins of the animals using the naringenin; reduction of the activity of AST when used the ipriflavon and of ALT when associated the quercetin + naringenin. The use of the quercetin, naringenin and quercetin+naringenin provoked an increase in the medium values of albumin. It happened a reduction in the viability of the cells present tumorais in the liquid ascítico with the use of all the tested flavonóides. The animals with TAE treated with the quercetin they presented increase in the activity of AST and in the albumin concentration. When agreements with the ipriflavon, there was a reduction in the activity of ALT. With relationship to the viability of the cells tumorais, there was a reduction, independent of the used flavonóides. The studies in vitro showed that with the increase of the concentration of the flavonóides quercetin and ipriflavon there was a smaller cellular viability. And when the animals were previously inoculated with the cells of TAE treated with 100 μ M of quercetin and ipriflavon, there was an increase in the medium values of total proteins and albumin in the sanguine serum of the animals and a reduction in the activity of the enzymes AST and ALT when the inoculated cells were treated with the quercetin. The flavonóides quercetin and naringenin possess an activity significant antitumoral in agreement with the criterion of NCI, where it is ended that your use as preventive it should be indicated.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é hoje um dos grandes inimigos da humanidade, tornando-se necessário encontrar não só novas formas de terapia, mas também novos processos de diagnóstico, que identifiquem os tumores com maior rapidez e eficiência (VILELA, 1998).

Estudiosos estimaram para o ano de 2000 que o número de novos casos de câncer no mundo seria maior que 10 milhões, dentre os quais, 53% ocorreriam nos países em desenvolvimento. No Brasil, as estimativas para o ano de 2006 apontam que ocorrerão 472.050 casos novos de câncer.

Hábitos de vida como fumar tabaco, consumo excessivo de álcool, exposição prolongada ao sol, infecção por HPV matam uma forte ligação com o câncer, mas não podem ser sua causa básica. Grande parte da população está exposta a esses carcinógenos, mas uma ínfima minoria sofre de tumores como consequência. A causa imediata do câncer deve ser uma combinação de agressões ou acidentes que induz células normais de um corpo saudável a se tornar malignas, crescendo de forma desordenada e podendo se alojar em outros locais do organismo (GIBBS, 2003).

Assim, o câncer é também chamado de neoplasia maligna ou tumor maligno, sendo caracterizado por uma massa de tecido que cresce em excesso, fora do controle do organismo, mesmo cessado o estímulo que o gerou. Esse crescimento, sem objetivo, priva o organismo de seu suprimento energético e nutricional (VILELA, 1998).

Devido à grande facilidade de manuseio experimental, o tumor de Ehrlich tem sido extensamente usado como modelo na Oncologia Experimental. O uso de tumores transplantáveis na forma ascítica tem sido um recurso útil por muitas razões, entre elas a facilidade na padronização do número de células a ser inoculada, e na forma sólida pela quantificação do crescimento e da regressão da massa tumoral. (RIZZO, 2000).

A literatura indica que muitos produtos naturais são estudados como agentes quimioprotetores contra cânceres de ocorrência mundial (REDDY, 2003). Estudos epidemiológicos sugerem a relação inversa entre risco de câncer e consumo de vegetais,

frutas, cereais e grãos de uma maneira geral, fibras dietéticas, certos micro nutrientes, e também hábitos de vida, como prática de atividade física (GREENWALD, 2001).

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

No presente trabalho avaliou-se o efeito dos flavonóides quercetina, naringenina e ipriflavona e do quimioterápico Neotaxel[®] na prevenção e no tratamento do tumor ascítico de Ehrlich *in vivo* e *in vitro*.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Avaliar o efeito dos flavonóides quercetina, naringenina e ipriflavona na prevenção e no tratamento de camundongos suíços com Tumor Ascítico de Ehrlich.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Uso dos flavonóides quercetina, naringenina e ipriflavona na prevenção do TAE em camundongos

- Avaliar o efeito preventivo de flavonóides usando como parâmetro a viabilidade das células tumorais e o acúmulo do líquido ascítico na cavidade abdominal dos camundongos.
- Quantificar os parâmetros bioquímicos no soro sanguíneo dos camundongos tratados com os flavonóides e posterior indução do TAE.
- Verificar o efeito dos flavonóides sobre o tempo médio de sobrevivência dos animais tratados previamente com flavonóides que foram inoculados com as células do TAE.

Uso dos flavonóides quercetina e ipriflavona no tratamento do TAE em camundongos

- Avaliar o efeito de flavonóides em células do TAE *in vitro*.
- Avaliar o efeito dos flavonóides usando como parâmetro a viabilidade das células tumorais e o volume do líquido ascítico formado na cavidade abdominal dos camundongos com TAE.
- Quantificar os parâmetros bioquímicos no soro sanguíneo dos camundongos com TAE tratados com flavonóides.
- Verificar o efeito dos flavonóides sobre o tempo médio de sobrevivência dos animais com TAE
- Verificar histopatologicamente a adesão de células tumorais no fígado dos camundongos com TAE tratados com os flavonóides.
- Avaliar o crescimento das células do TAE tratadas previamente com os flavonóides e inoculadas nos camundongos.
- Comparar o efeito do quimioterápico Neotaxel[®] com os flavonóides no tratamento de animais com TAE.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PRIMEIRA PARTE: BIOLOGIA DO CÂNCER

3.1.1 – GÊNESE DA DOENÇA

De acordo com VILELA (1998), o câncer está ligado à formação e ao crescimento de organismos multicelulares, que dependem de uma rede complexa de fenômenos de multiplicação e diferenciação celular. As células desses organismos, durante toda a vida, estão sujeitas a diferentes sistemas de controle, exercidas por proteínas sintetizadas a partir de informações genéticas (contidas no DNA). Tais proteínas atuam em harmonia para permitir a cada célula um desenvolvimento “normal”. Alterações dessa homeostase podem resultar no câncer.

A causa do câncer hoje não é totalmente um mistério. Há mais de uma década, muitos geneticistas estavam confiantes de que a ciência se aproximava de uma resposta final: o câncer seria resultado de mutações cumulativas que alteram pontos específicos do DNA de uma célula, mudando as proteínas específicas decodificadas por genes relacionados à doença naqueles locais. As mutações afetam dois tipos de genes. Os primeiros chamados de supressores de tumor, normalmente refreiam a habilidade das células de se dividir. As mutações desativam os genes permanentemente. A segunda variedade, os oncogenes, estimula o crescimento, ou seja, a divisão celular. As mutações mantêm os oncogenes em estado ativo (GIBBS, 2003). Em seu artigo sobre as raízes do câncer, Gibbs relata que o câncer possui seis poderes, entre os quais (1) crescimento mesmo na ausência de sinais de avance normais; (2) crescimento apesar dos comandos de pare emitidos pelas células vizinhas; (3) evasão de mecanismos autodestrutivos embutidos; (4) habilidade para estimular a construção de vasos sanguíneos; (5) mortalidade efetiva e (6) poder para invadirem tecidos e espalhar por outros órgãos.

Durante décadas, a tese mais amplamente aceita da origem do câncer é aquela em que mutações do grupo de genes especiais eliminam as proteínas supressoras de tumor e ativam as oncoproteínas. Mais recentemente, três teorias alternativas têm obtido aceitação. Uma modifica o paradigma padrão ao postular um aumento excessivo no acúmulo de mutações randômicas através de genomas de células pré-cancerígenas. Duas outras teorias centram-se no papel da aneuploidia. A seguir encontra-se listadas as teorias segundo GIBBS (2003):

A) Dogma Padrão: carcinógenos como a luz ultravioleta e o tabaco, alteram diretamente o sequenciamento do DNA dos genes relacionados ao câncer. As mutações nos genes supressores de tumor causam o desaparecimento das proteínas inibidoras de crescimento decodificadas pelos genes, permitindo que a célula sobreviva e continue a se dividir quando não deveria. Ao mesmo tempo, mutações nos oncogenes causam hiperatividade nas oncoproteínas, levando a célula a crescer em situações que normalmente não deveria. O excesso de oncoproteínas e a ausência de proteínas supressoras de tumor fazem com que as células mutantes se reproduzam excessivamente. Depois de muitas etapas de mutação e expansão, uma célula na massa de mutantes livra-se de todas as restrições a seu crescimento. A colônia invade o tecido adjacente no órgão do hospedeiro. Nos estágios mais avançados de sua evolução, o câncer libera células na corrente sanguínea. Essas células de metástase formam novas colônias em locais distantes do corpo, terminando por interferir em funções críticas para a vida.

B) Dogma Modificado: algo desativa um ou mais genes necessários para sintetizar ou reparar corretamente o DNA. No momento da divisão das células, mutações randômicas ocorrem e não são reparadas, acumulando-se aos milhares. Finalmente, os genes relacionados ao câncer são atingidos. Na visão comum, a eliminação das proteínas supressoras de tumor e a ativação das oncoproteínas causam um curto-circuito no mecanismo de autodestruição da célula impedindo que ela cometa suicídio. O excesso de oncoproteínas e a ausência de proteínas supressoras de tumor fazem com que as células mutantes se reproduzam excessivamente. Depois de muitas etapas de mutação e expansão, uma célula na massa de mutantes livra-se de todas as restrições a seu crescimento. A colônia invade o tecido adjacente no órgão do hospedeiro. Nos estágios mais avançados de sua evolução, o câncer libera células na corrente sanguínea. Essas células de metástase formam novas colônias em locais distantes do corpo, terminando por interferir em funções críticas para a vida.

C) Instabilidade Inicial: alguma coisa silencia um ou mais genes “mestre” necessários para divisão celular. Durante a duplicação dos cromossomos acontecem erros. Algumas células-filhas recebem um número errado de cromossomos, ou cromossomos com aberrações que vão piorando de geração para geração. A dosagem dos genes nas células muda quando são adicionados ou extirpados segmentos de cromossomos. A tempo, a dosagem das proteínas supressoras de tumor cai a um nível crítico e cópias extras de oncogenes podem aumentar a dosagem de oncoproteínas a níveis perigosos.

D) Toda-Aneuploidia: uma anomalia durante a divisão celular produz células filhas aneuplóides. Os cromossomos localizados erradamente ou incompletos modificam a quantidade relativa de milhares de genes. Grupos enzimáticos que normalmente cooperam na cópia ou na fixação do DNA começam a falhar. Como resultado, a maioria das células aneuplóides morre. Mas umas poucas sobrevivem e produzem descendentes que também são aneuplóides, embora em formas diferentes das células progenitoras. Mais tarde, uma ou mais células adquirem um mix de cromossomos aberrantes. As células se multiplicam formando um tumor pré-canceroso. Evoluindo ao longo dos anos ou décadas, as células gradualmente adquirem a habilidade de invadir tecidos vizinhos de diferentes tipos. Nos estágios mais avançados de sua evolução, o câncer libera células na corrente sanguínea. Essas células de metástase formam novas colônias em locais distantes do corpo, terminando por interferir em funções críticas para a vida.

As células cancerosas são conceituadas por duas propriedades de invadir e colonizar territórios normalmente reservados para outras células. Uma célula anormal que não prolifera mais do que suas vizinhas normais não provocam danos significativos, mas se sua proliferação está fora de controle irá originar um tumor ou neoplasma, ou seja, um crescimento de uma massa de células anormais (ALBERTS, 1997). Torna-se assim impossível uma definição prevista para o termo neoplasia, porém o oncologista inglês Wills chegou à seguinte definição: “uma neoplasia é uma massa anormal de tecido, cujo crescimento excede aquele dos tecidos normais e não está coordenado com ele, persistindo da mesma maneira excessiva após o término do estímulo que induziu a alteração (BAAK, 2003)”. À medida que células neoplásicas permanecem agrupadas numa massa única, o tumor é dito benigno e a cura completa pode ser obtida pela remoção da massa cirurgicamente. Um tumor é considerado como câncer somente se for

maligno, se as células tiverem o poder de invadir tecidos vizinhos. A capacidade de invasão geralmente implica na habilidade de escapar, entrar na corrente sanguínea ou vasos linfáticos e formar tumores secundários ou metástases em outros locais do corpo. Quanto mais metástases um câncer for capaz de produzir, mais difícil a sua erradicação (ALBERTS, 1997).

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

Diferenciação refere-se ao grau de semelhança entre as células neoplásicas e as células normais comparáveis tanto morfológica quanto funcionalmente. Em geral, os tumores benignos são bem diferenciados. Os neoplasmas malignos compostos de células indiferenciadas são ditos anaplásicos. A falta de diferenciação ou anaplasia é marcada por várias alterações morfológicas e funcionais como pleomorfismo (variação de tamanho e forma tanto das células como dos núcleos), os núcleos apresentam uma abundância de DNA e são normalmente escuros (hipercromáticos). A forma nuclear é geralmente muito variável, e a cromatina freqüentemente está aglomerada e distribuída ao longo da membrana nuclear. Grandes nucléolos geralmente estão presentes nestes núcleos. Os tumores indiferenciados em geral possuem um grande número de mitoses, refletindo a maior atividade proliferativa das células parenquimatosas.

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

3.1.2 INVASÃO LOCAL:

A maioria dos tumores benignos cresce como massas coesivas em expansão, permanecendo situadas em seu local de origem, sem a capacidade de se infiltrarem, invadirem ou metastatizarem para locais distantes, como ocorre nos tumores malignos. Em virtude de seu crescimento e expansão lentos, eles habitualmente desenvolvem uma faixa de tecido conjuntivo comprimido, algumas vezes denominada cápsula fibrosa, que os separa dos tecidos do hospedeiro. Esse encapsulamento tende a conter a neoplasia benigna como massa isolada, facilmente palpável e móvel, passível de enucleação cirúrgica (COTRAN, 2000).

O crescimento dos cânceres é acompanhado de infiltração progressiva, invasão e destruição do tecido circundante. Em geral são pouco demarcados em relação ao tecido normal circundante, e falta um plano de clivagem bem definido.

Os tumores malignos são, em sua maioria, invasivos, e, portanto, pode-se esperar que penetrem na parede do cólon ou do útero, por exemplo, ou que se projetam através da superfície da pele. Não reconhecem limites anatômicos normais. Esse caráter invasivo dificulta a sua ressecção cirúrgica, e, mesmo quando o tumor parece ser bem circunscrito, é necessário remover uma considerável margem de tecidos aparentemente normais ao redor da neoplasia infiltrativa. Depois do desenvolvimento de metástases, a invasão constitui a característica mais confiável que diferencia os tumores malignos de benignos (COTRAN, 2000).

Invasão e infiltração dentro de tecidos que envolvem o tumor primário levam à penetração nos vasos sanguíneos, linfáticos, ou ambos, e assim se tornam bem difundidos (COTRAN, 2000; HOSSFELD, 1997). As células cancerosas possuem organelas necessárias para locomoção ativa, importante no processo de invasão (ENGEL, 2003). Estudos revelaram a presença de enzimas destruidoras de tecidos no processo de invasão do tumor, como hidrolases lisossomais e collagenases. A destruição dos tecidos por estas enzimas, adicionado a oclusão de vasos linfáticos e sanguíneos mediado pela expansão da massa do tumor pode facilitar a infiltração do neoplasma (TSUCHIYA, 2003). Produção e secreção de serino-protease e ativador de plasminogênio têm sido associados neoplasmática de uma variedade de tipos de células. A invasão de tecidos normais e a penetração da membrana vascular basal por células metastáticas podem requerer participação ativa de enzimas hidrolíticas. (ROUDIER, 2003). A penetração nos vasos sanguíneos durante a invasão e extravasamento é o ponto de crucial importância na metástase (TANAKA, 2003).

3.1.3 - METÁSTASES

As metástases inequivocamente marcam um tumor como maligno porque os neoplasmas benignos não metastatizam. A invasividade dos cânceres permite que eles penetrem nos vasos sanguíneos, linfáticos e cavidades corpóreas, tendo assim a oportunidade de se espalharem (COTRAN, 2000; ALBERTS, 1997).

O processo de formação de metástases é o resultado de uma série de eventos complexos (TANAKA, 2003). Um passo inicial é a degradação da membrana basal e da matriz extracelular seguido por uma invasão local das células tumorais dentro do tecido circunvizinho. A enzima elastase neutrófila (NE), uma serino-protease, é produzida por neutrófilos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos. Esta enzima possui uma larga especificidade de substrato sob condições fisiológicas e resultados excessivos de NE são encontrados não somente na digestão de elastina, mas também em outras proteínas da matriz extracelular como laminina, fibronectina, proteoglicanas e colágeno tipo IV.

Recentemente foi demonstrado que muitas linhagens de células de câncer de pulmão humano produzem NE imunoreativa. A quantidade de NE imunoreativa em tecido tumoral é um indicador de prognóstico independente em pacientes com câncer de pulmão. Além disso, um inibidor específico de NE suprimiu completamente o crescimento de células transplantadas de câncer de pulmão em ratos com severa imunodeficiência. Esses achados indicam que a enzima designada elastase neutrófila é uma molécula presente no câncer, indicando ter um papel ativo na progressão do câncer de pulmão. Durante uma investigação *in vivo* com os efeitos do inibidor específico de NE no crescimento de células transplantadas subcutaneamente em ratos imunodeprimidos, mostrou que essas células formam múltiplas metástases no pulmão (TANAKA, 2003).

Uma metástase é definida como crescimento de uma ou mais células neoplásicas, ocorrendo a uma distância específica do tumor primário (HOSSFELD, 1997). É a transferência de uma doença de um órgão ou parte para outro não diretamente conectado àquele (COLEMAN, 2001a). A habilidade de invadir e metastatizar é característica única e somente de neoplasmas malignos (ENGEL, 2003). A metástase envolve:

- a liberação de células de um tumor primário,
- disseminação a sítios distantes presos na microcirculação de órgãos,
- extravasamento,

- infiltração dentro do parênquima dos órgãos e,
- sobrevivência e crescimento dentro de uma nova colônia de tumor (ENGEL, 2003; TSUCHIYA, 2003).

Nessa cascata, a metastatização de células tumorais interage com várias células e matriz extracelular via numerosas moléculas envolvidas em várias respostas induzidas por estresse.

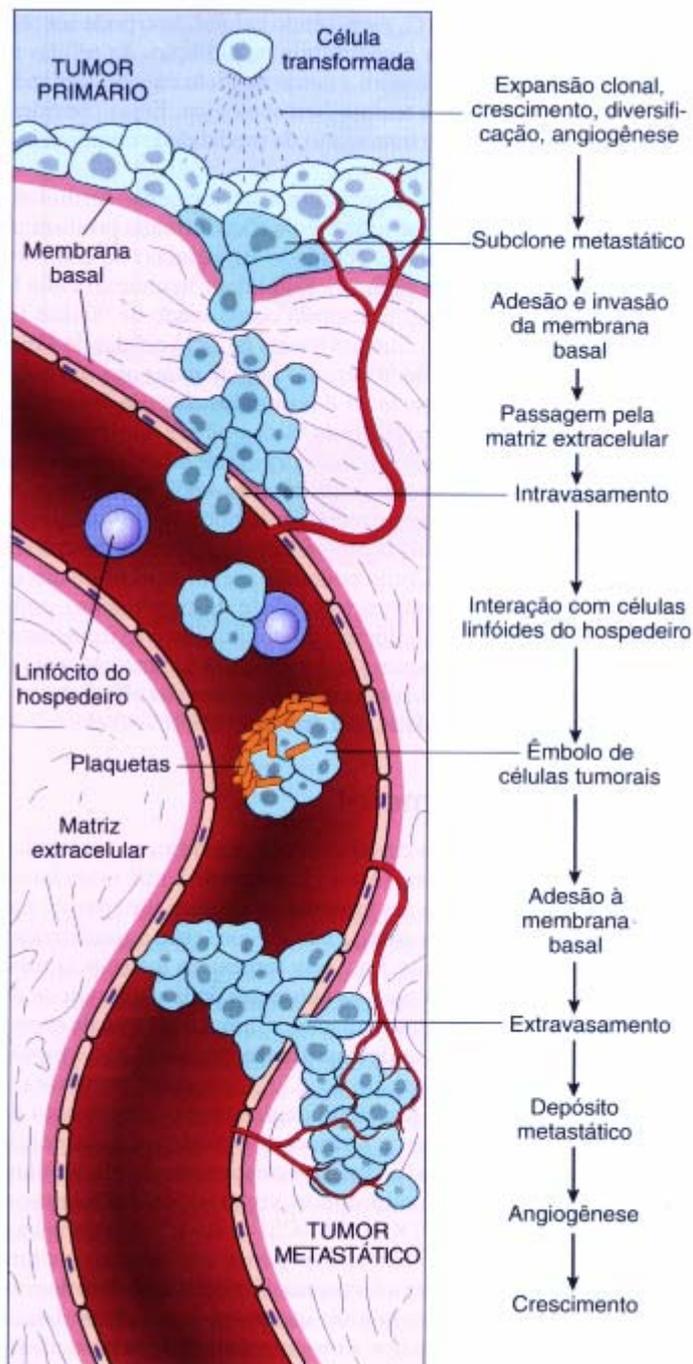
A disseminação dos cânceres pode ocorrer através da disseminação linfática e hematogênica.

Na disseminação linfática o transporte em vasos linfáticos é o passo comum para o processo de disseminação inicial de carcinomas, mas os sarcomas também podem se disseminar por essa via (COTRAN, 2000). Durante a invasão da célula neoplásica, o processo de infiltração e expansão dentro dos tecidos resulta na penetração de pequenos vasos linfáticos (TSUCHIYA, 2003). Estudos evidenciam que células neoplásicas podem passar livremente entre vasos sanguíneos e linfáticos (TANAKA, 2003). Nódulos linfáticos são imunologicamente reativos em pacientes com neoplasma. A presença do tumor pode estimular a produção e liberação de células imunocomponentes do sistema linforreticular. Se nódulos linfáticos podem servir como “filtro” temporário de células neoplásicas em metástases ainda não é claro (KUMMAR, 2003). Os nódulos linfáticos podem ser uma barreira temporária efetiva para disseminação do tumor em muitos sistemas. Muitas células neoplásicas, todavia, passam rapidamente pelos nódulos linfáticos e entram no sistema linfático e circulação sanguínea (ROUDIER, 2003).

A disseminação hematológica é passo típico de sarcomas, mas pode ser usado por carcinomas. As artérias, com suas paredes mais espessas, são menos facilmente penetradas do que as veias. Entretanto, pode ocorrer disseminação arterial quando as células tumorais atravessam os leitos dos capilares pulmonares, ou quando as próprias metástases pulmonares dão origem a êmbolos tumorais adicionais. O fígado e os pulmões são mais frequentemente afetados de forma secundária nessa disseminação hematogênica. Toda a drenagem da área portal flui para o fígado e todo o sangue a veia cava flui para os pulmões (COTRAN, 2000).

Como descrito anteriormente, as metástases são implantes tumorais descontínuos em relação ao tumor primário. A invasão dos cânceres permite a sua penetração nos

vasos linfáticos, sanguíneos e cavidades corporais, proporcionando-lhes assim, a oportunidade de disseminação (Figura 1).



Fonte: COTRAN, 2000

Figura 1 – Etapas no processo de formação da metástase.

A vascularização dos órgãos pode contribuir com frequência para que depósitos de metástases sejam formados. O pulmão é um sítio comum de desenvolvimento de metástase porque nele está o primeiro capilar encontrado pelas células do tumor quando entram na circulação venosa (TSUCHIYA, 2003).

Muitas pesquisas têm sido realizadas com o propósito de elucidar e compreender os processos de metástases secundárias a um tumor primário. O carcinoma hepatocelular, um dos mais comuns no mundo, possuem alta incidência em regiões com prevalência alta de infecção viral (hepatite B). Carcinoma hepatocelular comumente causa metástase no pulmão, nódulos linfáticos, glândula adrenal e ossos, incluindo o crânio (KUMMAR, 2003).

Assim, a capacidade de formar metástase é que torna os cânceres difíceis de serem erradicados cirurgicamente ou por irradiação localizada. Para sua ampla disseminação pelo corpo, uma célula típica de um tumor sólido deve ser capaz de diminuir suas adesões às células vizinhas, escapar do tecido de origem, migrar por outros tecidos até alcançar os vasos sanguíneos ou linfáticos, atravessar a lâmina basal e o revestimento endotelial dos vasos de forma a entrar e sair da circulação em outro local do corpo, sobreviver e proliferar em novo ambiente. As etapas finais das metástases são provavelmente as mais difíceis: muitos tumores liberam grandes quantidades de células na circulação, mas somente uma proporção ínfima destas células tem sucesso na formação de colônias metastáticas.

Células tumorais que tenham entrado em um vaso linfático, frequentemente, ficam presas nos linfonodos ao longo do caminho, dando origem as metástases nos linfonodos.

Poucos tipos de células normais, notadamente células brancas do sangue, possuem algumas ou todas as propriedades necessárias para se disseminar através do corpo, mas para a maior parte dos cânceres a capacidade de formar metástases requer mutações adicionais. Tais mutações, como outras envolvidas no desenvolvimento do câncer, acredita-se que ocorram ao acaso na população inicial do tumor: somente aquelas poucas células que adquirem as propriedades necessárias para formação de metástase e que se alojam em ambiente adequado serão capazes de produzir tumores secundários. De acordo com este conceito de evolução, através de variação ao acaso e seleção natural, encontramos que as células de um único tumor são heterogêneas na capacidade de formar metástases.

A compreensão dos mecanismos moleculares da formação de metástase poderia, eventualmente, permitir um esquema de tratamento para bloquear o tumor. Algum progresso tem sido feito neste sentido. Tem sido mostrado, por exemplo, que para células tumorais atravessarem a lâmina basal devem possuir integrinas apropriadas para atuarem como receptores de laminina, que permitem às células aderirem à lâmina basal, e devem possuir em sua superfície colagenase tipo IV, que ajuda a digerir a lâmina. (COTRAN, 2000; ALBERTS, 1997).

3.1.7 TUMOR DE EHRLICH

O tumor de Ehrlich foi desenvolvido por Paul Ehrlich em 1896 e descrito em 1906 como um adenocarcinoma espontâneo de glândula mamária originário de camundongos fêmeas. Inicialmente, o tumor foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. Somente em 1932 o tumor foi convertido para a forma ascítica (DAGLI, 1989). O tumor desenvolve-se na forma sólida desde que seja inoculado por via subcutânea ou intramuscular em camundongos (MATSUZAKI et al., 2003) e cresce na forma ascítica quando inoculado por via intraperitoneal (DAGLI, 1989; RIZZO, 2000; BERGAMI-SANTOS et al., 2004; MATSUZAKI et al., 2004). O termo ascite (do grego *askites*, que significa bexiga, barriga ou bolsa) é definido como sendo o acúmulo de líquido na cavidade peritoneal (HAUSBERGER et al., 2001).

Historicamente, os primeiros relatos de transplante de neoplasias datam de 1773 quando Peyrilhe inoculou material extraído de neoplasias mamárias humanas sob a pele de cão. Devido à grande facilidade de manuseio experimental, o tumor de Ehrlich tem sido extensamente aplicado à Oncologia Experimental. Dos inúmeros tumores experimentais utilizados para estudo “in vivo” em animais, o uso de tumores transplantáveis na forma ascítica tem sido um recurso útil pelas seguintes razões: facilidade na padronização do número de células a serem inoculadas; quantificação do crescimento e regressão da massa tumoral e também porque permitem o estudo comparativo com os mesmos métodos desenvolvidos para a pesquisa de células na corrente sanguínea e demais fluidos corporais (DAGLI et al., 1989; SAAD-HOSSNE et al., 2004).

Após inoculação de fluido ascítico fresco contendo cerca de um milhão de células neoplásicas, os camundongos acumulam cerca de 5 a 20 mL de líquido ascítico viscoso e às vezes hemorrágico em 7 a 14 dias, morrendo em 10 a 20 dias (DAGLI, 1989).

Segundo Sugiura (1965, apud GENTILE, 2001), não há ocorrência de metástases no coração, rins, adrenais, fígado ou baço. Além disso, é sabido que as células do tumor de Ehrlich podem ser inoculadas intravenosamente sendo de grande utilidade nos estudos sobre migração de células e desenvolvimento de metástases, visto que na forma sólida não há ocorrência de crescimento secundário (RIZZO, 2000).

O tumor ascítico de Ehrlich pode ser transplantado para qualquer linhagem de camundongo, provavelmente devido à perda da expressão do MHC. Esta característica exclui o principal papel do linfócito T citotóxico durante o desenvolvimento do tumor, indicando que talvez a imunidade celular não seja o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra o tumor ascítico de Ehrlich (BERGAMI-SANTOS et al., 2004).

Este modelo é utilizado para o estudo de metástases pulmonares tendo como via a disseminação hematogênica (RIZZO, 2000).

A indução experimental dessa neoplasia em camundongos é feita por intermédio do transplante das células tumorais retiradas de um animal já com a neoplasia desenvolvida. Essa inoculação poderá ser feita diretamente na cavidade abdominal do receptor levando ao desenvolvimento da forma ascítica ou no coxim plantar levando à formação do tumor sólido. No 7º dia já é possível observar expressivo crescimento da massa tumoral, a qual continua crescendo e invadindo os tecidos adjacentes até o 30º dia. Logo após a inoculação, observa-se a migração das células para os linfonodos regionais (GENTILE, 2001; BELO et al., 2004).

Histologicamente, a forma sólida do tumor ascítico de Ehrlich apresenta extensas áreas de necrose. Estas são oriundas da morte das células neoplásicas. Intensa atipia e células extremamente anaplásicas são também comumente vistas no tumor. O tumor possui poucas células inflamatórias e estroma escasso. Alto índice mitótico e de invasividade caracterizam essa neoplasia (GABAI et al., 1995; DAGLI, 1989).

Segundo GENTILE (2001) a suspeita de tecido tumoral levantada no exame clínico induz o patologista a identificar no campo microscópico a presença de atipia celular e de células inflamatórias, classificando o tumor em classes (I, II, III, IV e V). A classe I é dada quando há ausência de atipia e quase nenhuma célula inflamatória. Já a

classe V indica que existe intensa atipia celular e grande quantidade de células inflamatórias, característica de neoplasias malignas.

No caso do líquido retirado da cavidade abdominal do camundongo, nota-se grande quantidade de células com características epiteliais exibindo intenso pleomorfismo, hipercromatismo nuclear e alteração da relação núcleo-citoplasma, indicando tratar-se de uma classe V (PAL et al., 2001; DAGLI et al., 2002).

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

DAGLI (1989) relata que as células do tumor ascítico de Ehrlich são de origem epitelial da glândula mamária, portanto são especializadas na produção de lipídeos. Uma desregulação dessa função provavelmente poderia acarretar um acúmulo dessa substância no interior da célula. O tecido tumoral ao exame macroscópico, apresenta-se como uma massa de consistência borrachóide, superfície lisa, formato irregular. Ao se incisar a massa tumoral há a presença de pontos avermelhados e áreas esbranquiçadas, que são, respectivamente, pontos hemorrágicos e áreas de necrose. Há ao redor da massa tumoral uma pseudocápsula, o que justifica seus limites bem definidos quando da visualização da mesma durante a observação cirúrgica.

3.2 SEGUNDA PARTE: BIOQUÍMICA DO CANCER

3.2.1 FLAVONÓIDES

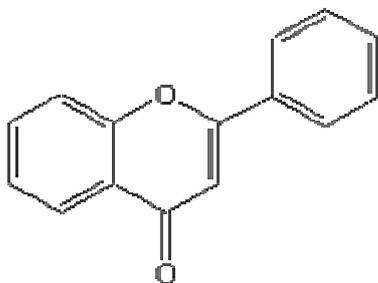
A literatura indica que muitos produtos naturais são estudados como agentes quimioprotetores contra cânceres de ocorrência mundial (REDDY, 2003). Os maiores grupos desses produtos são potentes antioxidantes e fenólicos naturais. Esses produtos naturais são encontrados principalmente em frutas e vegetais (Quadro 1) como também extratos de plantas e ervas (REDDY, 2003). Muitos constituintes de plantas podem ser responsáveis por efeitos protetores. Alimentos derivados de plantas contêm uma grande variedade de fitoquímicos anticancer com grande potencial bioativo que reduz a susceptibilidade ao câncer (BIRT, 2001). Muitos desses constituintes podem ser compostos fenólicos ou polifenólicos como isoflavonas da soja, catequinas do chá, ésteres fenólicos no café, ácidos fenólicos no vinho tinto, quercetina em cebola (REDDY, 2003). Dos muitos anticarcinógenos detectados em plantas comestíveis, os antioxidantes - vitaminas C e E e a pró-vitamina β -caroteno têm recebido uma grande atenção (HANDELMAN, 2001). Flavonóides e isoflavonóides são candidatos promissores na prevenção do câncer (BIRT, 2001).

Quadro 1 - Antioxidantes quimioprotetores de frutas e vegetais.

<i>Fonte</i>	<i>Componente ativo</i>	<i>Mecanismo de ação</i>	<i>Cânceres inibidos</i>
Azeitonas	polifenóis	antioxidante	Vários cânceres
Morangos, melão	Vitamina C, bioflavonóides, chalconas	antioxidante	Vários cânceres
Repolho verde, brócolis, couve-flor	Vitamina C, luteína, zeaxantina	Antioxidante, suprime promoção de tumor de pulmão em ratos	Vários cânceres
Óleos vegetais, óleos quentes de semente, germe de trigo	Vitamina E	Proteção contra peroxidação de lipídios	Câncer de pele
Vegetais e frutas amarelo-alaranjado	β -caroteno	Antioxidante	Câncer de mama, cólon, célula do fígado em camundongos
Cenouras	β -caroteno e compostos fenólicos	Antioxidante, expressão do gene p52	Leucemia, câncer de pulmão
Tomate	Licopeno, vitamina C	Potente antioxidante, inibe danos ao DNA	Vários cânceres
Uvas, vinho tinto, frutas cítricas	Fenóis, catequinas, β -criptoxantina, bioflavonóides, chalconas, vitamina C	Antioxidante, estimula expressão do gene p- 53	Vários cânceres
Alho, cebola, alho- porró, cebolinha	Alicina, flavonóides, vitamina C, selênio	Detoxificam carcinógenos, inibe H. piloni	Câncer de estômago
Feijão	Compostos fenólicos	Antimutagênico	Câncer induzidos por aflatoxina.

Fonte: REDDY, 2003.

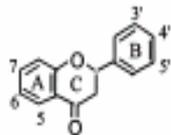
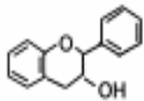
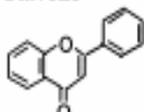
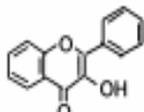
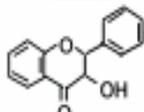
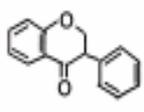
Os flavonóides são metabólitos secundários de plantas e definidos quimicamente como substâncias compostas por uma estrutura comum de fenilcromanona ($C_6-C_3-C_6$) com substituição em uma ou mais hidroxilas, incluindo derivados (BIRT, 2001). (Figura 2, Quadro 2)



Fonte: www.ucm.es/.../Farmacognosia-I/Tema14.htm

Figura 2 – Estrutura básica de fenil-benzo- γ -pirona.

Quadro 2- Estrutura química de certos flavonóides de ocorrência em plantas.

Formula estrutural	Flavonóides representativos	Substituições					
		5	6	7	3'	4'	5'
Flavanone							
	Eriodictol Hesperidina Naringenina	OH OH OH	H H H	OH OH OH	OH OH H	OH OMe OH	H H H
Flavanol							
	Catequina galocatequina	OH OH	H H	OH OH	OH OH	OH OH	H OH
Flavone							
	Apigenina Crisina Luteolina	OH H OH	H H H	OH OH OH	H H OH	OH H OH	H H H
Flavonol							
	Kaempferol Miricetina Ouercetina	OH OH OH	H H H	OH OH OH	H OH OH	OH OH OH	H OH H
Flavanonol							
	Taxifolina	OH	H	OH	OH	OH	H
Isoflavone							
	Daidzeína Genisteína Gliciteína Formononetina	H OH OH H	H H OMe H	OH OH OH OH	H H H H	OH OH OH OMe	H H H H

Fonte: BIRT, 2001.

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

Os Flavonóides e Isoflavonóides ocorrem comumente como éster, éter ou derivados glicosídicos ou ainda uma mistura deles (BIRT, 2001). Mais de 6000 diferentes flavonóides têm sido descritos (MARCHAND, 2002; YANG, 2001). Em humanos e animais, flavonóides e isoflavonóides ocorrem somente através da ingestão dietética (BIRT, 2001). Os flavonóis são os mais abundantes flavonóides em alimentos. A quercetina, kaempferol e mirecetina compõem os três mais comuns flavonóis. Flavanonas são encontradas principalmente em frutas cítricas e flavones em aipo. Catequinas estão presentes em grande número de chás verde e preto e vinho tinto, antocianinas são encontradas em morangos. Isoflavonas são encontrados quase exclusivamente em comidas derivadas da soja (MARCHAND, 2002).

O termo fenol ou polifenol pode ser definido como sendo uma substância que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilas e/ou derivados funcionais como ésteres, metoxilas, glicosídeos e outros (SIMÕES et al, 2000).

Os flavonóides representam um grupo importante e diversificado entre os produtos de origem vegetal. A distribuição dos flavonóides nos vegetais depende de diversos fatores como fila/orem/família do vegetal, bem como da variação das espécies. Geralmente, flavonóides encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, nos galhos, raízes e frutos (SIMÕES et al, 2000).

Os flavonóides glicosilados são usualmente absorvidos por difusão passiva e convertidos em agliconas (MARCHAND, 2002) por glicosidases presentes em alimentos ou da mucosa gastrintestinal, ou da microflora do cólon (YANG, 2001). Após sua absorção, os flavonóides são conjugados no intestino delgado e no fígado por reações de glicuronidação, sulfatação ou metilação ou metabolizados a pequenos compostos fenólicos (MARCHAND, 2002; YANG, 2001). Ao sofrer essas modificações, podem se tornar metabolicamente mais ativos ou serem eliminado do organismo mais facilmente por se tornarem mais polares.

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

3.2.2 - RELAÇÃO ENTRE FLAVONÓIDES E CÂNCER

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

Os flavonóides quercetina, kempferol e galangina e o flavone apigenina estão associados com a inibição do citocromo P450 (MARCHAND, 2002).

Vários flavonóides como, por exemplo, quercetina, apigenina e catequinas mostraram atividade antiinflamatória por inibirem cicloxigenase-2 (COX-2) e induzir a óxido nítrico sintase. Inflamações crônicas estão relacionadas na etiologia de um grande número de cânceres e inibidores da COX-2 estão sendo estudados como agentes quimioprotetores contra câncer de cólon (MARCHAND, 2002; YANG, 2001).

Atividades antiproliferativas têm sido relacionadas com propriedades anti-estrogênicas de certos flavonóides (isoflavonóides, quercetina). Genisteína e quercetina inibiram a proteína tirosina quinase que está envolvida na proliferação celular. A apigenina, luteolina e quercetina estão relacionadas com a inibição do ciclo celular e apoptose por mecanismo dependentes de p-53.

Muitos dos efeitos biológicos dos fitoestrógenos, incluindo alguns flavonóides, incluem inibição da angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos que ocorre como parte do crescimento e expansão de tumores malignos); inibição da tirosina quinase (que é responsável pela fosforilação de proteínas requeridas para regulação da função celular, incluindo divisão celular), inibição da enzima topoisomerase e outras enzimas

envolvidas na transdução de sinais. Genisteína, um flavonóide pesquisado, também inibe a autofosforilação do receptor do fator de crescimento epidérmico, que possui uma grande expressão na maioria dos tipos de câncer. Age também como antioxidante prevenindo danos oxidativos ao DNA (MISHRA, 2003).

O quadro 3 mostra alguns fitoquímicos associados com a prevenção do câncer.

Quadro 3 – Fitoquímicos associados com a prevenção do câncer.

Classe fitoquímicos	Compostos típicos	Fontes alimentares	Atividades relacionadas com a prevenção do câncer
Carotenóides	Alfa e beta caroteno, licopeno, luteína	Vegetais e frutas verde escuro, vermelho e amarelo	Atividade antioxidante, modulação do metabolismo do carcinógeno, inibição da proliferação celular, da expressão do oncogene, benefício no sistema imune.
Polifenóis	Ácidos fenólicos, curcumina, quercetina, apigenina, naringenina, hesperidina, catequinas, resveratrol	Vegetais e frutas	Inibe proliferação celular, induz apoptose, inibe passos de transdução de sinais, aumenta a resposta imune
Fitoestrógenos	Isoflavonas	Produtos derivados da soja	Altera o metabolismo estrogênico, diminui a atividade de tirosina quinase, induz apoptose,
Terpenos	Monoterpeno	Vegetais e frutas	Aumenta a atividade das enzimas da fase II, induz apoptose.

Fonte: GREENWALD, 2001

A seguir estão alguns dos mecanismos de ação em que os flavonóides podem atuar como possíveis agentes anticarcinogênicos.

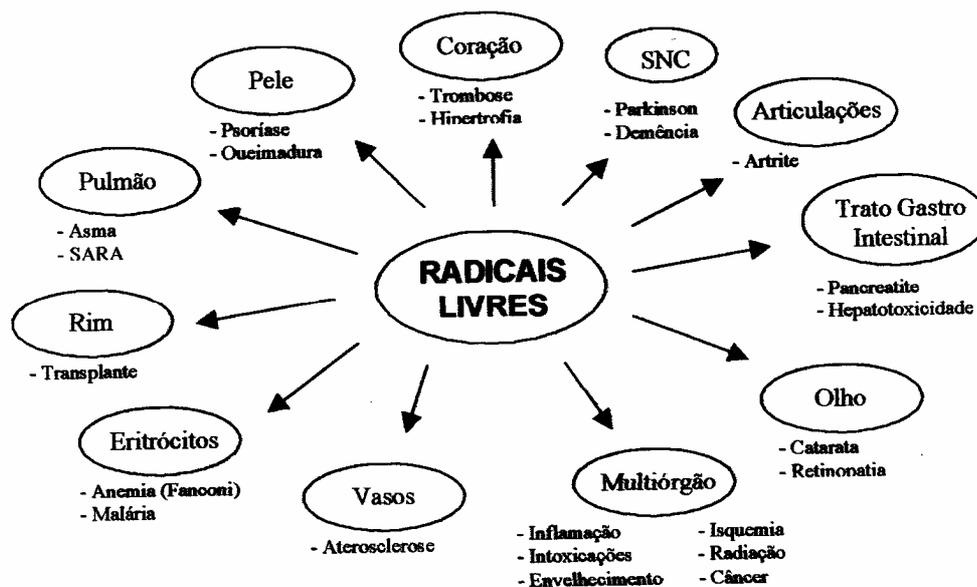
3.2.3. AÇÃO ANTIOXIDANTE

O oxigênio, indispensável para a vida, pode resultar em danos reversíveis ou até irreversíveis quando os seres vivos são expostos a ele em concentrações superiores à encontrada na atmosfera e quando eles sofrem modificações, podendo inclusive levar à morte celular. Por isso, com a evolução dos seres vivos no planeta, surgiram mecanismos para combater esses efeitos deletérios. São os mecanismos antioxidantes: enzimáticos e não enzimáticos (MANSON, 2003).

É difícil fazer uma medição direta da oxidação nos componentes celulares devido a sua alta reatividade, porém é possível fazer uma determinação indireta pelos efeitos por eles causados, através da oxidação dos lipídios, dos grupamentos sulfidril das proteínas, das bases púricas e pirimídicas, o que leva a uma alteração no DNA e no balanço tiol/dissulfeto (BASU, 1999).

Os radicais livres então, podem ser definidos como qualquer espécie química capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, sendo assim, altamente reativos e capazes de atacar qualquer biomolécula além de possuírem meia vida curta. A formação desses compostos é determinada pela perda ou ganho de um elétron ficando com um elétron desemparelhado. A formação destas espécies reativas de oxigênio (ROS) ocorre durante os processos oxidativos biológicos, sendo assim, formados fisiologicamente nos sistemas biológicos a partir de compostos endógenos (MARRONI, 2002).

Há muitas evidências dos ROS em doenças degenerativas como ocorre na catarata, enfisema, artrite, doença de Parkinson, diabetes, mutação, CANCER e envelhecimentos como mostrado na figura 3.



Fonte: BASU, 1999

Figura 3 – Doenças associadas à ROS

Para evitar os danos causados pelos ROS, o organismo desenvolveu vários mecanismos de defesa, isto é, potenciais de neutralização das ações dos radicais livres, chamados de ANTIOXIDANTES.

O mais efetivo passo na prevenção do câncer é bloquear a sua iniciação, como por exemplo, prevenindo o dano ao DNA como resultado dos ROS ou carcinógenos (MANSON, 2003).

Estudos epidemiológicos têm mostrado a correlação entre consumo elevado de compostos fenólicos (flavonóides) e redução do risco de doenças cardiovasculares como também redução de certos tipos de câncer (FERGUSON, 2001). Tem-se mostrado que muitos desses estudos mostram o efeito protetor dessas substâncias (HOLLMAN, 1997).

É de considerável interesse as substâncias químicas (principalmente naturais) em que podem proteger contra os ROS (SURH, 2003).

Flavonóides como flavonas, flavonols e isoflavonas têm ganhado uma atenção particular devido ao potencial protetor contra o câncer (CAI, 1997). Os flavonóides mais frequentemente estudados são quercetina, luteolina, kaempferol, apigenina e genisteína. Os mecanismos em que eles possuem efeitos na prevenção do câncer não estão totalmente envolvidos (WILLIAMS, 2004). Muitos estudos sugerem que os

flavonóides podem agir como antioxidante. ROS são conhecidos por causar dano oxidativo em moléculas como DNA e lipídios. Peroxidação de lipídios e oxidação de bases do DNA são considerados importantes marcadores biológicos no desenvolvimento do câncer, doenças cardíacas e neurodegenerativas. (YOKOZAWA, 1997). O desenvolvimento e a descoberta de artifícios que reduz o dano oxidativo podem contribuir na prevenção de câncer e outras desordens degenerativas que ocorrem em humanos (CAI, 1997).

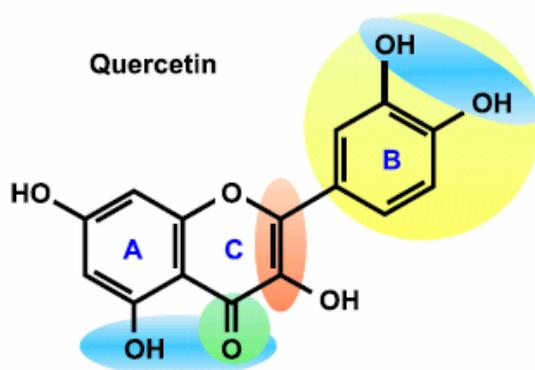
Flavonóides e isoflavonóides podem proteger contra o câncer e/ou doenças cardíacas através da inibição do dano oxidativo (BIRT, 2001). A propriedade antioxidante dos flavonóides faz com que eles tenham a propriedade de inibir vários tipos de câncer (REDDY, 2003).

Numerosos mecanismos de ação para isoflavonóides têm sido sugeridos para inibição do processo de carcinogênese (WATANABE, 2002). Os supostos mecanismos de ação da atividade antioxidante dos polifenóis foi estudada por vários pesquisadores (WILLIAMS, 2004; WEISS, 2003; LAMBERT, 2003). É provável que a atividade antioxidante associada à flavonóides seja a sua habilidade de desativar, inibir a ação dos radicais livres (FERGUSON, 2001). Os polifenóis removem os radicais livres, rompendo a reação em cadeia dos radicais livres na peroxidação de lipídios. (CAI, 1997). Eles também extinguem os ROS e nitrogênios gerados em sistemas biológicos (LAMBERT, 2003). Outro mecanismo antioxidante é que eles quelam metais como ferro e íons cobre, prevenindo a participação deles em reações tipo Fenton na geração de radicais hidroxil altamente reativos (YANG, 2001). Isoflavonas como genisteína e daidzeína têm a habilidade de quelar radicais livres (DJURIC, 2001).

A oxidação do DNA é, provavelmente, a causa mais importante de mutações que potencialmente podem ser reduzidas por antioxidantes dietéticos (BIRT, 2001). O mecanismo protetor de frutas e vegetais e nutrientes antioxidantes parecem envolver os estágios iniciais mais que os finais da carcinogênese (REDDY, 2003).

Quimicamente, os flavonóides são doadores de elétrons. Eles servem como derivados de estruturas conjugadas em anel e grupos hidroxila que tem potencial de ação como antioxidantes em cultura de células ou em sistemas de células livres por eliminarem o ânion superóxido, oxigênio simpleto, radicais peróxido de lipídios e/ou estabilizando radicais livres envolvidos no processo oxidativo através da hidrogenação ou complexação com espécies oxidantes (BIRT, 2001). A atividade antioxidante e a relação estrutura-atividade dos flavonóides têm sido investigadas em muitos sistemas *in*

vitro. (DJURIC, 2001). A atividade antioxidante dos flavonóides tem sido correlacionada ao seu número de grupos substituintes e a posição dos grupos hidroxila (LOO, 2003). Segundo FERGUSON (2001), o grupo de flavonóides com características antioxidantes como a quercetina (figura 4) doa o grupo fenoxila e suas ações biológicas estão relacionadas à relação estrutura-atividade.



Fonte: WILLIAMS, 2004.

Figura 4 – Estrutura química da quercetina

A quercetina, luteolina e genisteína têm mostrado capacidade de inibir o dano oxidativo do DNA induzido por irradiação ultravioleta. (WEISS, 2003). Experimentos com animais sugerem que dietas a base de soja inibem tumores de mama e fígado induzidos por radiação e produtos químicos (WEI, 1995).

A propriedade antioxidante dos flavonóides foi o primeiro mecanismo de ação estudado, em particular com relação ao efeito protetor contra aparecimento de doenças cardiovasculares. (CAI, 1997). Flavonóides foram efetivos em eliminarem os diferentes tipos de moléculas oxidantes, incluindo oxigênio simpleto e vários radicais livres que possivelmente estão envolvidos no dano ao DNA e na promoção do tumor (MARCHAND, 2002).

A atividade antioxidante de substâncias fenólicas e fitoquímicos foi atribuída primeiramente aos grupos hidroxila sendo capazes de doar os átomos de hidrogênio na eliminação dos ROS (LOO, 2003). Essa idéia tem sido desenvolvida principalmente porque H_2O_2 ou produtos da reação com OH, são essências para transdução do sinal e ativação de genes específicos que promovem a proliferação de células cancerosas. Assim, a inativação desses ROS com substâncias fenólicas inibiu esse processo celular e consequentemente a proliferação de células cancerosas (LOO, 2003).

Pesquisas *in vitro* com a genisteína têm demonstrado que esse flavonóide possui propriedades estrogênicas, antioxidantes, inibidores de topoisomerase II, tirosina quinase e angiogênese e indutores da diferenciação celular. Existem estudos em que ela também inibiu o crescimento de linhagens de células de câncer de próstata humana e de ratos (WANG, 2002).

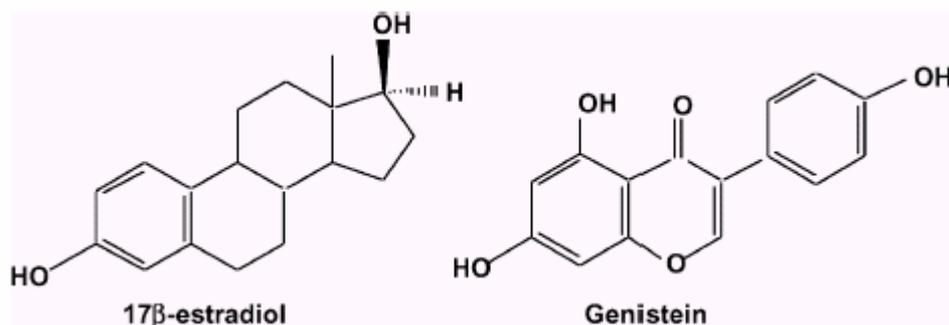
Certos polifenóis induzem a fase II de enzimas de detoxificação como a glutathione transferase (GST), aumentando a excreção de espécies oxidantes ou induzindo as enzimas antioxidantes como as metalotioneína (metal ligado a proteína com atividade antioxidante) (FERGUSON, 2001). Os polifenóis também inibiram a citocromo P450 ou enzimas como cicloxigenase ou lipoxigenase que possuem atividade oxidante (WILLIAMS, 2004).

A habilidade de certos polifenóis de se ligarem a minerais pode ser benéfica em muitos casos, porque cobre e ferro podem iniciar a produção de radicais hidroxila. Por exemplo, ácido tânico inibiu a formação de radicais hidroxila devido a capacidade de complexação com íons ferro. Muitos polifenóis com função antioxidante eliminam os radicais livres e também complexam íons metálicos que são capazes de catalisar a peroxidação de lipídios (WILLIAMS, 2004).

3.2.4. ATIVIDADE ESTROGÊNICA E ANTI-ESTROGÊNICA

Fitoestrógenos, incluindo flavonóides como genisteína, daidzeína tem-se mostrado agonistas estrogênicos em vários modelos animais (BIRT, 2001). Os flavonóides e isoflavonóides testados estão em ordem de estrogenicidade: genisteína > Kampherol > naringenina > apigenina > daidzeína > biochanina A > formononetina > luteolina > fisetina > catequina > hesperidina (BIRT, 2001). Muitas propriedades das isoflavonas como prevenção da osteoporose, retardamento dos sintomas da menopausa, diminuição dos níveis de colesterol podem ser sugeridos como um dos possíveis mecanismos relacionados ao estrógeno (BOERSMA, 2001). Flavonóides e isoflavonóides são metabolizados por bactérias intestinais quando ingeridos (MISHRA, 2003) a estrógenos difenólicos originados de plantas.

Figura 5 ilustra a estrutura química do 17- β -estradiol .



Fonte: BOERSMA, 2001

Figura 5 – Estrutura do 17-β-estradiol e da genisteína

Os isoflavonóides como a genisteína e a daidzeína são fenóis com estrutura não similar ao estradiol humano (figura 5), porém com afinidades ao mesmo receptor. (MISHRA, 2003). Mais de 400 substâncias químicas têm sido descritas como fitoestrógenos, que estruturalmente são derivados do fenil-benzo-pirano (WILLS, 2003).

O potencial estrogênico de todos os flavonóides reportados é da ordem de 10^3 a 10^5 vezes menor que o 17-β-estradiol (MISHRA, 2003; BIRT, 2001).

Todavia, estudos sobre estrogenicidade da isoflavonas *in vitro* e *in vivo* mostraram que a gliciteína foi três vezes mais potente que a genisteína *in vivo*, mas em torno de vinte vezes menos potente que a genisteína *in vitro*. Isso sugere que a biodisponibilidade *in vivo* e *in vitro* podem diferir significativamente (BIRT, 2001). A genisteína também foi eficaz na regulação da expressão de receptores de andrógenos e estrógenos de glândulas prostáticas de ratos quando oferecida em concentrações semelhantes a encontradas na dieta humana rica em soja (WILLS, 2003).

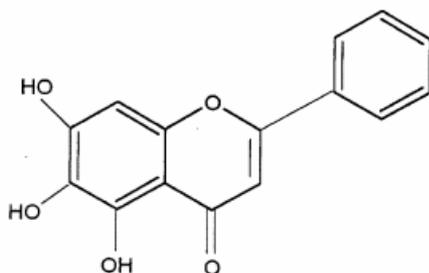
A genisteína e a daidzeína inibem o crescimento de linhagens de células de câncer de próstata e várias enzimas (redutase e aromatase) envolvidas no metabolismo de esteróides (WILLS, 2003).

O papel dos fitoestrógenos na modificação do risco de câncer não pode ser confinado somente em suas propriedades estrogênicas, mas pela mediação de numerosos mecanismos bioquímicos não relatados na atividade estrogênica (MISHRA, 2003).

Fitoestrógenos podem reduzir os efeitos biológicos dos hormônios sexuais e afetar o ciclo menstrual humano. Estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que os fitoestrógenos estimulam a síntese e globulinas ligantes ao hormônio sexual no fígado.

Em adição, fitoestrógenos promovem o prolongamento do ciclo menstrual humano (MISHRA, 2003).

A baicaleína (figura 6) é uma flavona extraída da planta *Scutellariae radix*, um ingrediente do chá de ervas. Seu efeito contra o câncer está sendo documentado em câncer de próstata e hepático. É também agente antioxidante, antiinflamatório e inibidor de prostaglandinas E₂ (POO, 2002).



Fonte: POO, 2002.

Figura 6 – Estrutura química da baicaleína

Segundo STRAUSS (1998) os mecanismos de ação dos fitoestrógenos podem ser divididos em três grupos:

1- Ação relacionada ao receptor de estrógeno (ER) resultando em efeitos estrogênicos ou antiestrogênicos. Muitos estudos *in vitro* indicaram que vários fitoestrógenos agem similarmente aos estrógenos esteroidais. Eles se ligaram aos receptores de estrógenos, induziram genes (gene p-53), e suas ações podem ser bloqueadas pelos antiestrógenos (SHIRAI, 2002). Fitoestrógenos são geralmente mais fracos que estrógenos esteroidais endógenos, e sugere-se que eles ajam como antiestrógenos pela competição com estrógenos endógenos mais potentes para ligarem aos ERs. Um estudo relatou que fitoestrógenos como a genisteína são bons ligantes aos ERs (FRITZ, 2002). Fitoestrógenos possuem uma afinidade maior de ligação a um subtipo do receptor - ER_β. (SHEIKE, 2003).

2 – Interação com muitas enzimas chave na produção de esteróides sexuais e efeitos na produção de proteínas ligadoras de esteróides sexuais. Numerosos estudos *in vitro*, relatam que muitos fitoestrógenos inibem muitas enzimas chave na biossíntese de estrógenos e andrógenos. Essas incluem 17-β-hidroxiesteróide oxidorreductase tipo 1 e 2, aromatase e 5-α-redutase. Em adição, já está sendo demonstrado que fitoestrógenos

estimulam a produção de hormônio sexual ligado a globulina *in vitro*. Em teoria é sugerido que fitoestrógenos podem modular a produção de hormônio sexual ligado a globulina *in vitro*. (STRAUSS, 1998).

3 – Ações não-hormonais. Muitos fitoestrógenos têm sido relatados em exercer várias ações (efeitos) que não estejam relacionados ao ER. Esses efeitos incluem atividade antiproliferativa, inibição da tirosina quinase, proteína quinase C, DNA topoisomerase II, atividade antioxidante, inibição da angiogênese. (STRAUSS, 1998).

3.2.5. AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA

Vários flavonóides (quercetina, apigenina, catequinas) têm sido estudados por possuírem atividade antiinflamatória inibindo a ciclooxigenase-2 (COX-2) e induzindo a óxido nítrico sintase. (FERGUSON, 2001). A ciclooxigenase -2 é uma enzima que catalisa a formação de prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico. COX-2 e sua isoenzima COX-1 estão envolvidas também na indução da angiogênese de cultura de células endoteliais. A overexpressão de COX-2 tem sido implicada na tumorigênese de cânceres de cólon, reto, estômago, pulmão, mama e cabeça e pescoço. A atividade de COX tem conferido várias vantagens na transformação de células através da inibição de apoptose, diminuição da proliferação celular, redução da adesão célula-célula, aumento da aderência de células a matrix extracelular e a indução da angiogênese. Além disso, a formação de prostaglandina E₂ é catalisada por COX-2 e induz a síntese de fatores de crescimento angiogênicos como VEGF (fator de crescimento vascular epidérmico). COX-2 também modula atividade de peptídeos regulatórios de crescimento, como TGF- β (SHARMA, 2001). A inflamação crônica é um passo importante na etiologia do câncer e inibidores de COX-2 têm sido estudados como agentes quimioprotetores contra câncer coloretal (MARCHAND, 2002). A quimioprevenção é considerada um dos propósitos mais promissores na prevenção de cânceres humanos (SAKATA, 2003).

A hesperidina é um flavonóide de ocorrência natural encontrado em frutas e vegetais; e quando sozinha ou combinada com diosmina exercem ação anticarcinogênica em modelos animais para câncer de língua, intestino, esôfago e bexiga (WILLIAMS, 2004). Estudos também indicam que alguns tipos de flavonóides incluindo a hesperidina possuem atividade antiinflamatória (SURH, 2003). Atualmente, Daflon 500mg, um flavonóide purificado contém 90% de diosmina e 10% de hesperidina e possui uma proteção contra tratamento antiinflamatório e insuficiência venosa; e existe uma possível correlação entre efeito antiinflamatório e atividade quimioprotetora de hesperidina (SAKATA, 2003).

Várias publicações indicam associação positiva entre inflamação crônica e risco de câncer (WILLIAMS, 2004; SURH, 2003; SAKATA, 2003). Recentes estudos mostram que enzimas como COX-2 e/ou óxido nítrico sintase (iNOS) em associação com resposta inflamatória podem ter um papel central na carcinogênese (SURH, 2003). Expressão de COX-2 em células epiteliais ou intestinais como os macrófagos é induzida por estímulo inflamatório como endotoxina de lipopolissacarídeo, e alta expressão da proteína COX-2 tem sido observada em macrófagos intersticiais em adenomas colônicos de humanos e animais (SAKATA, 2003).

Um estudo documentou que a expressão e atividade de iNOS, que é localizado predominantemente em macrófagos é elevado em adenomas de cólon e adenocarcinomas humanos, sugerindo sua participação em carcinogênese. Muitos estudos prévios sugerem que a hesperidina podem modular a síntese de prostaglandinas, a expressão e atividade enzimática de COX-2 ou iNOS. (FERGUSON, 2001). A hesperidina inibiu a expressão e atividade de isoformas de COX e iNOS em macrófagos celulares. O efeito da inibição da hesperidina pode ser relatado com eficácia antiinflamatória e anticarcinogênica (SAKATA, 2003).

ETHERTON (2002) relatou que compostos fenólicos possuem efeito antitrombótico que aparece como resultado da antiagregação plaquetária, redução da síntese de mediadores pró-trombóticos e pró-inflamatórios, diminuindo a expressão de adesão molecular. Existem também muitas evidências que os polifenóis podem modular a produção de óxido nítrico pelo endotélio vascular, resultando em vasorelaxamento.

Compostos fenólicos podem inibir a atividade de ciclooxigenase, reduzindo a agregação plaquetária e tendência à trombose (ETHERTON, 2002). Quercetina inibiu a agregação plaquetária *in vitro* e reduziu síntese de tromboxano *in vivo* (FERGUSON, 2001).

Regulação inapropriada de COX-2 e iNOS tem sido implicada na fisiopatologia de certos tipos de cânceres humanos devido a uma desordem inflamatória (SURH, 2003). Desde que a inflamação esteja claramente ligada a promoção do tumor, substâncias com potente atividade antiinflamatória podem exercer efeitos quimioprotetores na carcinogênese, particularmente no estágio de promoção (SAKATA, 2003).

Os fitoquímicos quimioprotetores exercem distintos mecanismos moleculares que incluem inibição da expressão de iNOS e subsequente bloqueio da produção de óxido nítrico, indução da fase-2 de detoxificação de enzimas, eliminação de radicais livres, indução da apoptose e etc. (SURH, 2003).

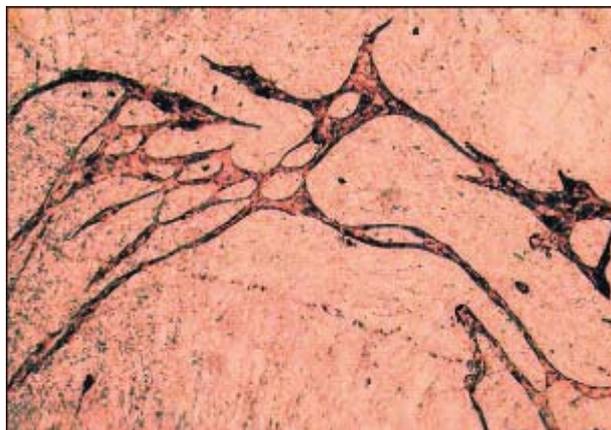
A produção elevada de óxido nítrico em condições inflamatórias crônicas levam a uma geração de peroxinitrito, conhecidos como aldeídos e epóxidos derivados da peroxidação lipídica. Essa inflamação crônica pode levar a uma instabilidade genômica (FERGUSON, 2001). Uma variedade de polifenóis pode exercer efeitos na função imune e inflamatória das células.

Certos polifenóis podem afetar (usualmente inibindo) processos secretórios, mitogênese, interações célula-célula, incluindo efeitos possíveis na adesão molecular e função (WILLIAMS, 2004).

3.2.6. ANGIOGÊNESE

Segundo CAO (2002), a angiogênese é um processo de crescimento de novos vasos sanguíneos (figura 7), e está envolvido na fisiologia e patologia de processos como desenvolvimento embrionário, ciclo reprodutivo, crescimento de tumor e metástase, retinopatia diabética e inflamação crônica (SHARMA, 2001). Assim, a supressão anormal da angiogênese pode prover estratégias terapêuticas no tratamento de desordens dependentes da angiogênese. Um grande número de inibidores endógeno da angiogênese tem sido identificados e produzem efeitos dramáticos no crescimento de tumores e metástase em modelos animais. (ARBISER, 2004). A indução do processo de angiogênese é caracterizada pela degradação da membrana basal vascular, migração do endotélio celular, proliferação e formação dos túbulos. Segundo SHARMA (2001), a angiogênese é crítica na transição entre lesões pré-malignas no estado proliferativo a fenótipos malignos, que levam ao crescimento do tumor e formação de metástases. O

crescimento de tumores sólidos e metástase são dependentes da angiogênese do tumor (IGURA, 2001).



Fonte: SHARMA, 2001

Figura 7 – Crescimento de túbulos, representado a formação de vasos imaturos.

Há mais de 30 anos, Dr. Judah Folkman levantou a hipótese que o crescimento do tumor e metástases eram dependentes do grau de neovascularização (CAO, 2002). A partir de então, muitos estudos experimentais realizados em modelos animais surgiram para provar essa hipótese. Quando um pedaço de tecido de tumor foi implantado em uma córnea de coelhos, o tumor implantado obteve um crescimento exponencial linear quando novos vasos sanguíneos cresceram ao redor do tecido do tumor (ARBISIER, 2004).

A angiogênese permite que os tumores cresçam até 1-2mm de diâmetro, invadindo tecidos circunvizinhos e indo até sítios distantes no corpo (metástase). O aumento da vascularização precede a neoplasia (SHARMA, 2001).

Uma alternativa apropriada para o estudo da angiogênese envolve fatores de crescimento necessários para a formação de novos vasos sanguíneos. Em doenças malignas estabelecidas, fatores de crescimento angiogênicos podem ser liberados diretamente, através das células do próprio tumor, ou indiretamente, via recrutamento de outras células como macrófagos e células endoteliais (SHARMA, 2001). A liberação inicial dessas substâncias ou a evidência da formação de complexos entre fatores de crescimento angiogênicos e receptores de alta-afinidade pode ser chamado de “trocas” angiogênicas. Esse estágio pode ser induzido por vários processos, incluindo hipoxia. A capacidade de células malignas de induzir angiogênese está associada com a produção de fatores de crescimento, e concentração sanguínea periférica que pode estar

relacionada com MVD (densidade de microvasos) em muitos tumores primários (SHARMA, 2001).

A expressão de fatores de crescimento angiogênicos pode aumentar em tecidos preneoplásicos, embora a interpretação de resultados experimentais seja complicada pela expressão constitutiva de fatores de crescimento do epitélio normal e da expressão da doença aguda. Em ratos, com câncer quimicamente induzido, a concentração do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é aumentado em uma simples hiperplasia. A produção de VEGF pode ser o passo limitante no desenvolvimento de lesões pré-malignas (SHARMA, 2001).

O consumo de dietas baseadas em plantas podem ser benéficas na diminuição dos riscos do aparecimento e progressão de doenças relacionadas com angiogênese, incluindo câncer, retinopatia diabética e artrite reumatóide. Recentemente muitos polifenóis extraídos de plantas mostraram ser potentes inibidores da angiogênese (CAO, 2002).

Muitos polifenóis têm o efeito de inibir o crescimento de tumor em animais experimentais. Esses estudos sugerem que os polifenóis pode ser um grupo importante de compostos naturais terapêuticos no tratamento de desordens dependentes da angiogênese (GOSSLAU, 2004)

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

Segundo CAO (2002), a nível molecular esses polifenóis inibidores, suprimem o crescimento de receptores de ativação do fator ativado, proteína quinase C (luteolina, resveratrol, quercetina), tirosina quinase (genistéina), fosfoinositideo-3-quinase luteolina, quercetina) e receptor do fator de crescimento epidermal S6 quinase (genistéina, Kaempferol) (IGURA, 2001). Eles bloqueiam a função regulatória do ciclo celular como quinases dependentes de ciclina (CDK) e manutenção do tumor e estágios quiescentes de células endoteliais (GOSSLAU, 2004). Outro mecanismo inibitório dos flavonóides inclui a inibição da proteína mitogênio-ativada (MAP) quinase e regulação de repressores do ciclo celular com p21(CAO, 2002).

Efeito antioxidante está recentemente ligado a antiangiogênese. Redução de estresse oxidativo pelos polifenóis pode levar ao bloqueio de formação de espécies de oxigênio reativo (ROS). Alterações no equilíbrio redox das células, resultam na ativação de fatores de transcrição que regulam a expressão de níveis de fatores angiogênicos-chaves, VEGF (CAO, 2002).

Genisteína inibe a fosforilação de tirosina quinase. Estudos *in vitro* e *in vivo* descrevem efeitos quimioprotetores dessa isoflavona. Genisteína e daidzeína inibem a proliferação celular do tumor *in vitro*. Em comparação com a genisteína, a daidzeína possui um efeito inibitório menor (GOSSLAU, 2004). De acordo com CAO (2002), a genisteína está associada com a inibição da angiogênese em tratamento de cânceres de próstata e mama. Entre os efeitos descritos da genisteína, os mecanismos antiangiogênicos envolvem baixa-regulação de MMP-9 VEGF, assim como alta regulação de inibidores teciduais de metaloproteinases, que levam a redução da invasão celular do tumor e crescimento dos vasos sanguíneos.

A apigenina inibe o crescimento de vasos linfáticos em adenocarcinoma intestinal quimicamente induzido. Mecanismo antiangiogênico da apigenina envolve a inibição das hialuronidase, resultando na diminuição da produção e clivagem de ácido hialurônico, que estimulam a angiogênese. (CAO, 2002).

O efeito antitumor está relacionado ao aumento da apoptose, redução da proliferação celular do tumor e diminuição da densidade vascular.

3.2.8 - ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS NUTRICIONAIS

Há mais de duas décadas, estudos epidemiológicos estão investigando a relação entre o consumo de flavonóides e o risco de câncer entre a população (SURH, 2003). Segundo FRITZ (2002), alguns dados epidemiológicos indicam uma incidência e mortalidade por câncer de próstata menor na população asiática comparada com americanos e europeus. Essa diferença pode estar diretamente relacionada aos hábitos alimentares da população asiática. Inúmeros estudos epidemiológicos estão sendo realizados na tentativa de evidenciar a relação entre dieta e incidência de câncer, por exemplo, evidências suportam a relação inversa entre risco de câncer e ingestão de vegetais e frutas. Outros trabalhos sugerem a relação inversa entre risco de câncer e consumo de vegetais, frutas, cereais e grãos de uma maneira geral, fibras dietética,

certos micronutrientes, certos tipos de gordura (ácidos graxos ω -3) e também hábitos de vida, como prática de atividade física (GREENWALD, 2001). Porém, existe uma relação direta entre risco de câncer e ingestão de gorduras (principalmente gordura saturada, álcool e obesidade) (GREENWALD, 2001; FRITZ, 2002).

Muitos estudos epidemiológicos reportam efeitos na saúde humana sobre o consumo de alimentos ricos em soja, no que se refere à prevenção de câncer relacionado ao hormônio estrógeno (ex: mama), a diminuição dos sintomas da pré-menopausa e também na prevenção de osteoporose (WATANABE, 2002). Um estudo epidemiológico em Singapura e Japão mostrou que existe uma redução do risco de câncer de mama quando existe um alto consumo de produtos derivados da soja (MARCHAND, 2002).

Muitas evidências têm sugerido que modificações no estilo de vida podem diminuir risco de câncer como redução da ingestão de gorduras, principalmente de origem animal, aumento da ingestão de fibras, incluindo variedade de vegetais e frutas, prática de atividade física, manutenção do peso ideal, consumo moderado de bebida alcoólica e minimizar consumo de sal e comidas defumadas (PLATZ, 2000).

Estudos epidemiológicos têm consistentemente mostrado a inversa associação entre consumo de frutas e vegetais e risco de câncer humano em diferentes sítios (TEMPLE, 2003). São muitos mecanismos plausíveis em que vegetais e frutas podem prevenir carcinogênese. (BIRT, 2001).

Um grande estudo realizado na Finlândia, entre 1967-1991, investigou a associação entre consumo de flavonóides e risco de câncer. Este estudo concluiu que existe um efeito protetor dos flavonóides contra as doenças cancerígenas (BIRT, 2001).

Um outro estudo recente, investigando o consumo de flavonóides entre mulheres espanholas comprovou que a ingestão de quatro flavonóides (quercetina, kampherol, miricetina e luteolina) e específicos carotenóides (alfa-caroteno, beta-caroteno, luteína e licopeno) reduzem a incidência de câncer de pulmão na população estudada (BIRT, 2001)

Evidências epidemiológicas sugerem proteção contra uma larga variedade de cânceres, particularmente do trato respiratório e digestivo (HANDELMAN, 2001), incluindo também câncer de boca, faringe, esôfago, pulmão, estômago, cólon e reto (GREENWALD, 2001).

3.2.7. OUTROS MECANISMOS

BIRT (2001) descreve a proliferação celular desregulada como um marcador de aumento da susceptibilidade à neoplasia. Prevenção do câncer geralmente está associada com inibição, reversão ou retardamento da hiperproliferação celular. Já é bem conhecido que flavonóides dietéticos e isoflavonóides têm demonstrado inibir a proliferação de linhagens de células cancerosas humanas.

Flavonóides e isoflavonóides podem inibir o ciclo celular e induzir a apoptose, linhagens de células cancerosas onde as células estavam em divisão, quando tratadas com flavonóides e isoflavonóides tiveram uma desestruturação nos check-points G1/S e G2/M. (WILLIAMS, 2004). Quercetina bloqueia o ciclo celular em G1/S de células cancerosas de cólon. Ela também induz apoptose, resultado da fragmentação nuclear, condensação da cromatina nuclear. (REDDY, 2003). MARCHAND (2002), descreveu que em modelos *in vitro*, flavonóides tem mostrado afetar sinalização celular e a progressão do ciclo celular. Genisteína e quercetina inibem a proteína tirosina quinase que também está envolvida na proliferação celular. Apigenina, luteolina e quercetina mostraram-se eficazes no processo de morte celular, impedindo a progressão do ciclo celular através do mecanismo dependente de p-53. Estudos demonstram que a genisteína age sinergicamente com ácido eicosapentanóico inibindo a proliferação de células de câncer humano *in vitro*. Nesse estudo genisteína inibiu a proliferação de células pancreáticas cancerosas *in vitro* através da modulação da síntese de DNA pela alteração da oxidação da glicose. Essa ação necessita de estudos futuros, mas representa meios para explicar como a genisteína pode inibir o crescimento do tumor (REDDY, 2003).

Um outro mecanismo proposto de proteção contra o câncer pelos flavonóides inclui a indução da fase II de detoxificação de enzimas na célula. Modificação da detoxificação de enzimas celulares pode ser o maior mecanismo protetor contra carcinógenos químicos. Muitos carcinógenos são frequentemente metabolizados a carcinógenos pelas enzimas da fase I, como citocromo P450 que catalisa reações oxidativas (BIRT, 2001). Os flavonóides quercetina, Kaempferol e galangina e flavona apigenina tem mostrado inibir a citocromo P450, da família CYP1A. Essas enzimas possuem um grande papel na ativação de carcinógenos humanos. Quercetina e naringina também têm mostrado inibir CYP3A4, que é a mais abundante enzima da citocromo

P450 no fígado (MARCHAND, 2002). Os metabólitos oxidados são potencialmente carcinógenos xenobióticos que são detoxificados por enzimas metabolizadoras fase II dentro de formas que são relativamente inerte e excretadas mais facilmente. Estudos animais e *in vitro* têm mostrado que catequinas aumentam a atividade detoxificante e enzimas antioxidantes como glutathiona redutase, glutathiona peroxidase, glutathiona-S-redutase, catalase e quinina redutase (MARCHAND, 2002).

O conhecimento da função da função da resposta imune pelos antioxidantes dietéticos pode ser benefício na prevenção do câncer. Desde que células fagocitárias produzem ROS como parte da defesa do corpo contra infecção, ingestão adequada de antioxidantes é requerida para prevenir danos pelos oxidantes das próprias células imunes (CAO, 2001).

Quercetina injetada intraperitonealmente a uma concentração de 150mg/kg/dia reduziu o crescimento de dois tipos de câncer de próstata em camundongos. Isoflavonas, ácido fenólico e genisteína inibiram câncer de bexiga também em camundongos (REDDY, 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

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

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

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

- 3^o experimento: foram estudados os flavonóides quercetina, ipriflavona em cultura de células tumorais (TAE), *in vitro*, com posterior inoculação das células tratadas com os respectivos flavonóides em camundongos.

4.1 – Animais

Para realização do presente estudo foram utilizados 202 camundongos da raça BALB/c, fêmeas, com aproximadamente sete semanas de idade e pesando entre 20 a 25g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Durante o período de realização do estudo, os animais permaneceram em sala experimental do Laboratório de Biofármacos da UFV, alojados em caixas de policarbonato, com período de 12 horas claro-escuro, temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade de 45-65%. Os animais permaneceram durante 5 dias, no referido laboratório,

em período de adaptação antes de iniciar os tratamentos. No período de experimentação os animais receberam água e ração comercial balanceada (Labina[®]) *ad libitum*.

4.2 – Obtenção e Transplante das células do Tumor Ascítico de Ehrlich

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

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

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

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

4.3 – Protocolos dos Experimentos

O trabalho foi dividido em três etapas distintas, onde na primeira etapa foi feito um estudo de prevenção com os flavonóides, na segunda etapa, um estudo de tratamento com os flavonóides sobre o TAE e na terceira, tratamento das células tumorais com flavonóides e posterior inoculação em camundongos.

4.3.1 – Uso de flavonóides na Prevenção do Tumor Ascítico de Ehrlich

Nessa primeira etapa, os camundongos foram tratados com uma emulsão (água e óleo mineral, 1:1) de flavonóides que foram administrados por gavagem (figura 8) na concentração de 10 mg/Kg (para os flavonóides quercetina, naringenina e ipriflavona) e 5 mg/Kg de cada na associação de quercetina + naringenina, durante um período de 20 dias como descrito no quadro 5.

Os flavonóides foram obtidos da SIGMA[®].



Figura 8 – Administração dos flavonóides por gavagem.

Quadro 5 – Distribuição dos animais em cada grupo e seus respectivos tratamentos

<i>Grupos</i>	<i>Número de animais</i>	<i>Tratamentos</i>
Grupo 1 – animais normais	12	Ração (R)
Grupo 2 – animais com TAE	14	Ração (R)
Grupo 3 – animais tratados	14	R + Quercetina
Grupo 4 - animais tratados	14	R + Naringenina
Grupo 5 – animais tratados	14	R + Quercetina + Naringenina
Grupo 6 – animais tratados	14	R + Ipriflavona

No 21^o dia após o tratamento diário com os flavonóides, procedeu-se a inoculação das células tumorais do tumor ascítico de Ehrlich ($1,66 \times 10^4$ cel/100 μ L em PBS pH 7,4) por via intraperitoneal conforme a figura 9. Nesse mesmo dia foi suspenso o tratamento com os flavonóides. A escolha da quantidade de células para serem inoculadas, baseou-se em experimentos prévios realizados em nosso laboratório onde constatou que essa quantidade de células induziu o TAE em camundongos.



Figura 9 – Inoculação intraperitoneal de células tumorais.

4.3.2 – Utilização dos flavonóides no tratamento de camundongos com Tumor Ascítico de Ehrlich

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

Os camundongos foram inoculados com as células tumorais do TAE por via intraperitoneal na concentração de $1,66 \times 10^4$ cel/100 μ L em PBS pH 7,4. Após 24 horas de inoculação, iniciou-se o tratamento com os flavonóides na dosagem de 10mg/kg durante 18 dias conforme o quadro 6.

Quadro 6 - Distribuição dos animais em cada grupo e seus respectivos tratamentos

<i>Grupos</i>	<i>Número de animais</i>	<i>Tratamentos</i>
Grupo 1 – animais normais	12	Ração (R)
Grupo 2 – animais com TAE	16	Ração (R)
Grupo 3 – animais com TAE tratados	16	R + Quercetina
Grupo 4 - animais com TAE tratados	16	R + Ipriflavona
Grupo 5 – animais com TAE tratados	16	R + Medicamento Neotaxel [®]

A administração do medicamento Neotaxel[®] ocorreu em dose única por via endovenosa na veia da cauda do camundongo na dosagem de 100mg/m², após 24 horas da inoculação das células tumorais.

O medicamento Neotaxel[®] foi cedido pela empresa Quiral Química do Brasil S.A.

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

Docetaxel é um agente antineoplásico pertencente à família dos taxóides. É preparado por semi-síntese, sendo o seu precursor extraído de uma fonte renovável de folhas de espécies do gênero *Taxus*. É um pó quase branco, com fórmula empírica C₄₃H₅₃NO₁₄ e peso molecular de 807,9.

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

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

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

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

4.4 - Coleta de Sangue, de Líquido Ascítico e remoção do Fígado para análise Histopatológica

Em experimentos prévios realizados em nosso laboratório, verificou-se que utilizando-se $1,66 \times 10^4$ cel/100 μ L do tumor, ocorria a indução do TAE, porém após um período de 18 dias, os animais começavam a morrer espontaneamente. Assim, decidimos que nesse dia os animais sofreriam eutanásia, para que a coleta dos nossos dados não ficasse prejudicada.

Então, após 18 dias da inoculação das células tumorais, os animais sofreram eutanásia e retirou-se o sangue por punção cardíaca com auxílio de uma seringa de 5 mL. As amostras de sangue dos animais foram centrifugadas a $7100 \times g$ durante 15 minutos para obtenção do soro. As dosagens sorológicas de proteínas totais, alanina aminotransferase (ALT ou TGP), aspartato aminotransferase (AST ou TGO) e albumina foram efetuadas no equipamento de dosagens multiparamétrico de Bioquímica (Alizé) utilizando kits da marca BioMérieux[®].

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

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

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

4.5 – Análise do Tempo de Vida

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

O tempo médio de sobrevivência dos animais (MST) e a porcentagem de aumento do tempo de sobrevivência (%ILS) foram avaliados até que o último animal morresse espontaneamente. A %ILS e MST foi calculada usando a equação segundo GUPTA et al (2004):

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

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

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

4.6 – Tratamento com flavonóides de Células do TAE In Vitro

As células tumorais foram obtidas a partir do líquido ascítico como descrito no item 3.2, sendo em seguida ressuspensas em 5 mL de meio de cultura DMEM completo, contendo 10% de soro fetal bovino, 100U de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10U de anfotericina B (SIGMA®). Essas foram mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂ por 72 horas para estabilização das culturas.

Para o tratamento das células tumorais com os flavonóides quercetina e ipriflavona, foram plaqueadas 5,4 x 10⁵ células em um volume final de 3,0 mL de meio DMEM completo, em placa de 6 poços. A quercetina e a ipriflavona foram testadas nas concentrações de 10µM, 100 µM, 500 µM, 1000 µM, 10 mM, 100mM, 500mM. Esses flavonóides foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), sendo feitos dois poços de controle, um contendo apenas o meio DMEM completo e no outro acrescentou-se 100 µL de DMSO. Após 48 horas de permanência em estufa foi realizada a contagem de células utilizando o método de exclusão por azul de tripano.

Através da busca de referências bibliográficas, fez-se um levantamento de várias concentrações de flavonóides para tratar as células do TAE. Diante disso, algumas concentrações dos flavonóides quercetina e ipriflavona foram testadas com o objetivo de avaliar a viabilidade das células do TAE após 48 horas de tratamento. A quantidade de células saqueadas baseou-se em experimentos prévios realizados em nosso laboratório, onde concluímos que 5,4 x 10⁵ células em um volume final de 3,0 mL de meio DMEM completo era o necessário para realização do estudo.

Com o objetivo de sensibilizar as células e não mata-las, foi escolhida a concentração de 100 μ M do flavonóides para que as células fossem tratadas *in vitro* e, então inoculadas em animais saudáveis. Esses animais não receberam nenhum tipo de tratamento com os flavonóides por via oral, apenas ração comercial.

As células do TAE tratadas com 100 μ M de quercetina e ipriflavona foram inoculadas em camundongos conforme o esquema abaixo:

Grupo 1 - 16 animais receberam 1,66 x 10⁴ células tumorais tratadas com quercetina na concentração de 100 μ M;

Grupo 2 - 16 animais receberam 1,66 x 10⁴ células tumorais tratadas com ipriflavona na concentração de 100 μ M.

O tratamento prévio das células do TAE com os flavonóides, para posterior inoculação nos camundongos, teve como objetivo sensibilizar as células, e não matá-las, pois queríamos observar qual seria a reprodução delas quando inoculadas nos animais. Assim, escolhemos a concentração de 100 μ M de ambos os flavonóides, pois conseguimos com tal uma viabilidade de 59% e 35%, para os flavonóides quercetina e ipriflavona, respectivamente.

Após 18 dias de inoculação os mesmos procedimentos descritos nos itens 3.4 e 3.5 foram realizados.

4.7. – Análise Estatística

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

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

5. RESULTADOS

5.1. USO DE FLAVONÓIDES NA PREVENÇÃO DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS

Na tabela 1 são apresentados os níveis médios de proteínas totais de camundongos tratados com flavonóides com posterior indução do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE).

Tabela 1 – Prevenção do TAE pelo uso de flavonóides medidos pelos valores médios de proteínas totais (g/dL)

Tratamento	Proteína totais (g/dL)	
	21 dias	39 dias
G1 = Ração (normal)	57,54 ± 5,53 a	-
G2 = Ração (Câncer)	-	48,66 ± 13,16 b
G3 = Ração + Quercetina	50,08 ± 5,73 Ab	56,18 ± 8,01 Aab
G4 = Ração + Naringenina	48,36 ± 0,98 Ab	73,70 ± 23,16 Aa
G5 = Ração + Quercetina + Naringenina	46,18 ± 8,48 Ab	59,44 ± 18,89 Aab
G6 = Ração + Ipriflavona	59,91 ± 6,77 Aa	46,86 ± 14,83 Ab

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

Em cada tratamento A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

De acordo com os resultados observou-se que no 21º dia os animais tratados com ipriflavona (G6) apresentaram os valores médios de proteínas totais muito próximos do grupo normal. Após o 20º dia os animais sofreram indução do TAE por injeção intraperitoneal das células tumorais e aos 39 dias todos os grupos apresentaram variações nos níveis de proteínas totais, mas estas não foram estatisticamente significativas. Observou-se que grupo de animais tratados com naringenina

apresentaram uma variação no nível de proteína total de $48,36 \pm 0,98$ (g/dL) para $73,70 \pm 23,16$ (g/dL). Quando proteínas totais apresentam variações dessa magnitude isso pode ser um indicativo de danos hepáticos ou renais.

Pode-se observar ainda que esse mesmo grupo apresentou uma concentração de proteína muito maior que o grupo de animais com câncer (G2) e esse aumento foi estatisticamente significativo. Nessa tabela (Tabela 1) observou-se que a prevenção do câncer utilizando os flavonóides permitiu que os grupos 3,5 e 6 mantivessem valores de proteínas totais mais próximos do grupo de animais normais (G1) ao 21º dia.

Assim verificou-se que os diversos tratamentos afetaram diferentemente os níveis de proteínas totais, fato importante considerando que a maioria delas é sintetizada pelo fígado. Elas são o principal componente do tecido muscular, dos hormônios e enzimas, e correspondem aos anticorpos, elementos de defesa orgânica do animal contra doenças. As reduções nos níveis plasmáticos das proteínas totais estão associadas a doenças hepáticas ou renais.

De acordo com CHERNECKY, 1993, as proteínas séricas totais refletem a quantidade total de albumina e globulinas no soro. As proteínas séricas sintetizadas no fígado e no sistema retículo-endotelial constituem mais de 100 substâncias diferentes, classificadas como albumina e globulinas. Elas são essenciais para regulação da pressão coloidosmótica e incluem fatores de coagulação, enzimas, hormônios e são responsáveis por crescimento e reparo dos tecidos e tampões de pH, produzem anticorpos, transportam componentes sanguíneos (bilirrubina, cálcio, esteróides, hormônios tireóideos, lipídeos, metais, oxigênio e vitaminas) e são preservadoras dos cromossomos. A deficiência delas provoca crescimento retardado, redução na eficiência de utilização dos alimentos, queda na resistência a doenças entre outras (LIMA, 2003). De acordo com CHERNECKY(1993), uma hiperproteinemia pode ocorrer em desidratação, diarreia, macroglobulinemia, mieloma múltiplo entre outros. Segundo MOTTA (2003) a hipoproteinemia pode ocorrer quando há um aumento do volume plasmático como ocorre em situações de ascite e hemodiluição por intoxicação hídrica. No processo de carcinogênese, diversas proteases são liberadas (colagenases) e suas atividades aumentadas. Desse modo, a degradação de proteínas séricas aumenta, embora formem-se novas proteínas (oncoproteínas).

Na tabela 2 encontram-se registrados os valores médios de Aspartato Aminotransferase (AST) de camundongos tratados com diferentes flavonóides por 20 dias e posterior indução do TAE.

Tabela 2 – Prevenção do TAE pelo uso de flavonóides medidos pelos valores médios de AST (U/mL)

Tratamento	AST (U/mL)	
	21 dias	39 dias
G1 = Ração (normal)	419,78 ± 85,86 b	-
G2 = Ração (Câncer)	-	1588,86 ± 930,83 ab
G3 = Ração + Quercetina	389,78 ± 125,85 Bb	1608,46 ± 976,43 Aab
G4 = Ração + Naringenina	545,66 ± 259,86 Bb	2922,13 ± 1556,54 Aa
G5 = Ração + Quercetina + Naringenina	297,54 ± 35,19 Bb	1559,60 ± 405,08 Ab
G6 = Ração + Ipriflavona	2129,42 ± 634,66 Aa	901,74 ± 576,38 Bc

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

Em cada tratamento A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

No 21º dia observou-se que o grupo tratado com ipriflavona (G6) apresentou maior aumento no nível de AST e este foi estatisticamente significativo em relação ao grupo de animais normais. Os grupos tratados com quercetina (G3), naringenina (G4) e a associação de quercetina + naringenina (G5) apresentaram valores estatisticamente não significativos quando comparados ao grupo G1. Pode-se observar através desses resultados que os animais normais tratados com diferentes flavonóides não apresentaram grandes variações na atividade de AST. Porém, após a indução do câncer (depois do 20º dia), os grupos G3, G4, G5 apresentaram maior porcentagem de variação (aumento) na atividade dessa enzima. O tratamento do grupo G6 com a ipriflavona, no entanto, reduziu a atividade de AST aos 39 dias. No 39º dia ainda observou-se que o melhor resultado foi o obtido com a ipriflavona que apresentou a menor atividade dessa enzima. Desordens hepáticas ou cardiovasculares estão relacionadas com o aumento na atividade dessa enzima. Quando se comparou os grupos G2, G3, G4 e G5 no 39º dia observou-se que o tratamento do grupo G4 foi o que apresentou maior atividade de AST

e este foi estatisticamente significativo em relação ao grupo G2, que eram os animais com câncer induzido e não tratados.

A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima catalítica encontrada primariamente no coração, no fígado e no tecido muscular (CHERNECKY, 1993). Ela catalisa a reação do ácido oxaloacético com o ácido glutâmico e produz ácido α cetoglutarico e ácido aspártico. As variações na atividade dessa enzima podem ser encontradas em hepatites infecciosas, hepatopatias crônicas, carcinomas hepáticos, infarto do miocárdio, onde estas se elevam bastante (LIMA, 2003). Infarto agudo do miocárdio, infarto cerebral, infarto pulmonar, infarto renal são patologias onde se encontra atividade aumentada dessa enzima (CHERNECKY, 1993). Além disso, elevações nos níveis séricos totais ocorrem quando existe grave lesão das células. A AST também pode ser encontrada formando complexos com IgA no câncer hepático (CHERNECKY, 1993).

Os resultados dos níveis médios de alanina aminotransferase (ALT) de camundongos tratados com diferentes flavonóides por 20 dias e posterior indução do TAE encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 – Prevenção do TAE pelo uso de flavonóides medidos pelos valores médios de ALT (U/mL)

<i>Tratamento</i>	<i>20 dias</i>	<i>38 dias</i>
G1 = Ração (normal)	59,00 ± 10,13 a	-
G2 = Ração (Câncer)	-	155,84 ± 35,48 a
G3 = Ração + Quercetina	28,20 ± 7,05 Bc	167,80 ± 74,69 Aa
G4 = Ração + Naringenina	30,00 ± 10,65 Bbc	128,48 ± 39,48 Aa
G5 = Ração + Quercetina + Naringenina	8,75 ± 12,18 A bc	40,60 ± 8,79 Ab
G6 = Ração + Ipriflavona	49,20 ± 20,55 Aab	31,00 ± 6,78 Bc

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

Em cada tratamento A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

Observou-se na tabela 3 que no 21º dia os animais tratados com os diferentes flavonóides tiveram a atividade dessa enzima reduzida nos grupos tratados com quercetina (G3), naringenina (G4) e quercetina + naringenina (G5) e essas reduções foram estatisticamente significativas quando comparadas ao grupo G1 (normal). Novamente observou-se que no 39º dia os animais tratados com os flavonóides (G3, G4, G5) tiveram aumentos na atividade da enzima ALT em relação aos resultados bioquímicos obtidos no 21º dia. Apenas o grupo G6 teve atividade dessa enzima reduzida. Quando se comparou os grupos G3 e G4 com o grupo G2 (animal com TAE), observou-se que a atividade dessa enzima era mais próxima da atividade da enzima nos animais com câncer. No entanto, o grupo 5 teve uma redução considerável na atividade de ALT ao ser comparado com os animais do grupo G2 nesse mesmo período. Também o grupo G6 apresentou esse comportamento tendo uma redução ainda maior e esses valores foram estatisticamente significativos.

A alanina aminotransferase (ALT) também é responsável por reações de transaminações (LIMA, 2003). ALT é uma enzima produzida pelo fígado e encontrada

em certos líquidos corporais (bile, líquido cefalorraquidiano, plasma, saliva), no fígado, na musculatura esquelética, no pâncreas e nos rins. Sua dosagem é comumente efetuada para avaliar lesão hepática, quando seus níveis podem aumentar e atingir até 50 vezes seu valor normal (CHERNECKY, 1993). Os níveis da ALT são elevados em hepatites, carcinomas hepáticos e icterícias e sua variação é menor que a da AST nos infartos do miocárdio (LIMA, 2003). As enzimas podem ser liberadas na circulação sistêmica como resultado de necrose tumoral ou de mudanças na permeabilidade da célula cancerosa. Elas servem como monitoramento terapêutico para o câncer (GUENGERICH, 2001).

GUPTA e colaboradores 2004 realizaram um estudo com uma planta da Índia, a *Cesalpinia bonducella*, que possui associação de flavonóides, terpenos, saponinas e alcalóides. Para avaliar a toxicidade da planta em camundongos normais (sem TAE) foram testadas dosagens diferentes (50, 100, 200 e 300mg/kg) do extrato metanólico dessa planta (MECB). Esse extrato foi dissolvido em propileno glicol e administrado intraperitonealmente em camundongos. Após 14 dias de tratamento, foi observado um aumento estatisticamente significativo ($P < 0,05$) na atividade sérica das enzimas transaminases (AST e ALT) quando comparou o grupo controle (animal normal) em relação ao grupo tratado com 300mg/kg do extrato. As demais concentrações desse extrato provocaram um aumento da atividade dessas enzimas. Os autores concluíram que uma alta concentração do extrato da planta (300 mg/kg) provocou um aumento na atividade de transaminases indicando assim, a ocorrência de disfunções hepato-renais e alterações no metabolismo.

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

Na tabela 4 encontram-se registrados os níveis médios de albumina de camundongos tratados com diferentes flavonóides por 20 dias e posterior indução do câncer.

Tabela 4 – Prevenção do TAE pelo uso de flavonóides medidos pelos valores médios de albumina (g/dL)

<i>Tratamento</i>	<i>21 dias</i>	<i>39 dias</i>
G1 = Ração (normal)	2,49 ± 0,33 b	-
G2 = Ração (Câncer)	-	2,68 ± 0,56 c
G3 = Ração + Quercetina	3,54 ± 0,23 Aa	3,31 ± 0,29 Aab
G4 = Ração + Naringenina	3,31 ± 0,51 Ba	4,20 ± 0,66 Aa
G5 = Ração + Quercetina + Naringenina	3,19 ± Aab	4,32 ± 1,46 Aa
G6 = Ração + Ipriflavona	3,47 ± 0,42 Aa	3,03 ± 0,94 Abc

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

Em cada tratamento A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que os grupos G3, G4 e G6 quando comparados com o grupo G1 (animais normais sem nenhum tratamento) apresentaram aumento na concentração dessa proteína no soro sanguíneo de camundongos e esses valores foram estatisticamente significativos no 21º dia.

No 39º dia, observou-se que os animais tratados previamente com flavonóides e com posterior indução do câncer, apresentaram pequenas variações nas concentrações dessa proteína (G3, G4, G5, G6). No entanto, comparando-se os animais com câncer (G2) com aqueles tratados com flavonóides (G3, G4, G5) observou-se que as concentrações da albumina aumentaram nos animais tratados com flavonóides e esses valores foram estatisticamente significativos em relação ao grupo G2.

A albumina é uma das duas frações protéicas do sangue. Atua na manutenção da pressão oncótica e transportadora de nutrientes, fármacos, bilirrubina, ácidos graxos, hormônios e outras substâncias insolúveis em água e valores elevados podem ocorrer em carcinomatose metastática, colite ulcerativa, nefrose, neoplasias entre outras. (CHERNECKY, 1993).

Em presença de ascite de qualquer causa, a albumina sérica não é um bom índice da capacidade sintética hepática. Na ascite, a síntese pode estar normal ou mesmo aumentada, no entanto os teores séricos estão baixos devido ao grande volume de distribuição. Segundo MOTTA (2003), uma disfunção hepatocelular provoca síntese prejudicada de albumina.

Estresse fisiológico de qualquer tipo, como dano tecidual, infecção ou carcinoma podem provocar hipoalbuminemia. Isso ocorre pela liberação de substâncias mensageiras no local da lesão, tais como o fator de necrose tumoral, interleucina-1 e interleucina-6. Eles reduzem a síntese de albumina por alterações da disponibilidade do mRNA (MOTTA, 2003). É importante lembrar que a albumina é transportadora de muitos fármacos e outras substâncias exógenas no organismo.

A presença de grandes quantidades de albumina no organismo com boa parte presente no espaço intravascular explica o papel crítico que essa proteína exerce na pressão coloidosmótica. A albumina contribui com 75 a 80% do efeito osmótico do plasma, um dos fatores que regulam a distribuição apropriada de água entre os compartimentos intra e extracelulares. Em certas enfermidades, os teores de albumina anormalmente baixos movem a água do leito vascular para os tecidos (MOTTA, 2003).

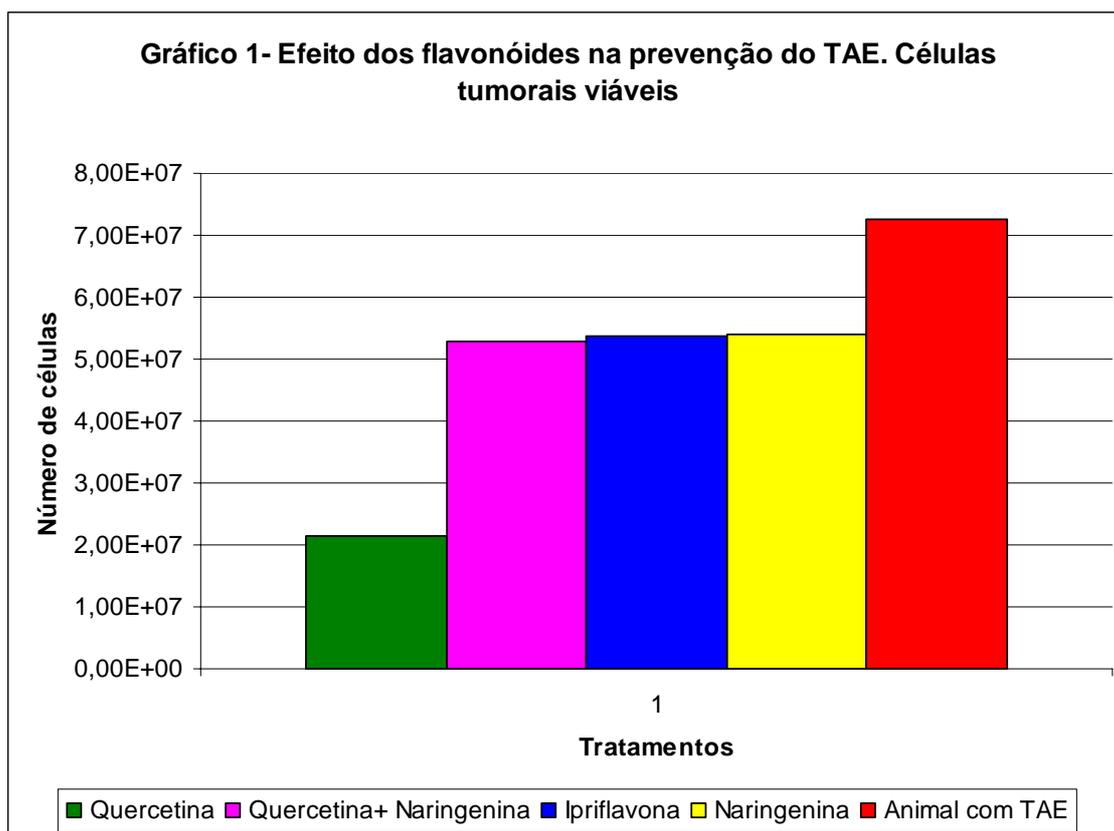
A tabela 5 apresenta os resultados do efeito de flavonóides (prevenção) na viabilidade celular e no volume do líquido ascítico de camundongos.

Tabela 5 – Efeito de flavonóides na prevenção do TAE em camundongos. Viabilidade celular e volume do líquido ascítico

<i>Tratamento</i>	<i>Células tumorais Viáveis (N x 10⁷)</i>	<i>Células tumorais mortas (N x 10⁷)</i>	<i>Células tumorais totais (N x 10⁷)</i>	<i>Viabilidade celular (%)</i>	<i>Volume do líquido ascítico (ml)</i>
G1 = Controle (câncer)	7,27 ± 1,150a	0,050 ± 0,005 a	7,32 ± 1,15 a	99,23 ± 0,15 a	17,33 ± 3,01 bc
G2 = Ração + Ipriflavona	5,36 ± 0,24 b	0,170 ± 0,008 a	5,53 ± 0,23 a	96,90 ± 0,26 b	14,50 ± 2,50 cd
G3 = Ração + Quercetina	2,13 ± 0,49 c	0,631 ± 0,866 a	2,77 ± 0,61 b	69,13 ± 29,70 b	26,73 ± 1,62 a
G4 = Ração + Naringenina	5,41 ± 2,71 ab	0,613 ± 0,158 a	6,02 ± 2,59 a	86,87 ± 10,20 b	23,57 ± 3,20 ab
G5 = Ração + Quercetina + Naringenina	5,28 ± 1,08 b	0,210 ± 0,100 a	5,49 ± 1,04 a	95,87 ± 2,49 b	12,83 ± 1,89 d

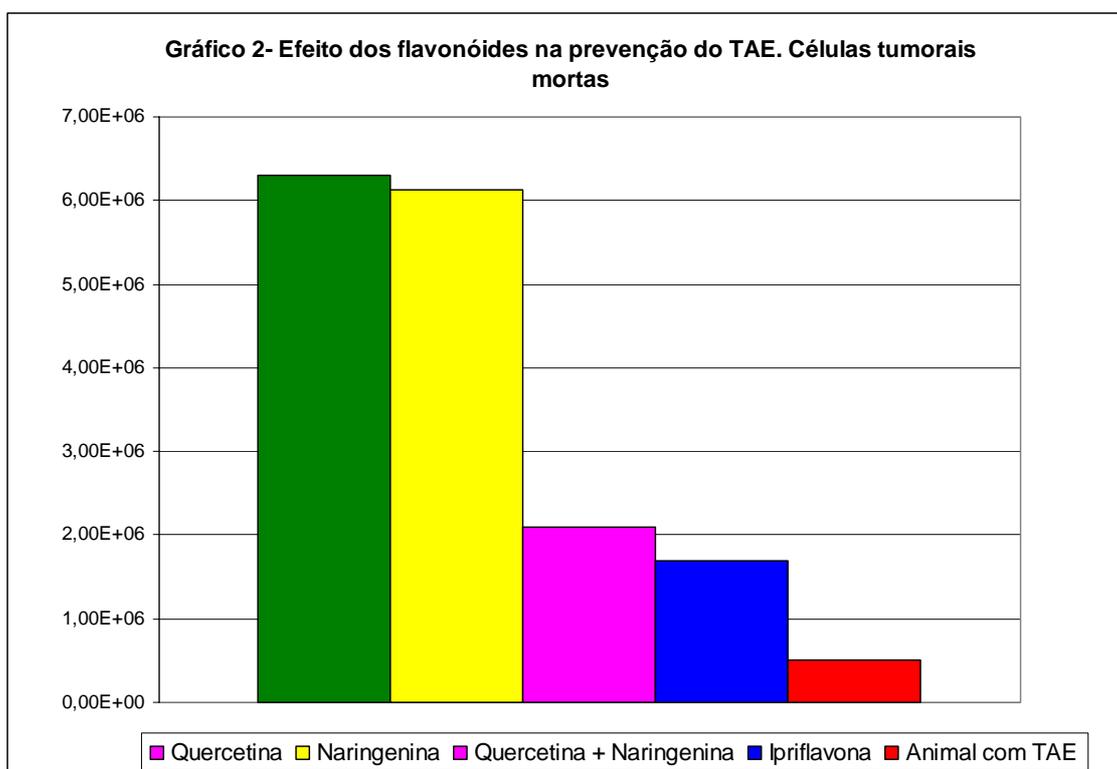
Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste t de Student (P>0,05).

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que o número de células tumorais viáveis foi menor nos animais tratados com quercetina do que nos animais com câncer (G1) e esse resultado foi estatisticamente significativo. Esse mesmo resultado pode ser melhor visualizado no gráfico 1. Também os grupos G2 (ipriflavona) e G5 (quercetina + naringenina) apresentaram reduções que foram estatisticamente significativas quando comparadas ao grupo G1.



GUPTA et al., 2004 avaliaram a atividade antitumoral de uma planta da Índia, *Cesalpinia bonducella*, que possui associação de flavonóides, terpenos, saponinas e alcalóides. Camundongos com TAE foram tratados por 14 dias com dosagens diferentes do extrato metanólico dessa planta. Ao avaliar o número de células viáveis presentes no líquido ascítico dos camundongos com Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) e tratados com o extrato da planta, os pesquisadores encontraram reduções significativas ($p < 0,01$) no número de células tumorais viáveis nos animais dos grupos tratados com 50 e 200mg/kg do extrato quando comparado com os animais do grupo com TAE não tratados. Isso está consistente com os dados encontrados em nosso estudo, onde também foi observado uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de células tumorais viáveis quando os camundongos com TAE foram tratados com 10mg/kg dos flavonóides quercetina e ipriflavona.

Na tabela 5 encontra-se registrado também a contagem de células tumorais mortas. Embora todos os grupos tenham apresentado valores estatisticamente não significativos em relação ao grupo G1 (Controle com câncer), observou-se que o grupo tratado com quercetina apresentou maior número de células mortas quando comparados ao grupo controle. Observando os valores numéricos das células mortas do grupo G1 (500.000) e do grupo G2 (6.310.000) nota-se que o número de células mortas do grupo G2 é dez (10) vezes superior ao do grupo G1. Esses resultados são melhores visualizados no gráfico 2.



Nesses estudos realizados não foi pesquisado o mecanismo pelo o qual os flavonóides matam as células tumorais, porém a literatura sugere vários mecanismo como por exemplo, os flavonóides afetam a progressão do ciclo celular (MARCHAND, 2002). Pesquisadores muitas vezes divergem quanto à fase do ciclo celular a qual os flavonóides afetam, sendo também dependente do tipo de células tumorais estudada. Estudos conduzidos por RUSAK (2005), mostraram que os flavonóides inibem de forma significativa o crescimento de linhagens de HL-60 (célula humana leucêmica) e sua eficácia antiproliferativa foi equivalente ou um pouco maior que os agentes anticarcinogênicos tradicionais como doxorrubicina, vincristina e metotrexato.

Quercetina bloqueou o ciclo celular na fase G1/S de células cancerosas de cólon e gástrica. Já em linhagens de células de mama e laringe esse flavonóide mostrou bloquear a fase G2/M do ciclo celular (FORMICA, 1995). O metabolismo rápido da quercetina forma o metabólito metilado isorhamnetina, que possui efeito no retardamento das fases G0-G1 do ciclo celular em baixas concentrações em linhagens de células HepG2 (hepatocarcinoma). A quercetina induz o bloqueio do ciclo celular na fase G1 (CSOKAY, 1997), inibindo a atividade de CDK2 em 40-60% (CASAGRANDE,2001). Segundo KENNEDY (2002), os flavonóides causam paralisação do crescimento de células tumorais por impedir a progressão da fase G0-G1 do ciclo celular, levando subsequentemente a apoptose. Estudiosos encontraram que após 24 horas de incubação das células HL-60 (leucêmicas humana) com os flavonóides miricetina, quercetina e kaempferol houve uma redução na fração das células na fase G0/G1 de maneira dose-dependente. Em adição, mericitina e kaempferol levaram ao prolongamento da fase S, enquanto a exposição à quercetina diminuiu o número de células na fase G2/M. Ao aumentar o período de incubação com miricetina e isorhamnetina para 48 horas, ocorreu uma redução significativa no número de células na fase G0/G1. Esse fenômeno foi explicado pela concomitante redução das células na fase S. Indução da apoptose foi estritamente dose dependente (RUSAK, 2005).

Outro mecanismo citado pela literatura indica que os flavonóides podem inibir os passos de transdução de sinais mediados por fatores de crescimento epidérmico. Alguns flavonóides como apigenina, luteolina e quercetina induzem a apoptose por mecanismos dependentes do gene p-53. A proteína p-53 funcional apresenta meia vida curta (10 a 20 minutos) e atua na regulação do ciclo celular, reparo de DNA e, dependendo da extensão da lesão, indução da apoptose das células geneticamente instáveis, mantendo desta forma a integridade do genoma (JUNIOR, 2002; SCHULER, 2005).

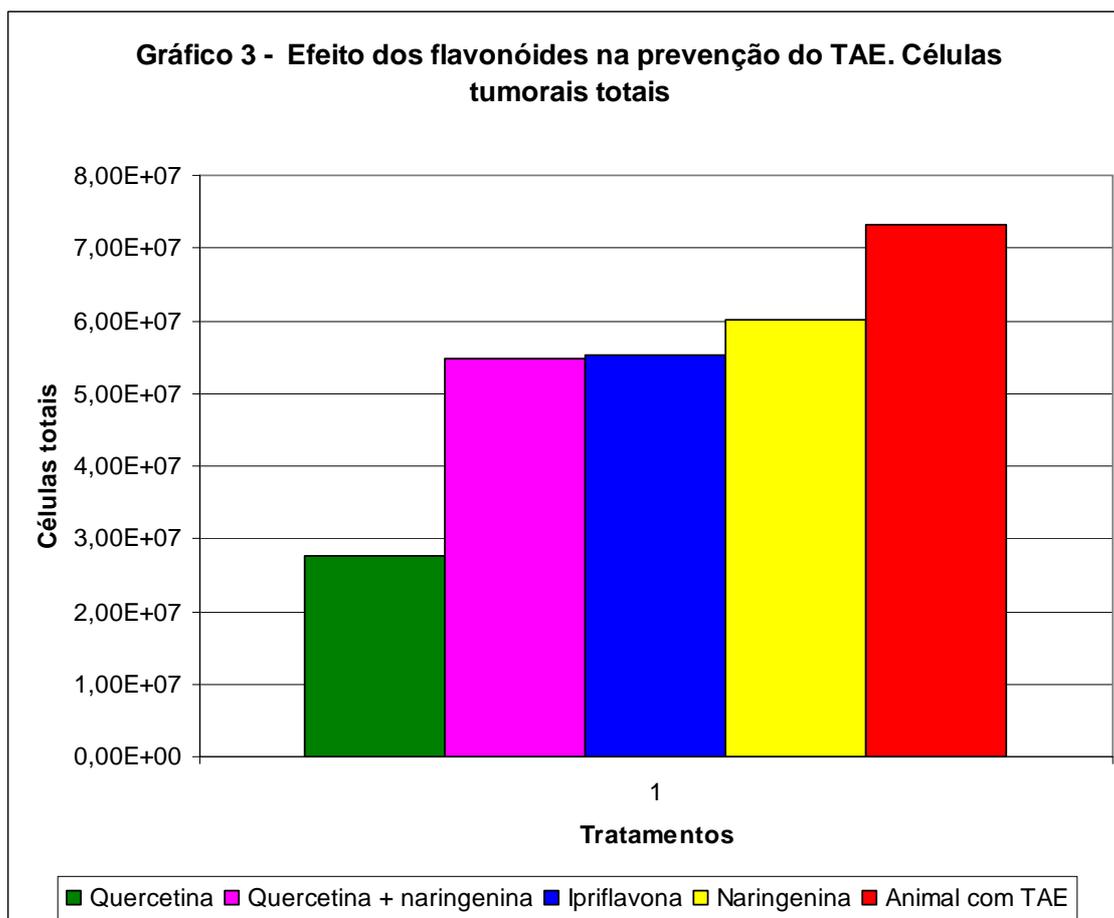
Muitos estudos sugerem que os flavonóides podem agir como antioxidantes. ROS são conhecidos por causar dano oxidativo em moléculas do DNA e lipídios. A peroxidação de lipídios e oxidação de bases do DNA é considerada importante marcador biológico no desenvolvimento do câncer, doenças cardíacas e neurodegenerativas. (YOKOZAWA, 1997). O desenvolvimento e a descoberta de artifícios que reduz o dano oxidativo podem contribuir na prevenção de câncer e outras desordens degenerativas em humanos (CAI, 1997). Os fitoquímicos quimioprotetores exercem distintos mecanismos moleculares que incluem inibição da expressão de iNOS

e subsequente bloqueio da produção de óxido nítrico, indução da fase-2 de detoxificação de enzimas, eliminação de radicais livres, indução da apoptose e etc. (SURH, 2003). A produção elevada de óxido nítrico em condições inflamatórias crônicas levam a uma geração de peroxinitrito, conhecidos como aldeídos e epóxidos derivados da peroxidação lipídica. Essa inflamação crônica pode levar a uma instabilidade genômica (FERGUSON, 2001). Uma variedade de polifenóis pode exercer efeitos na função imune e inflamatória das células.

A naringenina, um flavonóide que foi testado na prevenção do TAE, causa citotoxicidade e apoptose via indução da atividade de caspase-3/CPP32, mas não da atividade da caspase-1, em linhagens de células humanas promieloleucêmicas (HL-60). Esses achados sugerem que a naringenina pode inibir o crescimento tumoral. Agentes com habilidade de induzir apoptose em tumores têm sido usados na terapia antitumoral. Flavonóides produzem diferentes efeitos biológicos e a atividade deles em induzir apoptose tem sido identificada em muitos estudos. Estudos *in vivo*, mostram o efeito da naringenina em inibir o crescimento do tumor em camundongos induzidos com sarcoma S-180 (KANNO, 2005). A ação sobre as caspases é importante porque morte celular por apoptose é seguida pela ativação de proteínas efetivas chamadas caspases, que participam de cascatas enzimáticas que terminarão na desmontagem celular (SCHULTZ, 2003).

De acordo com KENNEDY, 2002, o extrato de chá verde, galoil polifenol e epigallocatequinas têm demonstrado possuir efeito inibitório nas células do TAE e muitos mecanismos têm sido elucidados. Muitos deles incluem redução da atividade da ornitina descarboxilase, glutatona celular e de proteínas que contêm o grupo SH. Polifenóis e flavonóides causam paralisação do ciclo celular na fase G0-G1, levando subsequentemente a apoptose.

Ao se avaliar o número de células tumorais totais (células viáveis + células mortas), na tabela 5 e no gráfico 3, observou-se que o grupo G3 (animais tratados com quercetina) apresentou o menor número de células totais e esse resultado foi estatisticamente significativo ao ser comparado com o grupo G1. Esse mesmo resultado pode ser visualizado no gráfico 3.

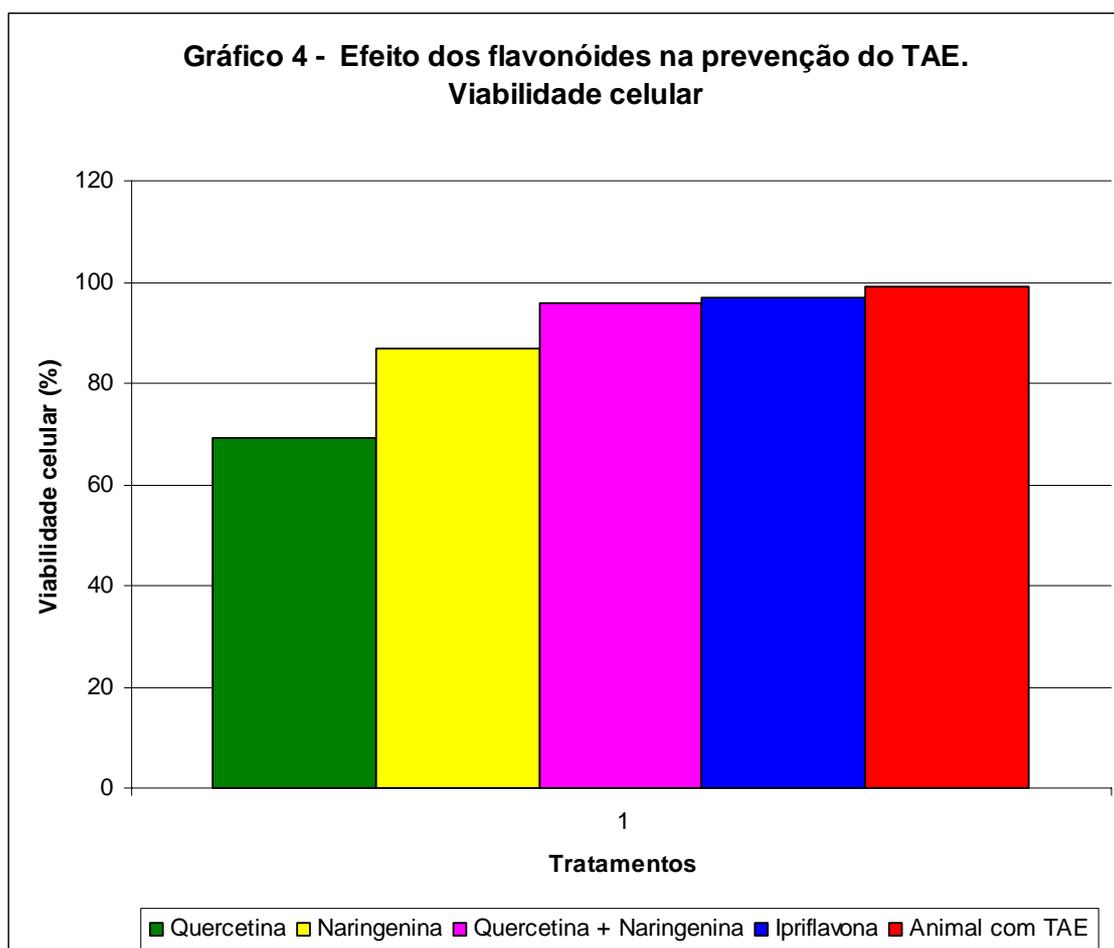


ORSOLIC (2005) constatou também em seu estudo de prevenção uma redução estatisticamente significativa de 79% no número de células tumorais totais quando os animais foram tratados com a própolis, de 74% com a naringenina e 57% com quercetina. Resultados encontrados por MATSUZAKI et al (2003) que avaliaram os efeitos do ginseng em camundongos com TAE observaram uma redução de 30% no número de células tumorais totais quando os animais foram tratados com 200mg/kg do extrato por 20 dias.

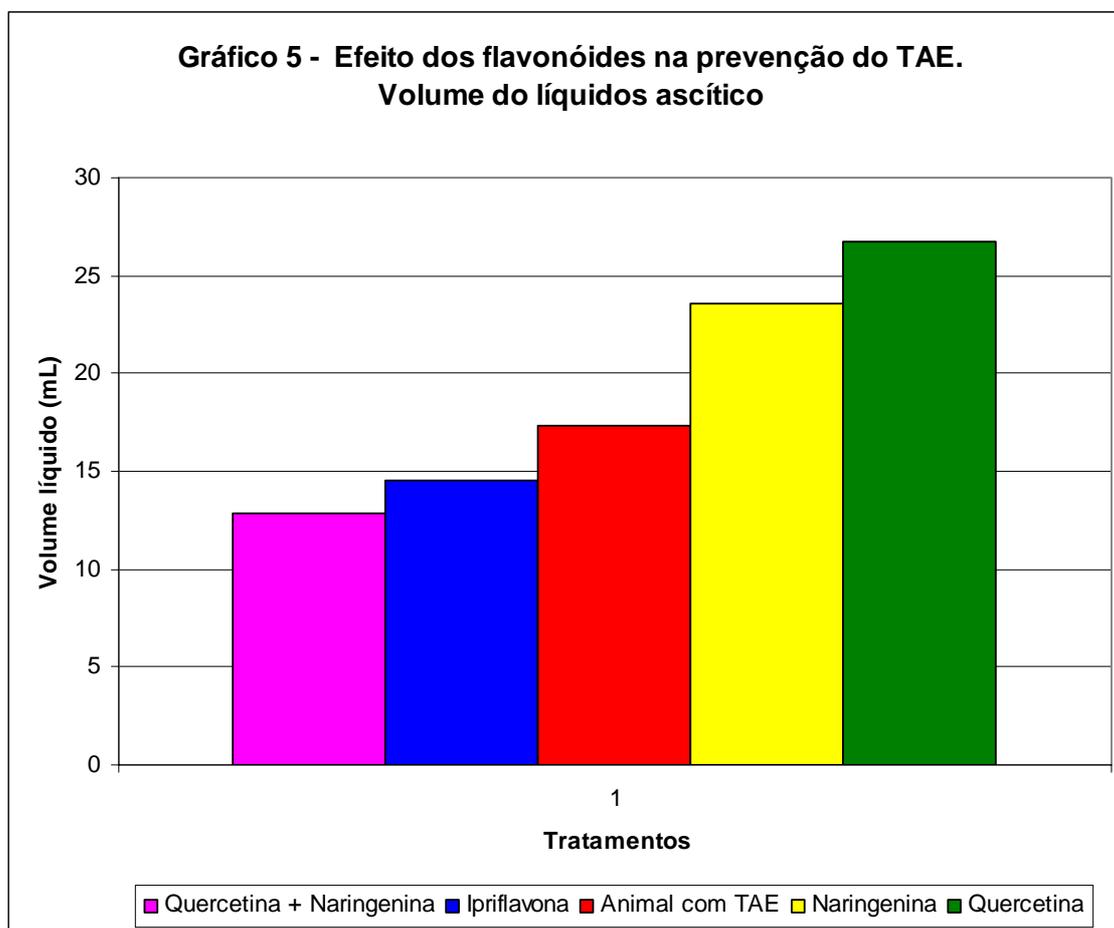
Também na tabela 5 encontram-se as porcentagens de viabilidade celular mostrando que o grupo tratado com a quercetina apresentou o menor valor quando comparado com o grupo controle com câncer (G1) e esse resultado foi estatisticamente significativo. Isso pode ser melhor visualizado no gráfico 4.

A viabilidade celular foi determinada pela fórmula:

$$V = \frac{\text{número de células vivas}}{\text{número de células totais}}$$



Na tabela 5 e no gráfico 5 encontra-se registrado o volume do líquido ascítico.

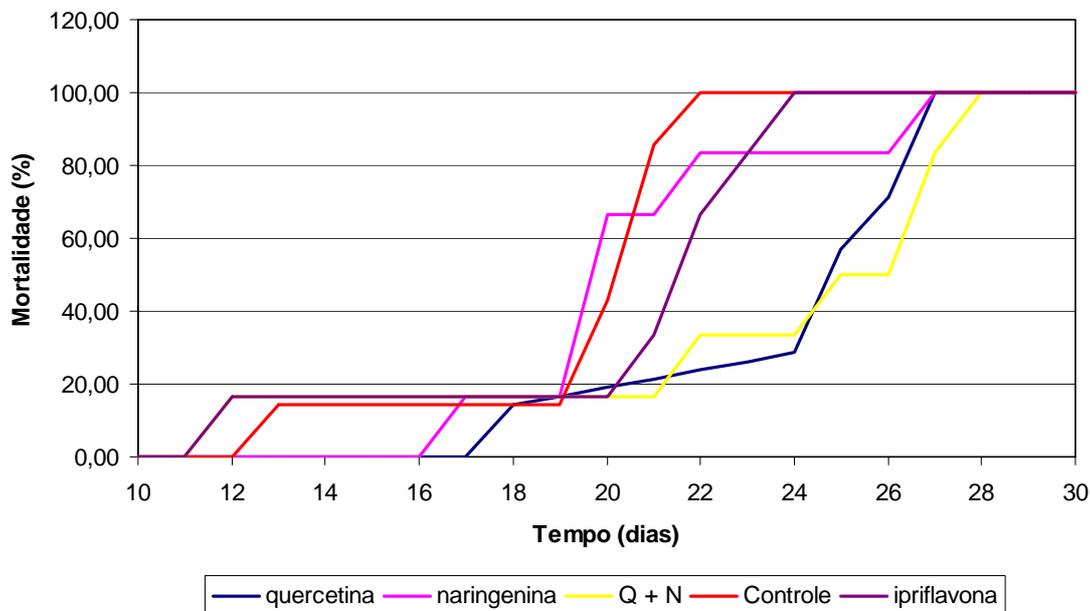


Pelos resultados obtidos o grupo tratado com a associação de quercetina e naringenina apresentou o menor valor do volume de líquido ascítico (G5). Observou-se que este valor não foi estatisticamente significativo quando comparado ao grupo tratado com ipriflavona (G2). Observou-se nesse resultado um sinergismo de adição. É importante lembrar que quercetina/naringenina foram ministrados por via oral na dose de 10mg/Kg cada um. O volume do líquido ascítico do grupo G5 foi o menor obtido e comparado com o grupo G1 essa variação foi estatisticamente significativa.

ORSOLIC (2005), ao realizar seu estudo de prevenção com os flavonóides quercetina, naringenina administrados de forma oral e intraperitoneal, observou uma redução estatisticamente significativa no volume do líquido ascítico dos animais tratados em relação aos animais com TAE (não tratados).

O gráfico 6 expressa os resultados da mortalidade dos camundongos tratados com diferentes flavonóides e com posterior indução do TAE.

Gráfico 6 - Prevenção dos flavonóides e mortalidade de camundongos com TAE



De acordo com a análise desse gráfico observou-se que no 20º dia de experimento os animais com câncer não tratados (controle) apresentaram uma porcentagem de mortalidade de 80%. Aos 22 dias observou-se que os animais tratados com naringenina tiveram 80% de mortalidade, já aos 23 dias os animais tratados com ipriflavona apresentaram 80% de mortalidade. Entretanto, os animais tratados com quercetina tiveram 80% de mortalidade aos 26 dias, e que os animais tratados com a associação de quercetina + naringenina apresentaram 80% de mortalidade aos 27 dias.

Notou-se novamente que o sinergismo dos dois flavonóides quercetina + naringenina foram capazes de prolongar a vida dos animais em 7 dias quando comparado ao grupo controle. Observou-se que foram os mesmos animais que tiveram o menor volume do líquido ascítico.

A análise do tempo de sobrevida dos animais também foi realizada através de cálculos de MST (Tempo médio de sobrevida dos animais) e de %ILS (porcentagem de aumento do tempo de sobrevida). Esses resultados podem ser visualizados na tabela 6.

Tabela 6 – Atividade preventiva de flavonóides sobre o tempo de vida de camundongos com TAE

<i>Tratamentos</i>	<i>Varição do tempo de sobrevivida (d)</i>	<i>MST (d)^a</i>	<i>ILS (%)^b</i>	<i>T/C (%)^c</i>	<i>Eficácia</i>
Ração	13 -22	17,5			
Ração + quercetina	18-27	22,5	28,5	128,57	+
Ração + naringenina	17-27	22,0	25,7	125,7	+
Ração + ipriflavona	12-24	18,0	2,8	102,85	-
Ração + quercetina + naringenina	12-28	20	14,2	114,28	-

a) $MST = (1^{\circ} \text{dia de morte} + \text{ultimo dia de morte}) / 2$;

b) $ILS\% = (MST \text{ grupo tratado} / MST \text{ grupo controle}) - 1 \times 100$;

c) $T/C \% = (MST \text{ grupo tratado} / MST \text{ grupo controle}) \times 100$

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

De acordo com ORSOLIC (2005), em um estudo testando diferentes flavonóides em camundongos com TAE, foi observado um aumento de 15,83% no tempo de vida dos animais que foram tratados com a naringenina na concentração de 50mg/kg por 7 dias e avaliados no 14odia. Quando o tratamento foi efetuado com a quercetina, o aumento observado foi de 6,66% . O autor afirma que esses tratamentos aumentam a sobrevivida do animal, confirmando assim, a eficácia dos compostos testados.

5.2 USO DE FLAVONÓIDES NO TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS COM TAE

Os resultados de proteínas totais encontram-se na tabela 7. De acordo com os resultados obtidos observou-se que as médias das concentrações de proteínas totais não foram estatisticamente significativas quando comparados ao grupo doente com câncer não tratados (G1). O grupo tratado com o medicamento neotaxel[®] apresentou a maior concentração de proteínas totais embora não tenha sido estatisticamente significativo ao comparar os grupos G1 e G2. Esses resultados foram obtidos com animais que tiveram a indução do TAE e posterior tratamento com os flavonóides.

Tabela 7 – Tratamento do TAE com o uso de flavonóides medidos pelos valores médios de proteínas totais (g/dL)

Tratamento	<i>Proteínas totais (g/dL)</i>
	<i>18 dias</i>
G1 = Ração (Normal)	57,54 ± 5,53 a
G2 = Ração (Doente com câncer)	54,23 ± 4,93 a
G3 = Ração + Quercetina	62,93 ± 9,36 a
G4 = Ração + Ipriflavona	56,33 ± 7,49 a
G5 = Ração + Medicamento (Neotaxel [®])	85,96 ± 32,62 a

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

De acordo com CHERNECKY, 1993, as proteínas séricas totais refletem a quantidade total de albumina e globulinas no soro. As proteínas séricas sintetizadas no fígado e no sistema retículo-endotelial constituem mais de 100 substâncias diferentes, classificadas como albumina e globulinas. Elas são essenciais para regulação da pressão coloidosmótica e incluem fatores de coagulação, enzimas, hormônios e são responsáveis por crescimento e reparo dos tecidos e tampões de pH, produzem anticorpos, transportam componentes sanguíneos (bilirrubina, cálcio, esteróides, hormônios tireóideos, lipídeos, metais, oxigênio e vitaminas) e são preservadoras dos cromossomos. No processo de carcinogênese, diversas proteases são liberadas

(colagenases) e suas atividades aumentadas, desse modo, a degradação de proteínas séricas aumenta embora também formem-se novas proteínas (oncoproteínas).

Os resultados da atividade de aspartato aminotransferase (AST) encontram-se registrados na tabela 8.

Tabela 8 – Tratamento do TAE com o uso de flavonóides medidos pela atividade média de AST(U/mL)

Tratamento	AST (U/mL)
	<i>18 dias</i>
G1 = Ração (normal)	419,78 ± 85,86 c
G2 = Ração (Doente com câncer)	1588,86 ± 930,83 b
G3 = Ração + Quercetina	3292,33 ± 722,56 a
G4 = Ração + Ipriflavona	2047, 83 ± 656,99 b
G5 = Ração + Medicamento (Neotaxel)	1665,83 ± 484,99 b

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

De acordo com os resultados obtidos observou-se que o grupo G3 tratado com quercetina apresentou os maiores valores de atividade dessa enzima. Esse grupo (G3) quando comparado ao grupo G1 (animais normais) apresentou valores estatisticamente significativos. Também os grupos G2, G4 e G5 apresentaram valores da atividade de AST maiores que G1, e esses valores foram estatisticamente significativos, quando comparados com o grupo G1.

Observou-se também que o grupo tratado com a quercetina apresentou maior atividade enzimática do que o grupo tratado com o medicamento Neotaxel, e essa variação foi estatisticamente significativa.

Os animais normais apresentaram uma atividade dessa enzima bem menor do que todos os grupos. O fígado, sendo órgão central do metabolismo estará produzindo enzimas das rotas metabólicas, enzimas metabolizadoras de drogas estarão atuando para metabolizar os flavonóides e o Neotaxel. Essas enzimas atuarão em reações de detoxificação também.

Os valores de atividade de alanina aminotransferase (ALT) podem ser observados na tabela 9.

Tabela 9 – Tratamento do TAE com o uso de flavonóides medidos pela atividade média de ALT(U/mL)

Tratamento	ALT (U/mL)
	<i>18 dias</i>
G1 = Ração (normal)	59,00 ± 10,13 b
G2 = Ração (Doente com câncer)	155,84 ± 35,48 a
G3 = Ração + Quercetina	26,00 ± 6,76 c
G4 = Ração + Ipriflavona	30,00 ± 3,00 c
G5 = Ração + Medicamento (Neotaxel)	32,25 ± 14,62 bc

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

De acordo com os resultados obtidos, o grupo G2 (doente com câncer) apresentou as atividades da ALT maior do que os demais grupos. Os grupos G3 e G4 apresentaram as menores atividades de ALT quando comparados ao grupo G2. Os grupos tratados com flavonóides (G3 e G4) e o grupo G5 tratado com medicamento tiveram redução na atividade da TGP. O grupo tratado com Neotaxel[®] teve uma redução na atividade da ALT menor do que o grupo normal (G1), mas essa variação não foi estatisticamente significativa.

As enzimas podem ser liberadas na circulação sistêmica como resultado de necrose tumoral ou de mudanças na permeabilidade da célula cancerosa. Elas servem como monitoramento terapêutico para o câncer (GUENGERICH, 2001).

Os valores médios da concentração de albumina encontram-se registrados na tabela 10.

Tabela 10 – Tratamento do TAE com o uso de flavonóides medidos pelos valores médios de albumina (d/dL)

Tratamento	Albumina (g/dL)
	<i>18 dias</i>
G1 = Ração (normal)	2,49 ± 0,33 a
G2 = Ração (Doente com câncer)	2,68 ± 0,56 a
G3 = Ração + Quercetina	3,16 ± 0,31 a
G4 = Ração + Ipriflavona	2,90 ± 0,34 a
G5 = Ração + Medicamento (Neotaxel)	3,67 ± 1,31 a

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

De acordo com os resultados obtidos todos os grupos apresentaram valores médios de albumina que não foram estatisticamente significativos.

Em presença de ascite de qualquer causa, a albumina sérica não é um bom índice da capacidade sintética hepática. Na ascite, a síntese pode estar normal ou mesmo aumentada, no entanto os teores séricos estão baixos devido ao grande volume de distribuição.

Segundo MOTTA (2003), uma disfunção hepatocelular provoca síntese prejudicada de albumina. Além da função de transporte, a albumina determina a proporção de um fármaco livre, farmacologicamente ativo, disponível no plasma.

Estresse fisiológico de qualquer tipo, como dano tecidual, infecção ou carcinoma podem provocar hipoalbuminemia. Isso ocorre pela liberação de substâncias mensageiras no local da lesão, tais como o fator de necrose tumoral, interleucina-1 e interleucina-6. Eles reduzem a síntese de albumina por alterações da disponibilidade do mRNA (MOTTA, 2003).

A presença de grandes quantidades de albumina no organismo com boa parte presente no espaço intravascular explica o papel crítico que essa proteína exerce na

pressão coloidosmótica. A albumina contribui com 75 a 80% do efeito osmótico do plasma, um dos fatores que regulam a distribuição apropriada de água entre os compartimentos intra e extracelulares. Em certas enfermidades, os teores de albumina anormalmente baixos movem a água do leito vascular para os tecidos (MOTTA, 2003).

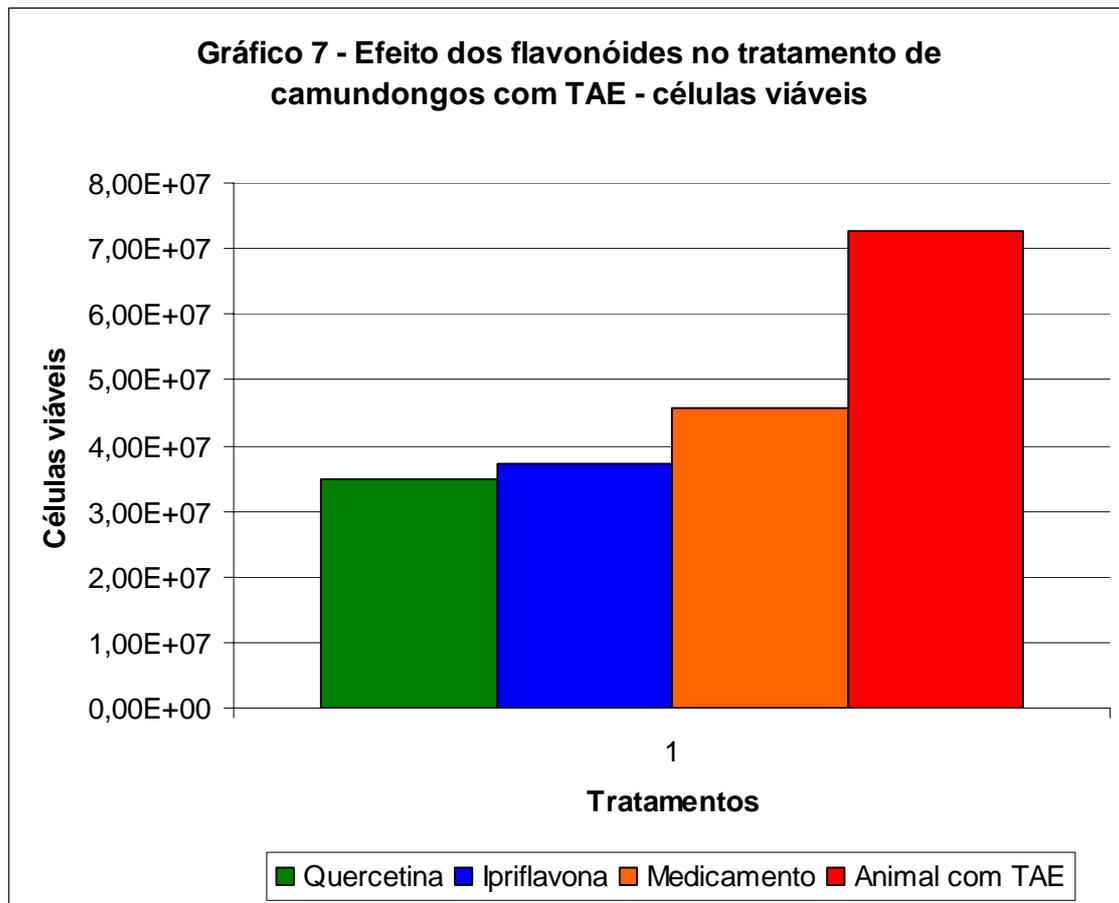
A tabela 11 apresenta os resultados do efeito de flavonóides na viabilidade celular e no volume do líquido ascítico de camundongos com TAE.

Tabela 11 – Efeito de flavonóides no tratamento do TAE em camundongos – viabilidade celular e volume do líquido ascítico

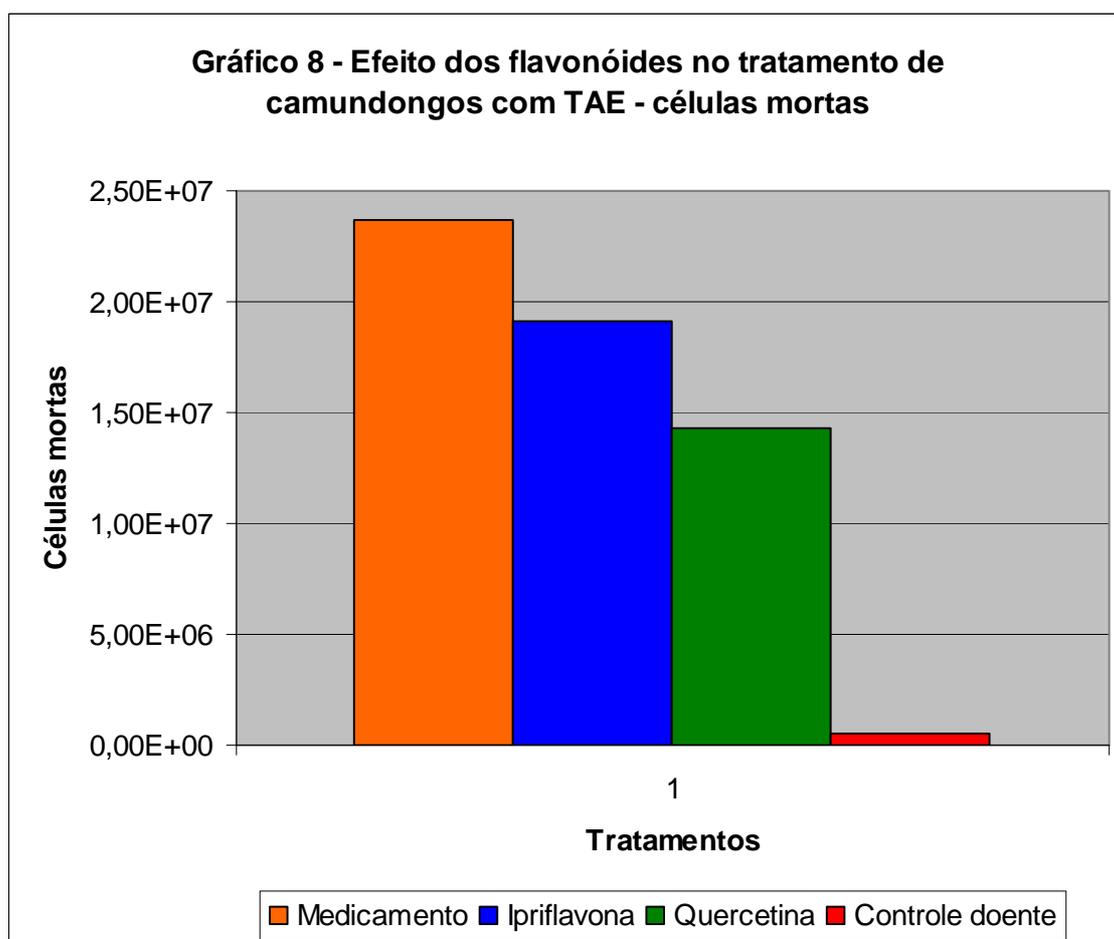
<i>Tratamento</i>	<i>Células tumorais Viáveis (N x 10⁷)</i>	<i>Células tumorais mortas (N x 10⁷)</i>	<i>Células tumorais totais (N x 10⁷)</i>	<i>Viabilidade celular (%)</i>	<i>Volume do líquido ascítico (ml)</i>
G1 = Controle (câncer)	7,27 ± 1,15 a	0,05 ± 0,01 b	7,32 ± 1,15 a	99,23 ± 0,16 a	17,33 ± 3,01 a
G2= Ração + Medicamento	4,58 ± 0,44 b	2,37 ± 1,36 a	6,94 ± 1,29 a	67,30 ± 13,20 b	18,80 ± 1,40 a
G3 = Ração + Quercetina	3,48 ± 0,91 b	1,43 ± 0,33 a	4,91 ± 0,79 b	70,10 ± 9,63 b	20,33 ± 3,30 a
G3 = Ração + Ipriflavona	3,72 ± 1,10 b	1,91 ± 0,67 a	5,63 ± 1,58 ab	65,83 ± 7,07 b	18,90 ± 2,57 a

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

De acordo com os resultados obtidos observou-se que os grupos G2, G3 e G4 apresentaram as menores quantidades de células tumorais viáveis quando comparado com o grupo G1 (animal com câncer não tratado). No entanto, o grupo tratado com quercetina (G3) apresentou o número de células viáveis igual a $3,48 \times 10^7$ (34.800.000) que quando comparado ao grupo G1, $7,27 \times 10^7$ (72.700.000), teve uma maior porcentagem de redução e esse resultado foi estatisticamente significativo. Esse valores poderão ser melhor visualizados no gráfico 7.

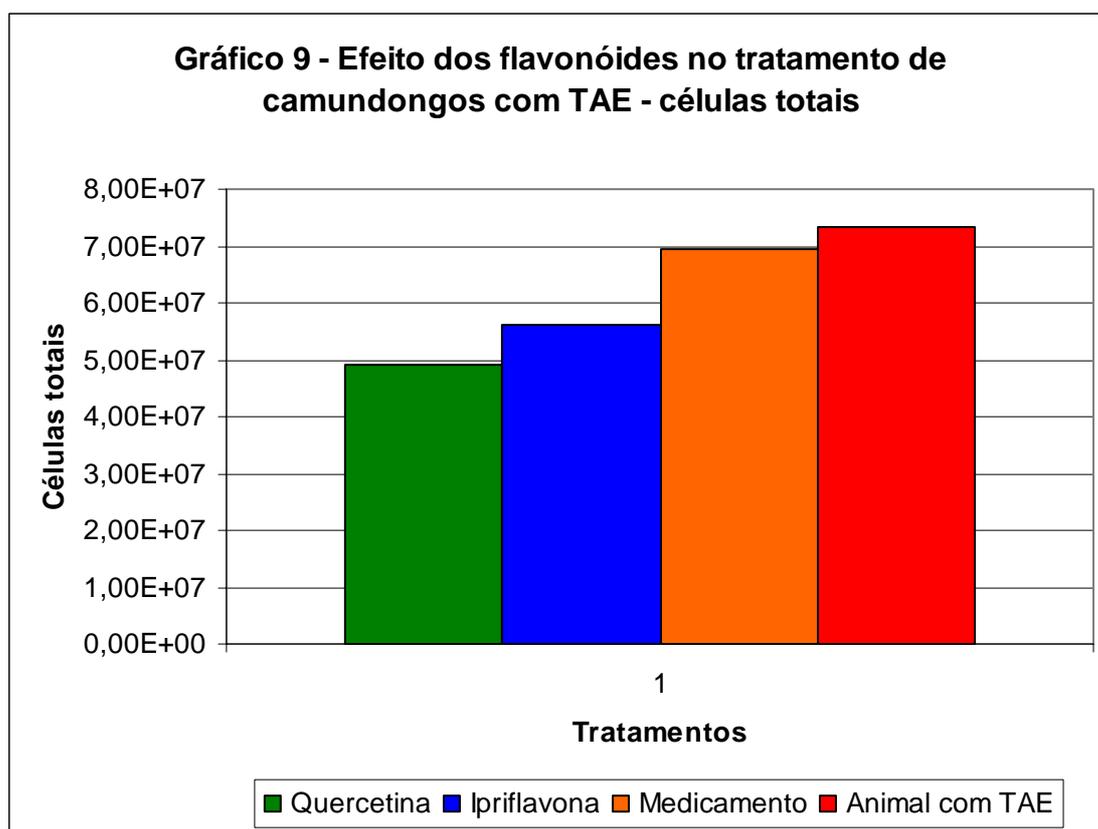


Na tabela 11 também encontram-se registrados o número de células tumorais mortas encontradas no líquido ascítico dos camundongos. De acordo com os resultados obtidos, o grupo de animais que receberam o medicamento (G2) apresentaram a maior quantidade de células mortas quando comparados com o grupo doente não tratado (G1), e esses valores foram estatisticamente significativos. É importante ressaltar que os grupos tratados com os flavonóides apresentaram valores de células tumorais mortas semelhantes aos resultados obtidos com o tratamento do grupo 2 e foram estatisticamente significativos. Em ordem de grandeza, o grupo de animais tratado com ipriflavona apresentou 19.100.000 células mortas, enquanto que o grupo que recebeu medicamento apresentou 23.700.000 células tumorais mortas e o grupo controle com câncer 500.000 células mortas. Esses resultados podem ser melhor observados no gráfico 8.

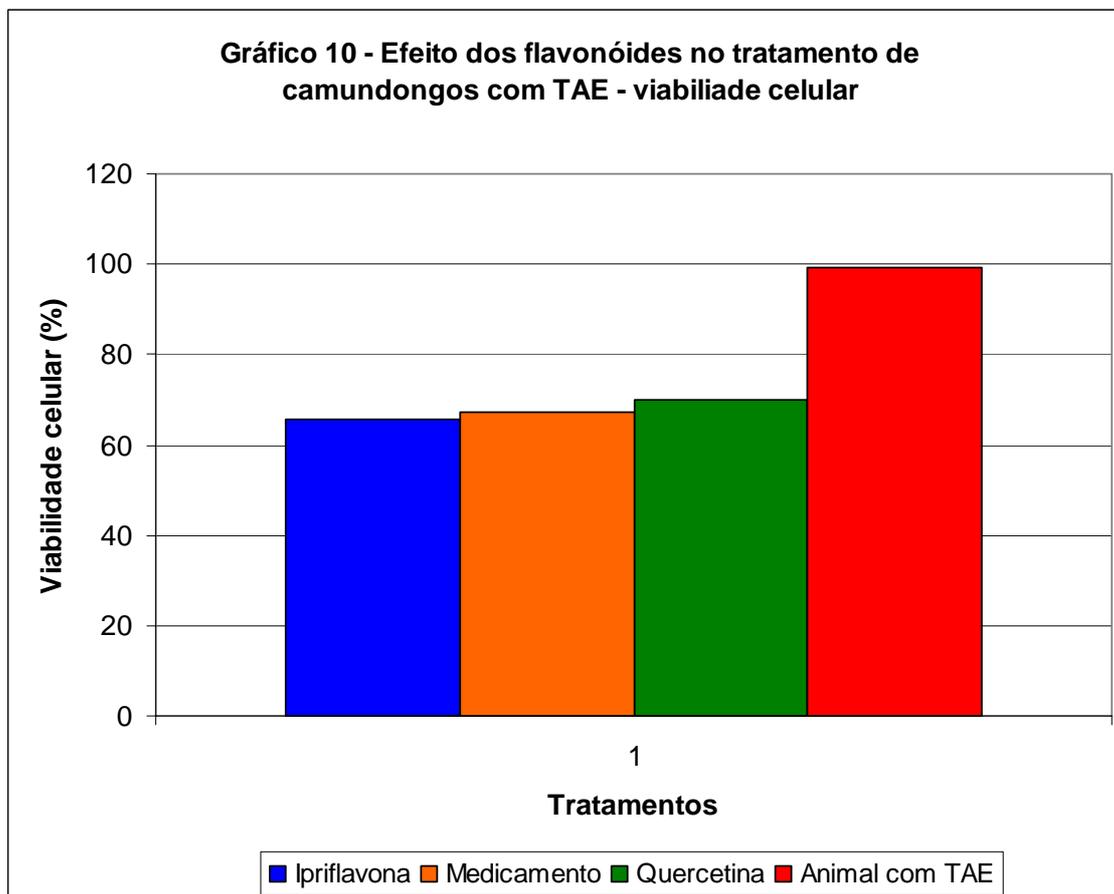


Quando GUPTA e colaboradores, 2004 avaliaram o número de células tumorais não viáveis (mortas) presentes no líquido ascítico dos camundongos com TAE e tratados com diferentes dosagens do extrato da planta, eles observaram que os animais do grupo tratados com 50mg/kg de MECB tiveram um aumento significativo ($p < 0,01$) de 96% no número de células mortas quando comparado com os animais do grupo com TAE. Os animais dos grupos tratados com 100 e 200mg/kg de MECB tiveram um aumento significativo ($p < 0,01$) de células mortas de 162% e 343%, respectivamente, quando comparados com os animais do grupo com TAE. Esses resultados estão de acordo com os resultados do nosso trabalho. Ao avaliar o número de células tumorais mortas contidas no líquido ascítico dos camundongos com TAE tratados com os flavonóides quercetina e ipriflavona, encontrou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) de 2.760% no número dessas células quando os animais foram tratados com 10mg/kg de quercetina quando comparado ao grupo de animais com TAE. Os animais tratados com ipriflavona tiveram um aumento significativo de 3.720% no número de células tumorais mortas quando comparado aos animais do grupo com TAE (não tratados).

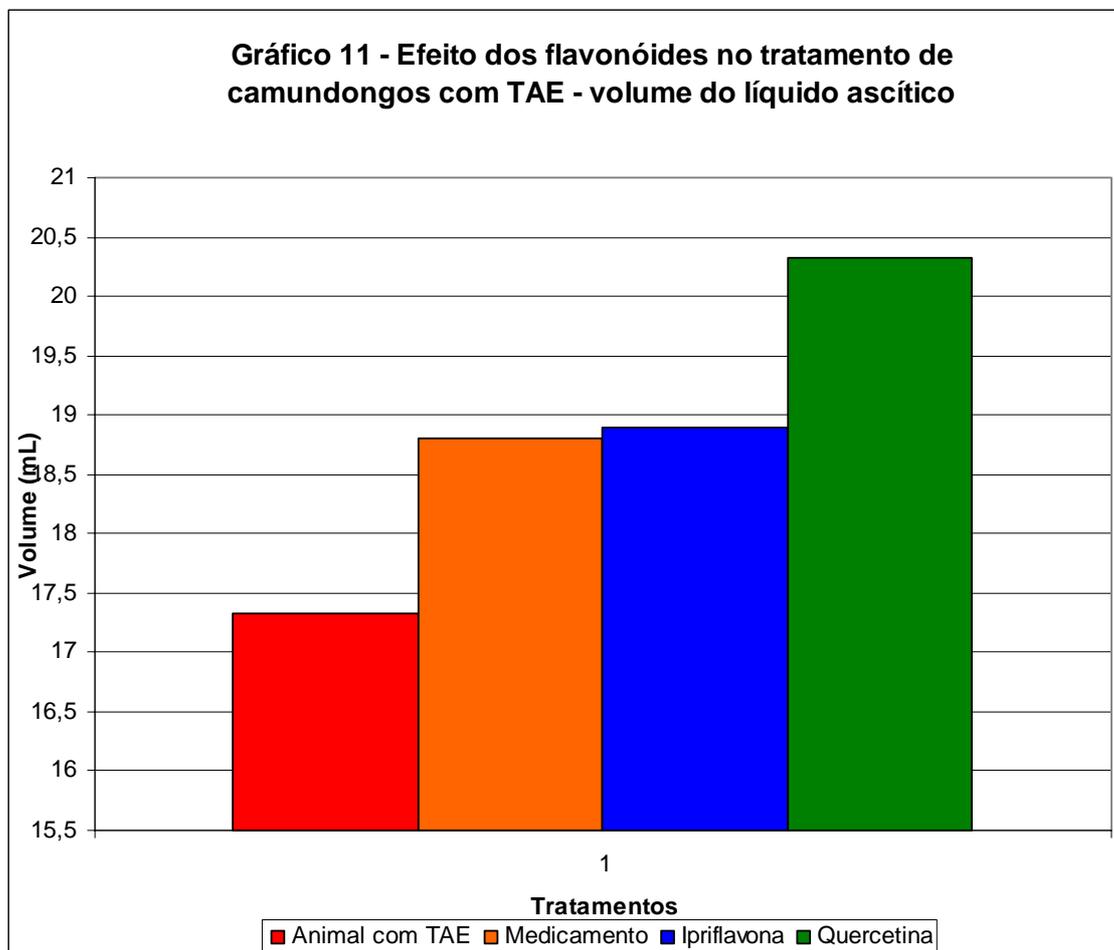
A contagem de células totais presentes no líquido ascítico dos camundongos está registrada na tabela 11 e no gráfico 9. De acordo com os resultados obtidos, o grupo G3 tratado com quercetina teve o menor valor de células totais comparado ao grupo G1 e esses valores foram estatisticamente significativos. Os grupos G3 e G4 apresentaram valores que não foram estatisticamente significativos quando comparados entre si.



Os valores de porcentagem de células viáveis encontram-se registrados na tabela 11 e no gráfico 10. De acordo com resultados obtidos, os grupos G2, G3 e G4 apresentaram menores porcentagens de células viáveis quando comparado ao grupo G1 e estes foram estatisticamente significativos.

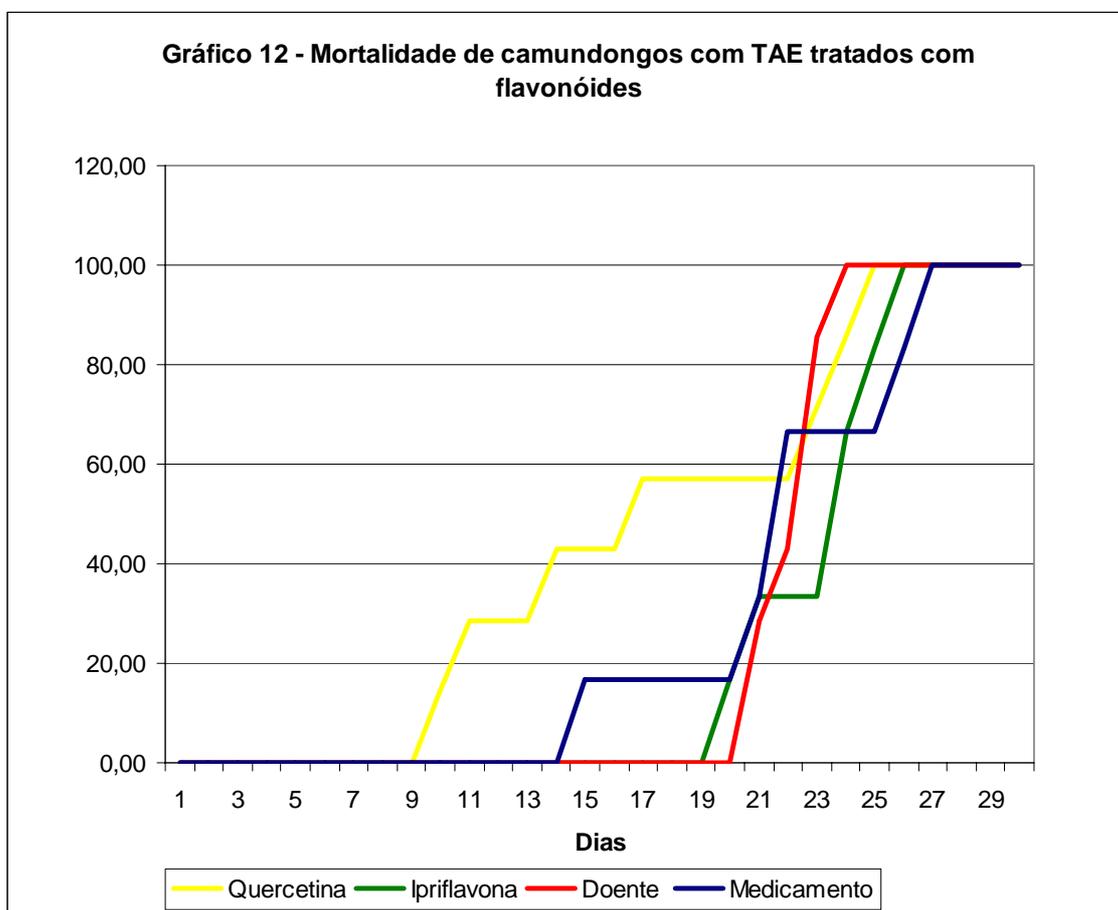


Os resultados da quantidade de líquido ascítico dos camundongos tratados pode ser observado na tabela 11 e no gráfico 11. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que todos os grupos apresentaram volumes de líquido ascítico próximos e que esses resultados não foram estatisticamente significativos.



GUPTA e colaboradores, 2004 avaliaram o volume do líquido ascítico presente na cavidade abdominal dos camundongos com TAE e tratados com diferentes dosagens do extrato da planta. Eles observaram que independente das concentrações do extrato da planta, houve uma redução significativa ($p < 0,01$) no volume desse líquido comparado ao grupo de animais com TAE que não receberam tratamento. Os dados encontrados em nosso trabalho não estão de acordo com os resultados obtidos por esses pesquisadores.

Os resultados da mortalidade dos camundongos com câncer induzidos e tratados com flavonóides durante 18 dias encontram-se registrados no gráfico 12. De acordo com os resultados obtidos o grupo doente com câncer não tratado teve 80% de mortalidade aos 22 dias. O grupo de animais tratado com quercetina alcançou 80% de mortalidade aos 23 dias. Já o grupo tratado com ipriflavona foi aos 24 dias os 80% e o de medicamento aos 26 dias. Observou que o grupo tratado com o flavonóide ipriflavona teve o resultado mais próximo do grupo tratado com medicamento. O medicamento permitiu aumentar o tempo de sobrevivência do animal seguido da ipriflavona.



A análise do tempo de sobrevivência dos animais também foi realizada através de cálculos de MST (Tempo médio de sobrevivência dos animais) e de %ILS (percentagem de aumento do tempo de sobrevivência). Esses resultados podem ser visualizados na tabela 12.

Tabela 12 – Atividade dos flavonóides sobre o tempo de vida de camundongos com TAE

<i>Tratamentos</i>	<i>Varição do tempo de sobrevivida (d)</i>	<i>MST (d)^a</i>	<i>ILS (%)^b</i>	<i>T/C (%)^c</i>	<i>Eficácia</i>
Ração	21-23	22			
Ração + quercetina	10-25	17,5	-20,0	80,0	-
Ração + ipriflavona	20-25	22,5	2,3	102,2	-
Ração + medicamento	15-25	20	-9,0	90,0	-

a) $MST = (1^{\circ} \text{dia de morte} + \text{ultimo dia de morte}) / 2$;

b) $ILS\% = (MST \text{ grupo tratado} / MST \text{ grupo controle}) - 1 \times 100$;

c) $T/C\% = (MST \text{ grupo tratado} / MST \text{ grupo controle}) \times 100$

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

De acordo com GUPTA et al (2004), ao avaliar a percentagem do aumento de sobrevivida de camundongos com TAE tratados por 14 dias com diferentes concentrações do extrato da planta, eles observaram que houve um aumento do tempo de sobrevivida de 24,44%, 58,88% e 87,22% quando os animais foram tratados com 50, 100 e 200mg/kg do extrato, respectivamente. Quando GUPTA et al (2004) injetaram diariamente 20mg/kg, intraperitonealmente do medicamento 5-fluorouracil (quimioterápico), obtiveram um aumento de 119,49% no tempo de vida dos camundongos. O medicamento utilizado em nosso trabalho foi o Neotaxel® administrado em uma única dosagem intravenosa 24 horas após a indução do câncer na concentração de 100mg/m². Observou-se que ocorreu uma redução de 9% no tempo de vida dos animais.

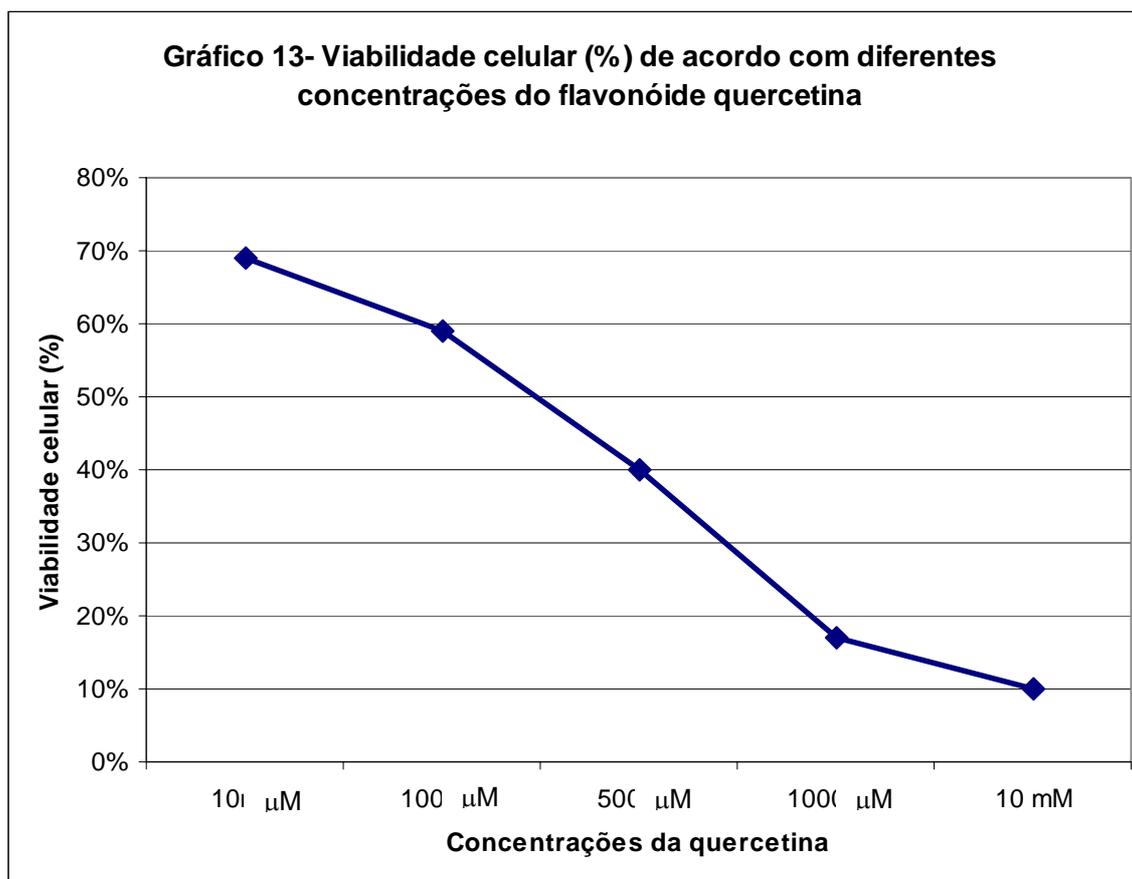
5.3 CAMUNDONGOS QUE FORAM INOCULADOS COM AS CÉLULAS DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH PREVIAMENTE TRATADAS COM FLAVONÓIDES

Para o tratamento das células tumorais com os flavonóides quercetina e ipriflavona, foram plaqueadas $5,4 \times 10^5$ células em um volume final de 3,0 mL de meio DMEM completo, em placa de 6 poços. A quercetina e a ipriflavona foram testadas nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1000 μ M, 10 mM, 100mM, 500mM. Esses flavonóides foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), sendo feitos dois poços de controle, um contendo apenas o meio DMEM completo e no outro acrescentou-se 100 μ L de DMSO. Após 48 horas de permanência em estufa foi realizada a contagem de células utilizando o método de exclusão por azul de tripano.

Os resultados encontrados encontram-se nas tabelas 13, 14, e nas figuras 25 e 26.

Tabela 13 - Células do TAE tratadas com o flavonóide quercetina (10 μ M – 10mM).

<i>Concentração do flavonóide</i>	<i>Células viáveis</i>	<i>Células mortas</i>	<i>Células totais</i>	<i>% CV</i>
10 μ M	23×10^4	10×10^4	33×10^4	69 %
100 μ M	28×10^4	19×10^4	47×10^4	59 %
500 μ M	14×10^4	21×10^4	35×10^4	40 %
1000 μ M	7×10^4	33×10^4	40×10^4	17%
10 mM	1×10^4	9×10^4	10×10^4	10%
Meio Completo	21×10^4	19×10^4	40×10^4	52 %
DMSO	9×10^4	11×10^4	20×10^4	45%

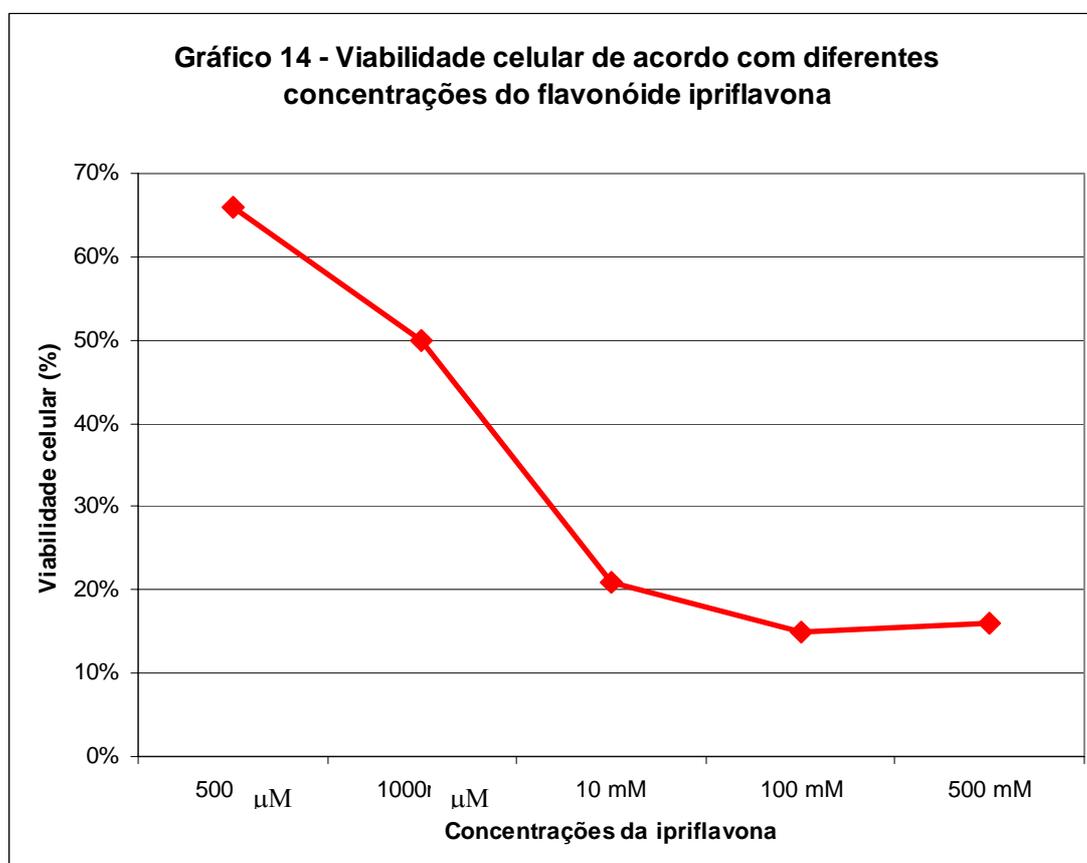


Ao observar os resultados obtidos, verificamos que ao aumentar a concentração do flavonóide quercetina, a viabilidade celular decresceu.

Evidências *in vitro* mostraram que a quercetina pode inibir a proliferação celular e modular a apoptose em cultura de células. Resultados mostraram ainda que a quercetina inibiu tanto a mitose e apoptose em cultura de células glomerulares. O mecanismo molecular envolvido no efeito anti-mitótico e anti-apoptótico da quercetina são largamente obscuros, mas recentes investigações sugerem que os flavonóides inibem a tirosina quinase e MAP quinase podendo ser estes os possíveis alvos farmacológicos (MARCHAND, 2002; ISHIKAWA, 2000).

Tabela 14 - Células do TAE tratadas com o flavonóide ipriflavona (500 μ M - 100 μ M).

<i>Concentração do flavonóide</i>	<i>Células viáveis</i>	<i>Células mortas</i>	<i>Células totais</i>	<i>% CV</i>
500 μ M	26 x 10 ⁴	13 x 10 ⁴	39 x 10 ⁴	66 %
1000 μ M	30 x 10 ⁴	29 x 10 ⁴	59 x 10 ⁴	50%
10 mM	4 x 10 ⁴	15 x 10 ⁴	19 x 10 ⁴	21%
100 mM	3 x 10 ⁴	17 x 10 ⁴	20 x 10 ⁴	15%
500 mM	5 x 10 ⁴	26 x 10 ⁴	31 x 10 ⁴	16%
MC	21 x 10 ⁴	23 x 10 ⁴	44 x 10 ⁴	47 %
DMSO	24 x 10 ⁴	26 x 10 ⁴	50 x 10 ⁴	48%



Observou-se que o tratamento das células do TAE com diferentes concentrações do flavonóide ipriflavona, provocou uma viabilidade celular de 16% quando a concentração de 500mM foi utilizada.

Os estudos *in vitro* realizados em nosso estudo permitiram verificar que as concentrações dos flavonóides testadas reduziram a viabilidade celular, porém não foi testado como essas substâncias interferem nesse parâmetro avaliado. Muitos estudos têm sido realizados com esse objetivo. Em estudos *in vitro*, os flavonóides têm demonstrado afetar a sinalização celular e a progressão do ciclo celular. Flavonóides podem exercer efeitos modulatórios nas células, independentes da sua atividade antioxidante clássica, através de ações seletivas de diferentes componentes da proteína quinase e lipídeo quinase de cascatas sinalizadoras como fosfoinositídeo-3-quinase (PI-3-quinase), tirosina quinase, proteína quinase C (PKC) e MAP quinases. Ações inibitórias ou estimuladoras dessas rotas afetam profundamente a função celular por alterar a fosforilação de moléculas alvos e/ou por modular a expressão gênica. Ações inibitórias seletivas dessas quinases podem ser benéficas no tratamento do câncer, doenças proliferativas, inflamação e neurodegeneração que podem ser deterioramento durante o desenvolvimento (WILLIAMS, 2004). Quercetina e genisteína inibem a proteína tirosina quinase que também está envolvida na proliferação celular. Múltiplos mecanismos de ação têm sido identificados quanto ao efeito anti-neoplásico dos flavonóides, incluindo ação anti-oxidante, anti-inflamatória, anti-proliferativa, inibição da bioativação de enzimas e indução de enzimas de detoxificação (MARCHAND, 2002). A isorhamnetina e o flavonóide miricetina, em diferentes concentrações, afetaram diferentes enzimas envolvidas na transdução de sinais, dessa forma interromperam o ciclo celular em estágios específicos (RUSAK, 2005). O flavonóides naringenina e hesperidina afetaram significativamente a proliferação celular na concentração de 100 μ M (CASAGRANDE, 2001).

Os resultados mostrados a seguir são oriundos do tratamento das células do TAE com os flavonóides quercetina e ipriflavona na concentração de 100 μ M por um período de 48 horas. Essas células tratadas foram inoculadas intraperitonealmente nos camundongos e após um período de 18 dias, os animais foram eutanasiados, retirou-se sangue, líquido ascítico e fragmentos de fígado para análise histopatológica.

Os níveis médios de proteínas totais encontram-se na tabela 15. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que os animais que receberam as células do tumor ascítico de Ehrlich tratadas com ipriflavona (G4) e os animais que receberam as células do TAE tratadas com quercetina (G3) apresentaram maiores concentrações de proteínas totais no soro sanguíneo e estes valores não foram estatisticamente significativos quando se comparou os grupos G3 e G4.

Tabela 15 – Valores médios de proteínas totais do soro sanguíneo de camundongos que receberam as células do tumor ascítico de Ehrlich tratadas com diferentes flavonóides

<i>Tratamento</i>	<i>Proteínas totais (g/dL) 18 dias</i>
G1 = Ração (normal)	57,54 \pm 5,53 b
G2 = Ração (animal com câncer)	54,23 \pm 4,93 b
G3 = Ração (Célula + quercetina)	72,45 \pm 11,60 a
G4 = Ração (Célula + Ipriflavona)	70,57 \pm 6,28 a

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

É importante lembrar que os animais com câncer receberam as células tumorais previamente tratadas com os flavonóides durante 48 horas. Esses animais não receberam tratamento adicional de ipriflavona e quercetina por via oral (gavage). Também observou que os animais com câncer não tratados (G2) tiveram menores níveis de proteínas totais do que os grupos G3 e G4 e esse valor foi estatisticamente significativo.

Os valores da atividade de Aspartato Aminotransferase (AST) encontram-se na tabela 16.

Tabela 16 – Valores médios de AST do soro sanguíneo de camundongos que receberam as células do tumor ascítico de Ehrlich tratadas com diferentes flavonóides

<i>Tratamento</i>	<i>AST (U/mL) 18 dias</i>
G1 = Ração (normal)	419,78 ± 85,86 b
G2 = Ração (animal com câncer)	1588,86 ± 930,83 a
G3 = Ração (Célula + quercetina)	56,17 ± 16,59 d
G4 = Ração (Célula + Ipriflavona)	145,90 ± 24,77 c

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

De acordo com os resultados obtidos, a atividade da enzima AST para os animais do grupo G2 foi muito maior do que os grupos G3, G4 e esses valores foram estatisticamente significativos. Pode-se observar ainda que o grupo G3, onde a indução do câncer ocorreu com as células do tumor de Ehrlich previamente tratadas com o flavonóide ipriflavona, tiveram a menor atividade de AST e esse valor foi estatisticamente significativo ao ser comparado com os valores dos grupos G1, G2 e G4. Também os animais do grupo G4 tiveram a atividade dessa enzima bastante reduzida em relação ao grupo G2, sendo essa variação estatisticamente significativa.

Os valores da atividade da enzimas Alanina Aminotransferase (ALT) pode ser visualizado na tabela 17.

Tabela 17 – Valores médios de ALT do soro sanguíneo de camundongos que receberam as células do tumor ascítico de Ehrlich tratadas com diferentes flavonóides

<i>Tratamento</i>	<i>ALT (U/mL) 18 dias</i>
G1 = Ração (normal)	59,00 ± 10,13 b
G2 = Ração (animal com câncer)	155,84 ± 35,48 a
G3 = Ração (Célula + quercetina)	9,17 ± 6,05 c
G4 = Ração (Célula + Ipriflavona)	9,33 ± 4,93 bc

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

Pode-se observar novamente que o grupo com câncer não tratado (G2) teve a maior atividade dessa enzima. Quando se comparou os grupos G2 com os G3 e G4 observou-se que esses 2 grupos tiveram a atividade de ALT menor que o grupo G2 e essas variações foram estatisticamente significativas. Observou-se ainda que entre os grupos que receberam as células tratadas com os flavonóides, G3 e G4, não houve diferença significativa na atividade dessa enzima.

Os valores médios da concentração de albumina encontram-se registrados na tabela 18.

Tabela 18 – Valores médios de albumina no soro sanguíneo de camundongos com as células do tumor ascítico de Ehrlich tratadas com diferentes flavonóides

<i>Tratamento</i>	<i>Albumina (g/dL) 18 dias</i>
G1 = Ração (normal)	2,49 ± 0,33 b
G2 = Ração (animal com câncer)	2,68 ± 0,56 b
G3 = Ração (Célula + quercetina)	3,58 ± 0,25 a
G4 = Ração (Célula + Ipriflavona)	3,51 ± 0,23 a

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

De acordo com os resultados obtidos, o grupo G2 (animal com câncer) apresentou uma menor concentração dessa proteína quando comparado com os grupos G3 e G4 e esses valores foram estatisticamente significativo quando se aplicou o teste t de Student. Pode-se observar ainda, que os grupos G3 e G4 apresentaram as maiores concentrações de albumina e que a variação entre esses grupos não foi estatisticamente significativa.

CONTAGEM DAS CÉLULAS NO LÍQUIDO ASCÍTICO DOS ANIMAIS.

Após a eutanásia dos animais, foi retirado o líquido ascítico dos animais onde foi mensurado o volume do mesmo e procedeu a contagem das células tumorais (viáveis e mortas) presentes nesse líquido. Para a contagem das células usou-se o método de exclusão por azul de tripano.

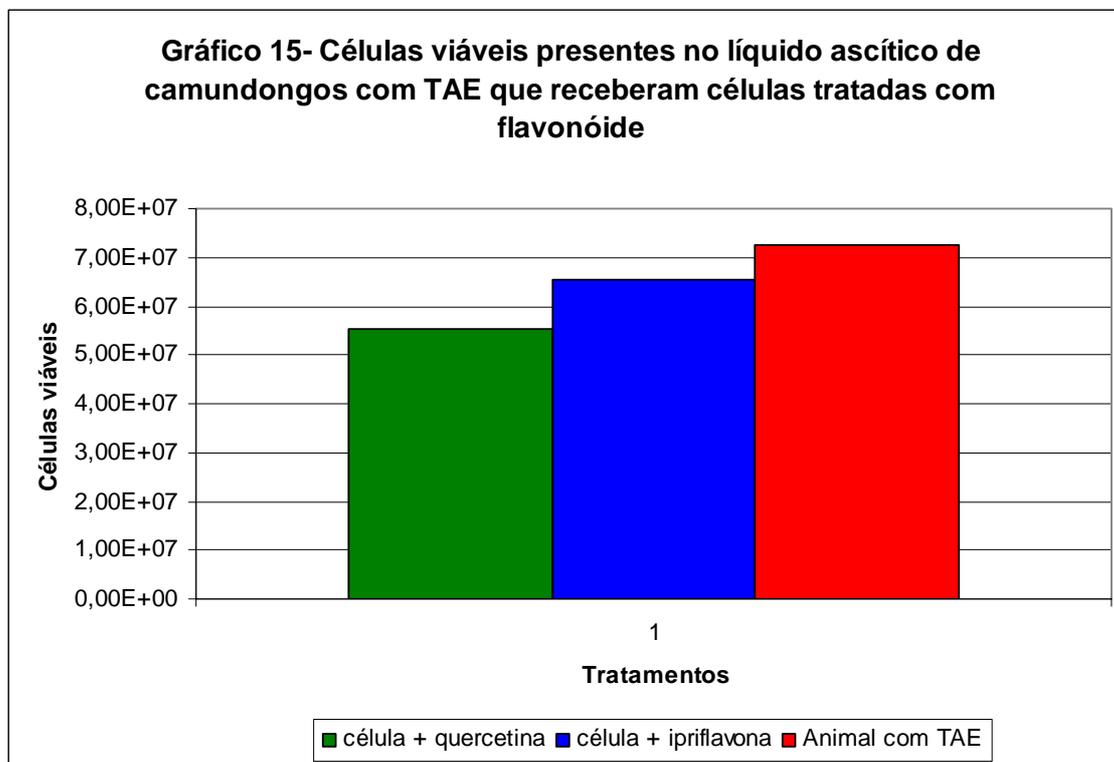
Os resultados da contagem de células tumorais e do volume do líquido ascítico pode ser observado na tabela 19.

Tabela 19 – Viabilidade celular e volume do líquido ascítico em camundongos que receberam as células do TAE tratadas com flavonóides

<i>Tratamento</i>	<i>Células tumorais Viáveis (N x 10⁷)</i>	<i>Células tumorais mortas (N x 10⁷)</i>	<i>Células tumorais totais (N x 10⁷)</i>	<i>Viabilidade celular (%)</i>	<i>Volume do líquido ascítico (ml)</i>
G1 = Ração (animal com câncer)	7,27 ± 1,15 a	0,05 ± 0,01 c	7,32 ± 1,15 a	99,23 ± 0,16 a	17,33 ± 3,01 b
G2 = Ração (Célula + quercetina)	6,55 ± 0,72 a	0,52 ± 0,05 a	7,07 ± 0,66 a	92,53 ± 1,52 b	21,40 ± 1,44 b
G3 = Ração (Célula + Ipriflavona)	5,54 ± 0,14 b	0,33 ± 0,03 b	5,87 ± 0,14 b	94,43 ± 0,47 b	25,10 ± 0,82 a

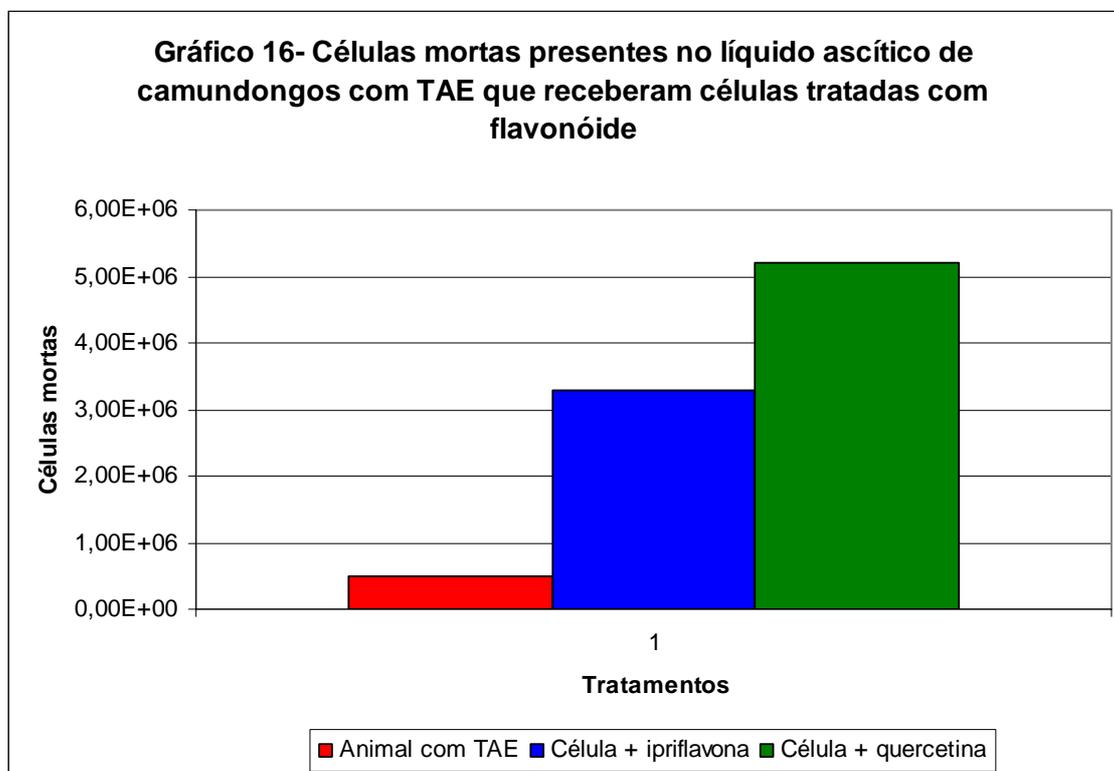
Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste t de Student (P>0,05).

Os valores médios da contagem de células tumorais viáveis pode ser visualizado na tabela 19 e no gráfico 15.



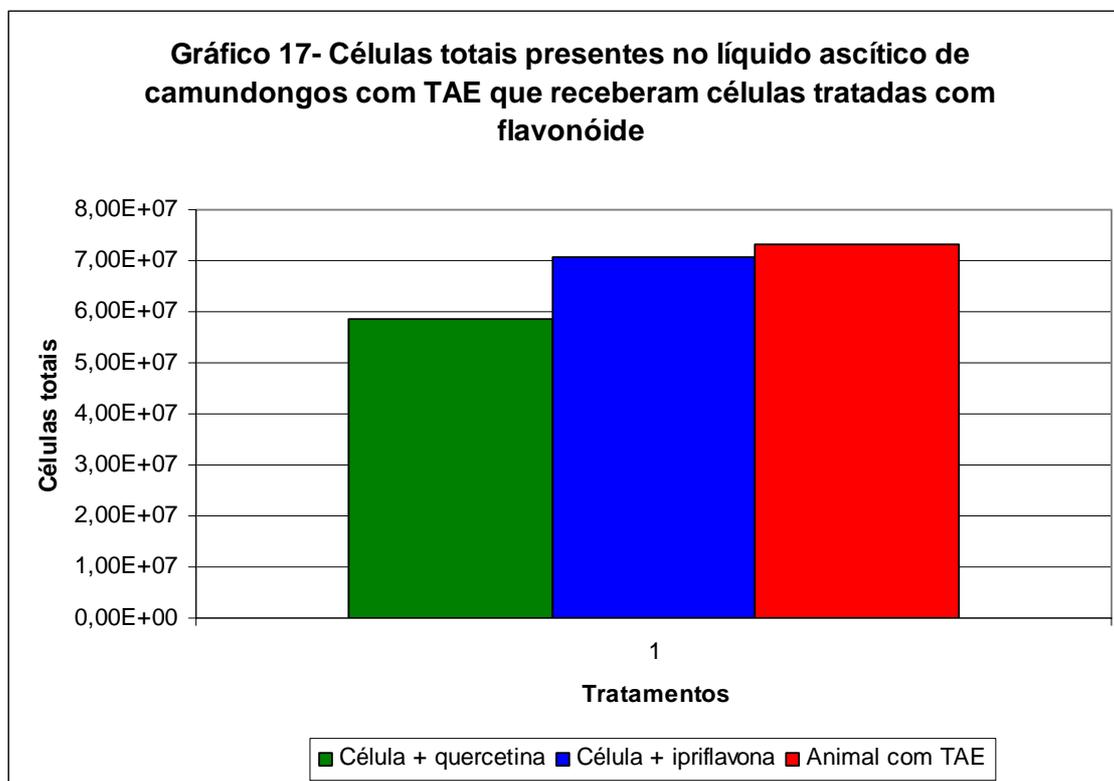
De acordo com os resultados obtidos, o número de células tumorais viáveis foi maior no grupo G1 (animal com câncer) e no grupo G2 (célula + ipriflavona) e esses valores não foram estatisticamente significativos. Os animais do grupo G3 que receberam as células tratadas com o flavonóide quercetina apresentaram menor número de células tumorais viáveis que os grupos G1 e G2 e essa variação foi estatisticamente significativa.

Na tabela 19 e no gráfico 16 pode-se observar os valores médios das células tumorais mortas.



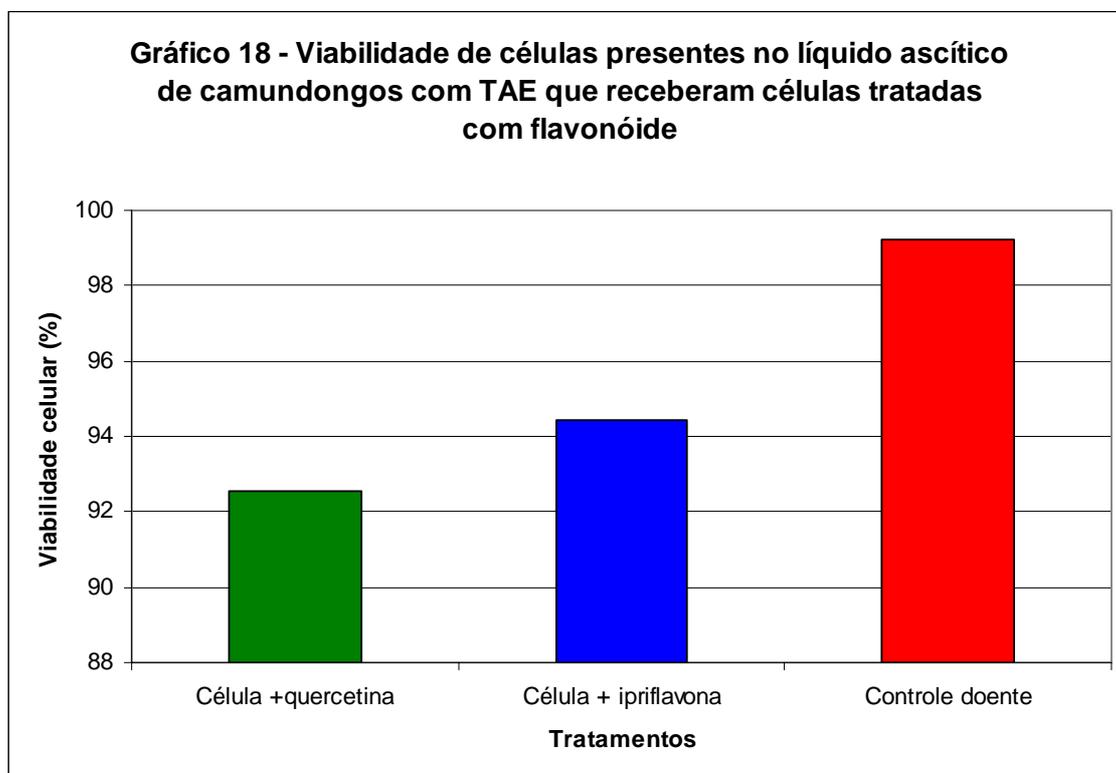
De acordo com resultados obtidos, o grupo G1 apresentou o menor número de células tumorais mortas. Observou-se que o grupo G2 que recebeu as células tratadas com ipriflavona apresentou maior número dessas células quando comparado com o grupo com câncer (G1) e esse valor foi estatisticamente significativo. Observou-se ainda que os animais do grupo tratado com quercetina tiveram menor número de células tumorais mortas presente no líquido ascítico ao ser comparado com G1 e esse valor foi estatisticamente significativo.

Na tabela 19 encontra-se registrado o número de células tumorais totais (células viáveis + células mortas) presentes no líquido ascítico dos camundongos. Esses resultados também podem ser visualizados no gráfico 17.



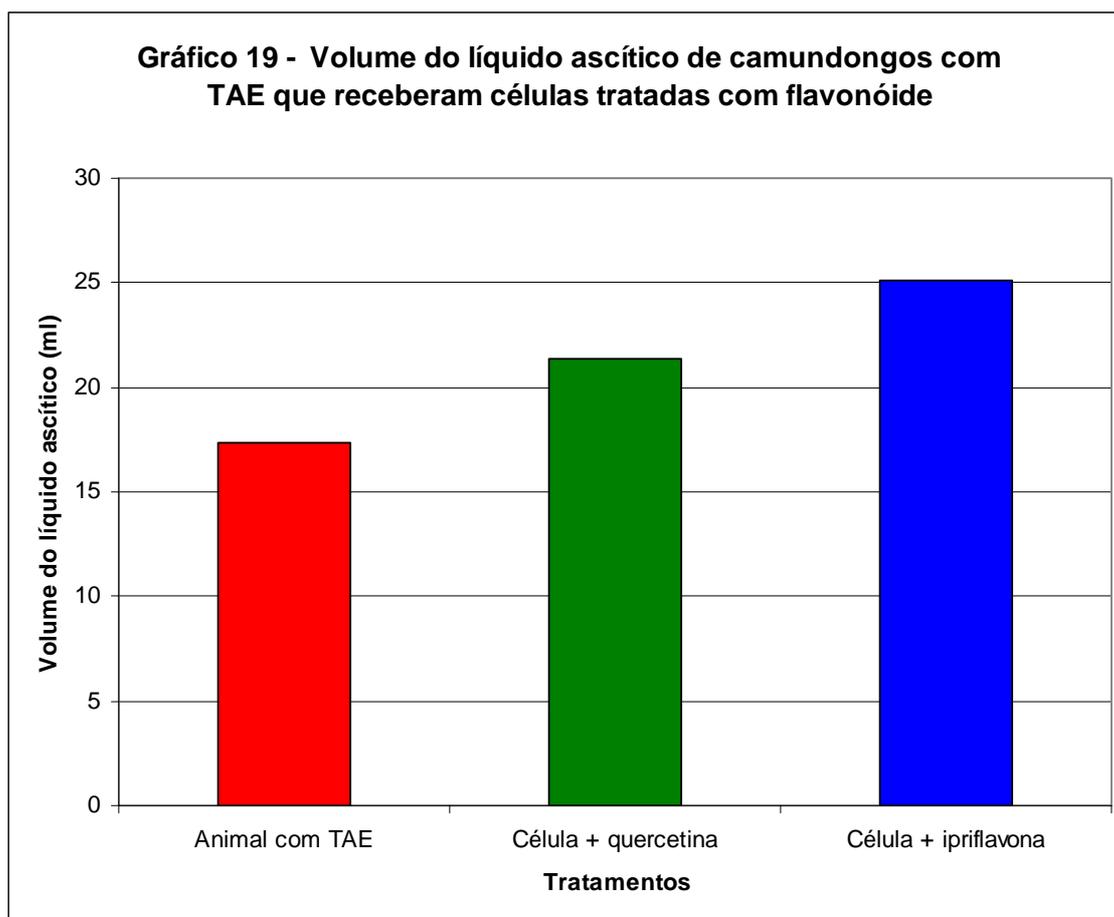
Observou-se que os animais que receberam as células tratadas com quercetina (G3) tiveram o menor número de células tumorais totais e esses valores foram estatisticamente significativos quando comparados com os grupos G2 e G1.

Na tabela 19 e no gráfico 18 encontra-se registrado a viabilidade celular.



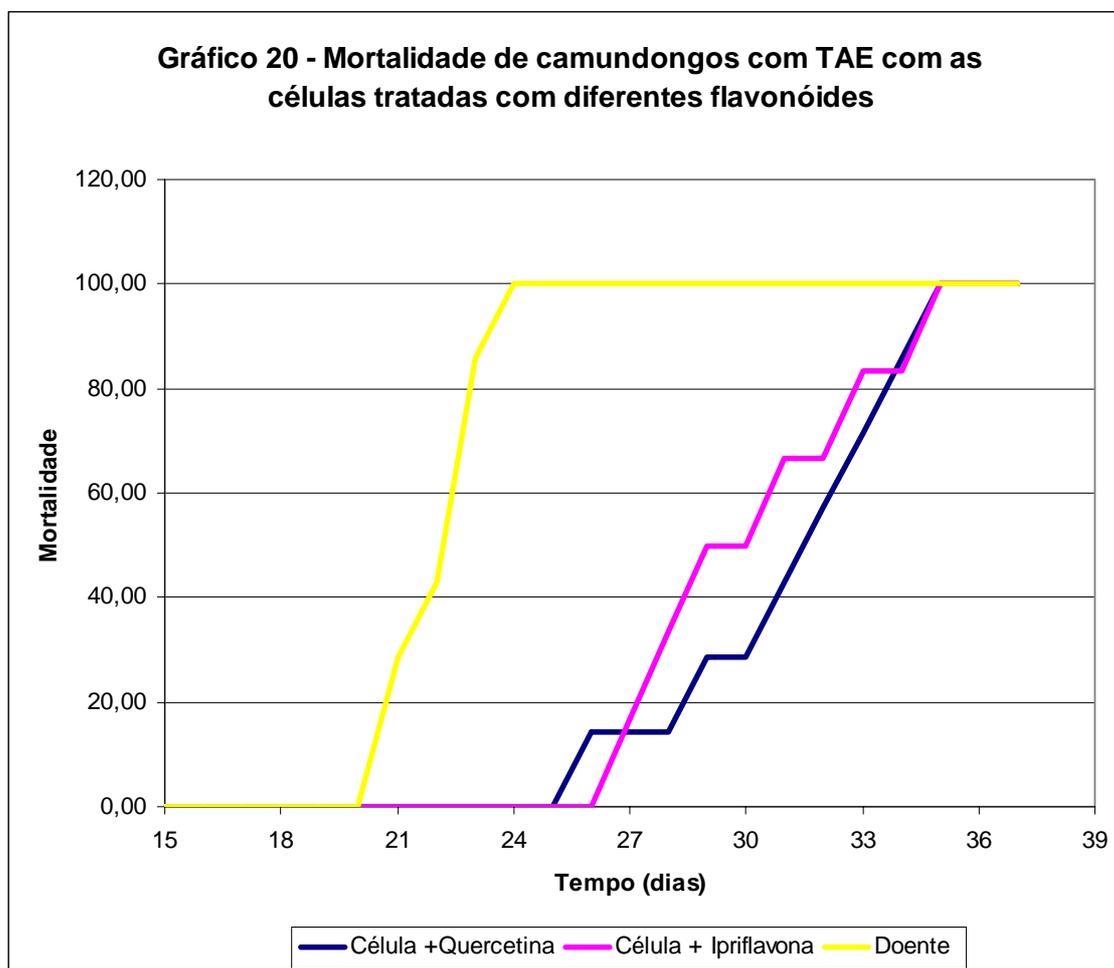
De acordo com os resultados obtidos, os grupos G2 e G3 tiveram a menor percentagem de viabilidade celular. Esses valores quando comparados aos do grupo G1 foram estatisticamente significativos.

Na tabela 19 encontra-se registrado o volume do líquido ascítico dos camundongos. Esses resultados também podem ser visualizados no gráfico 19.



Observou-se que os animais que receberam as células tratadas com a quercetina apresentaram o maior volume de líquido ascítico, e ao comparar esse grupo com os demais (G1 e G2) as variações foram estatisticamente significativas. Ao observar o grupo G2, notou-se os animais desse grupo tiveram o menor volume de líquido ascítico que os do grupo G3 e esses animais (G3) teve o maior número de células mortas.

Os resultados da mortalidade dos camundongos que o tiveram a indução do TAE com as células tratadas com os flavonóides pode ser visualizado no gráfico 19.



De acordo com os resultados obtidos, observou-se que o grupo doente com câncer não tratado, apresentou 80% de mortalidade aos 23 dias. Os animais que receberam as células tratadas com ipriflavona aos 33 dias apresentaram 80% de mortalidade. Os animais do grupo que receberam as células do TAE tratadas com a quercetina por 48 horas tiveram 80% de mortalidade aos 34 dias.

Seria necessário pesquisar em outros períodos experimentais esses mesmo efeitos, e no futuro, no ser humano após estudo de toxicologia.

A análise do tempo de sobrevida dos animais também foi realizada através de cálculos de MST (Tempo médio de sobrevida dos animais) e de %ILS (percentagem de aumento do tempo de sobrevida). Esses resultados podem ser visualizados na tabela 20.

Tabela 20 – Atividade dos flavonóides sobre o tempo de vida de camundongos com TAE

<i>Tratamentos</i>	<i>Varição do tempo de sobrevida (d)</i>	<i>MST (d)^a</i>	<i>ILS (%)^b</i>	<i>T/C (%)^c</i>	<i>Eficácia</i>
Ração	21-24	22,5			
Ração + quercetina	26-34	30,0	33,3	133,3	+
Ração + ipriflavona	27-34	30,5	35,6	135,6	+

a) $MST = (1^{\circ} \text{dia de morte} + \text{ultimo dia de morte}) / 2$;

b) $ILS\% = (MST \text{ grupo tratado} / MST \text{ grupo controle}) - 1 \times 100$;

c) $T/C\% = (MST \text{ grupo tratado} / MST \text{ grupo controle}) \times 100$

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

5.4. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO DE ANIMAIS COM TAE TRATADOS COM FLAVONÓIDES

Foram analisados cortes fígado de três animais de cada grupo, escolhidos ao acaso.

Os animais pertencentes ao grupo tratado apenas com ração e não submetidos à indução do TAE apresentaram em análise histopatológica de fígado características semelhantes ao descrito na literatura como hepatócitos intimamente associados ao arcabouço de vasos sanguíneos (sinusóides). Os núcleos são grandes, esféricos e centrais (figura 10).

Ao analisar o corte de tecido hepático dos animais com TAE que receberam somente ração, figura 11, observou-se a presença de células do TAE aderidas a Cápsula hepática. Foi possível verificar um aumento nos espaços sinusóides com presença de hemácias em seu interior.

O fígado dos animais com TAE que receberam uma dosagem única do quimioterápico Neotaxel[®] por via intravenosa, apresentaram em análise histopatológica uma pequena adesão das células do TAE na Cápsula hepática como pode ser verificado na figura 12. Além disso, pode-se observar a presença de hemácias aderidas às células do TAE. Os espaços sinusóides apresentaram pequenas variações ao comparar com os animais com TAE não tratados.

O fígado dos animais com TAE tratados com 10mg/kg do flavonóide quercetina por 18 dias apresentaram menor quantidade de células do TAE aderidas à Cápsula hepática (figura 13) quando comparado ao grupo de animais com TAE, porém foi maior ao comparar com os animais que receberam o tratamento com o quimioterápico. Observou-se que os espaços sinusóides encontram-se mais dilatados quando comparado ao corte histopatológico dos animais do grupo tratado com Neotaxel, porém não foi possível observar a presença de hemácias em seu interior.

Ao observar o corte de tecido hepático dos animais com TAE que foram tratados com o flavonóide ipriflavona na concentração de 10mg/kg por 18 dias, verificou-se nesse tratamento uma pequena presença de células do TAE. Pode-se observar que os espaços sinusóides apresentam hemácias em seu interior (figura 14).

Quando os animais foram inoculados com as células do TAE previamente tratadas com o flavonóide quercetina, observou-se que a presença das células do TAE na Cápsula hepática do corte fígado (figura 15) foi menor quando comparado ao grupo

com TAE não submetido a nenhum tratamento. Observou-se uma grande adesão de hemácias às células do TAE.

Ao analisar o corte de tecido hepático dos animais que foram inoculados com as células do TAE previamente tratadas com o flavonóide ipriflavona, observou-se a pequena presença das células do TAE aderidas à Cápsula hepática do fígado. Porém, os espaços sinusóides encontram-se mais dilatados do que o tratamento anterior (figura 16).

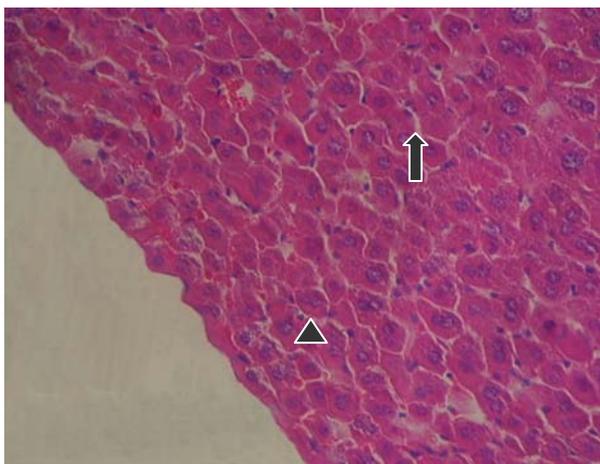


Figura 10- Corte de tecido hepático de animal normal que recebeu ração, onde são observados hepatócitos (▲) e espaço sinusóide (↑). HE. 400X.

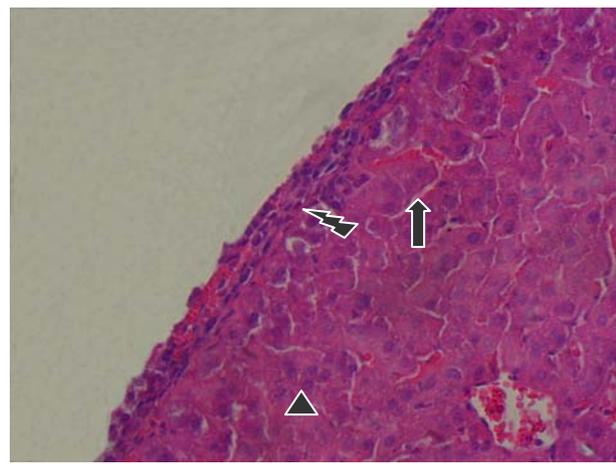


Figura 12- Corte de tecido hepático de animal com TAE que recebeu medicamento Neotaxel®, hepatócitos (▲), espaço sinusóide (↑), e presença de células tumorais aderidas (⚡). HE. 400X.

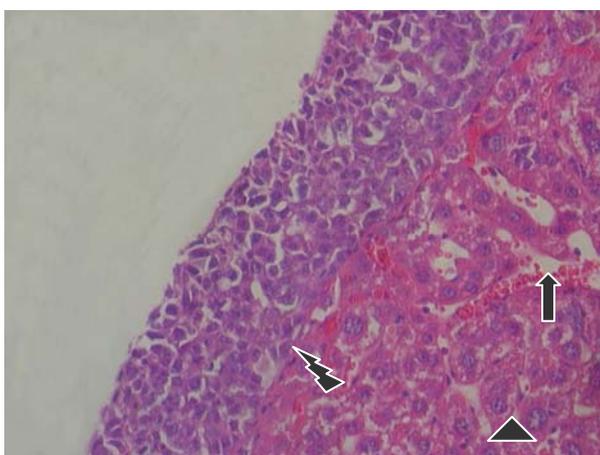


Figura 11 - Corte de tecido hepático de animal com TAE que recebeu ração, onde são observados hepatócitos (▲), espaço sinusóide (↑), e presença de células tumorais aderidas (⚡). HE. 400X.

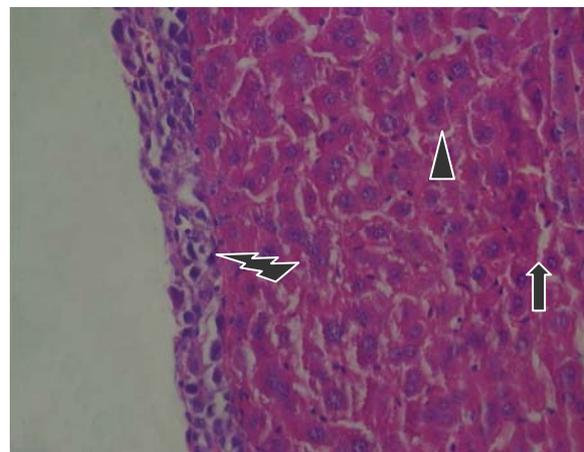


Figura 13 - Corte de tecido hepático de animal com TAE que recebeu o flavonóide quercetina, onde são observados hepatócitos (▲), espaço sinusóide (↑), e presença de células tumorais aderidas (⚡). HE. 400X.

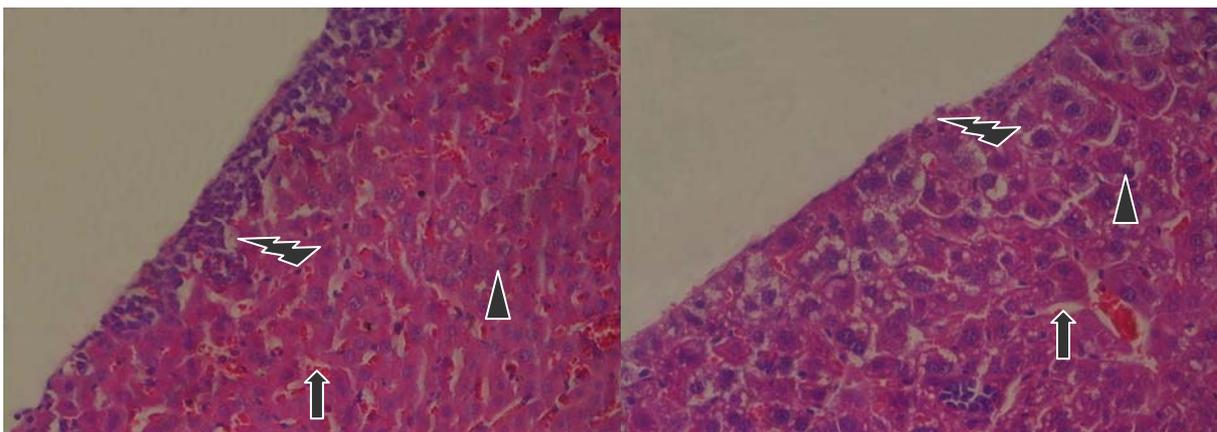


Figura 14 - Corte de tecido hepático de animal com TAE que recebeu o flavonóide ipriflavona, onde são observados hepatócitos (▲), espaço sinusóide (↑), e presença de células tumorais aderidas (⚡). HE. 400X.

Figura 16 - Corte de tecido hepático de animal com TAE em que as células foram tratadas previamente com o flavonóide ipriflavona, onde são observados hepatócitos (▲), espaço sinusóide (↑), e presença de células tumorais aderidas (⚡). HE. 400X.

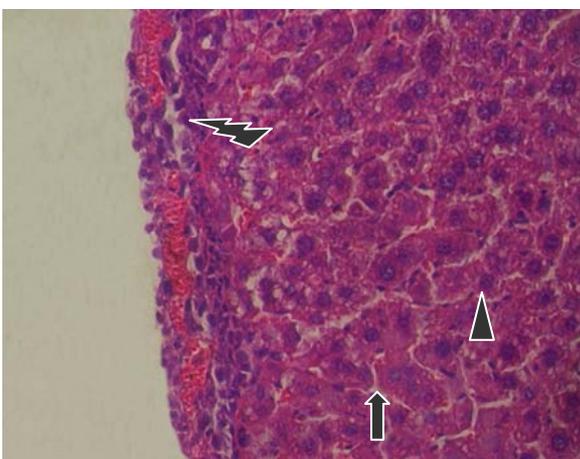


Figura 15 - Corte de tecido hepático de animal com TAE em que as células foram tratadas previamente com o flavonóide quercetina, onde são observados hepatócitos (▲), espaço sinusóide (↑), e presença de células tumorais aderidas (⚡). HE. 400X.

7. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos nesse estudo, observou-se que o modelo animal adotado para a experimentação foi um método simples e reproduzível, no que concerne a transplantação das células do TAE e do tratamento dos animais, porém espécies de animais de porte maior (por exemplo, coelhos), poderiam também ser utilizadas pela facilidade de tratamento e maior quantidade de sangue que possuem, uma vez que tivemos como objetivo quantificar parâmetros sanguíneos.

Os flavonóides possuem vários mecanismos de ação que são importantes na patologia do câncer. Com mais estudos realizados podem se tornar futuros medicamentos, e/ou tratamentos alternativos para o câncer.

Através dos resultados obtidos no experimento de uso de flavonóides na prevenção do TAE, concluiu-se que os flavonóides afetaram diferentemente os parâmetros sanguíneos quantificados. E todos os flavonóides promoveram uma redução na viabilidade das células tumorais presentes no líquido ascítico formado na cavidade abdominal dos animais. Ocorreu uma redução no volume do líquido ascítico dos animais tratados com a associação de quercetina+naringenina.

O tratamento preventivo com os flavonóides quercetina e naringenina possuiu uma atividade antitumoral significativa de acordo com o critério da NCI.

Quando os animais com o tumor ascítico de Ehrlich foram tratados com os flavonóides, também observou-se alterações nos parâmetros sanguíneos avaliados. Porém, sugere-se que a quantificação de marcadores tumorais seja realizada para melhor

caracterizar o estudo. Houve uma redução na viabilidade celular das células do TAE quando os animais foram tratados com a quercetina e a ipriflavona.

No experimento de tratamento das células do TAE com os flavonóides as células do TAE tratadas *in vitro* com os flavonóides quercetina e ipriflavona apresentaram uma redução da viabilidade quando houve um aumento na concentração dos flavonóides. Os animais que receberam células tratadas com os flavonóides quercetina e ipriflavona tiveram alterações nos parâmetros sanguíneos quantificados e redução na viabilidade das células do TAE independente do tratamento.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Pela grande facilidade de transplantação, padronização e crescimento rápido do TAE, este modelo favorece o estudo de associações de outros flavonóides com quimioterápicos.
- Avaliar a presença de marcadores tumorais no soro sanguíneo dos animais;
- Verificar a atuação dos flavonóides sobre a forma sólida do TAE, que possibilitará uma avaliação por um período de tempo maior.
- Estudos *in vitro* para avaliar atuação dos flavonóides sobre o ciclo celular.
- Utilização de outros modelos animais para confirmação dos resultados obtidos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

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

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

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

ARBISER L.J. Regulation of angiogenesis and tumorigenesis. **Seminars in Cancer Biology** v.14 , p79–80, 2004

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

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

BELO, A.V., BARCELO, L.S., FERREIRA, M.A.N., ENNAMANY, R., LEE, W.N.P., BERGAMI-SANTOS, P.C.; MARIANO, M.; BARBUTO, J.A.M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life Sciences**, v. 75, n. 2, p. 245-255, 2004.

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

BOERSMA, B.J., BARNES, S., KIRK, M., WANG, C.C., SMITH, M., KIM, H., PATEL, R., USMAR, V.M.D. Soy isoflavonóides and cancer – metabolism at the target site. **Mutation Research**, v. 480-481, p. 121-127, 2001.

BOROS, L.G. Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor ascites carcinoma cells. **Biochemical and Biophysical Research**, v. 288, p. 658-665,

CAI, Q., RAHN, R; ZHANG, R. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. **Cancer Letters**, v. 119, p. 99-107, 1997.

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

CAPELOZZI, V.L., Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. **J. Pneumol**, v.27, n.6, p.321-8, 2001.

CASAGRANDE, F., DARBON, J.M., effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. **Biochemical Pharmacological**, v.61, p. 1205-1215, 2001.

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

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

COIFMAN, R., WEFORTE, R.V.B., KASAMATSU, T.S., FUKUSIMA, L., SANTORO, I., JAMNIK, S., VIRIRA, J.G.H., CASTRO, M.L. Calcitonina monomérica plasmática e hipercalcemia em pacientes portadores de neoplasias pulmonares. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n., p. 105-8, 1997.

COLE, G.^a, POLAK, J.M., MARANGOS, P.J. Neuron specific enolase as a useful histochemical marker for the neuroendocrine system of the lung. **J. Pathol**, v.132, p. 351-2, 1980.

COLEMAN, R.E. Metastatic bone disease and the role of biochemical markers of bone metabolism in benign and malignant diseases. **Cancer Treatment Reviews**, v.27, p.133-135, 2001b.

COLEMAN, R.E. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. **Cancer Treatment Reviews**, v.27, p.165-176, 2001a.

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

CSOKAY, B., PRAJDA, N., WEBER, G., OLAH, E. Molecular mechanisms in the proliferative action of quercetin. **Life Sciences**, v.60, n.24, p.2157-2163, 1997.

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

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

DATTA,G.K., DAS,T., SA, G. Mechanisms of ancumin-induced apoptosis of Ehrlich's DJURIC, Z., CHEN, G., DOERGE, D.R., HEILBRUN, L.K., KUCUK, O., Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. **Cancer Letters**, v. 172, p. 1-6, 2001.

EISENBERG, A.L.A., KOIFMAN, S..Câncer de Mama: marcadores tumorais revisão de literatura). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.47, n.4, p.377-88, 2001.

ENGEL, J., ECKEL, R., KERR, J. SCHMIDT, M., FURSTENBERGER, G., RICHTER,R., SAVER, H., SENN, H.J., HOLZEL, D.. The process of metastasisation for breast cancer. **European Journal of Cancer**, v.39, p.1794-1806, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

GIBBS, W.W. Raízes do câncer. **Scientific American Brasil**, p. 39-47, ano 2, n.15, 2003.

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

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

GUENGERICH, F.P. Forging the links between metabolism and carcinogenesis. **Mutation Research**, v.488, p.195-209, 2001.

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

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

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

HOLLMAN, P.C.H., TRIJP, J.M.P., MENGELERS, M.J.B., VRIES, J.H.M., KATAN, M.B. Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. **Cancer Letters**, v. 114, p. 139-140, 1997.

HOSSFELD, D.K., SHERMAN, C.D., LOVE, R.R., BOCH, F.X. **Manual de Oncologia Clínica**. 2^a edição, Fundação Oncocentro de São Paulo, 399p, 1997.

IGURA, K., OHTA, T., KURODA, Y., KAJI, K. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. **Cancer letters**. V. 171, p.11-16, 2001.

ISAACS, J.S., XU, W., NECKERS, L.. Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics. **Cancer Cell**, v.3, p.213-217, 2003.

JUNGHANS, T.B., SEVIN, I.F., IONIN, B., SEIFRIED, H.. cancer information resource: digital and online sources. **Toxicology**, v.173, p.13-34, 2002.

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

JÚNIOR. C.B.G; SCHEINER. M.A.M; VASCONCELOS. C.F; DOBBIN. A.J; KLUMBE. E.C; MAIA C.R Detecção da proteína p53 em células leucêmicas por citometria de fluxo e Western blot *Revista Brasileira de Cancerologia* 2004; 50(3): 191-202

KANNO, S., TOMIZAWA, A., HURA, T, et al. Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180- implanted mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, n.3, p.527-530, 2005.

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

KOLPE, U. RAMASWAMY,V., RAO, B.S.S, NAGABHUSHAN, M.. Turmeric and curcumin prevents the formation of mutagenic Maillard reaction products. **International Congress Series**, v.1245, p.327-334, 2002.

KUMMAR, S., SHAFI, N.Q.. Metastatic hepatocellular carcinoma. **Clinical Oncology**, v.15, p.288-294, 2003.

LAMBERTS, J.D., YANG, C.S. Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. **Mutation Research**, v. 523-524, p. 201-208, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

mice. **Life Science**, v. 74, p. 2827-2837, 2004.

MISHRA, S.I., DICKERSON, V., NAJM, W. Phytoestrogens and brast cancer prevention: what is the evidence? **Am J Obstet Gynecol**, v. 188, n. 5, p. 66-70, 2003.

NICOLETTE, C.A., MILLER, G.A..The identification of clinically relevant markers and therapeutic target. **Drug Discovery Today**, v.8, n.1, p.31-38, 2003.

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

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

PACHECO, F.A., PASCHOAL, M.E.M., CARVALHO, M.G.C.. Marcadores tumorais no cancer de pulmão: um caminho para a terapia biológica. **J. Pneumol.**,v.28, n.3, p.143-149, 2002.

PAL, S., CHOUDHURI,T., CHATTOPADHYAY,S., BHATTACHAYA,A., PLATZ, E.A., WILLWTT, W.C., COLDITZ, G.A., RIMM, E.B., SPIEGELMAN, D., GIOVANNUCCI, E.. Proportion of colon cancer risk that might be preventable in a cohort of middle-aged US men. **Cancer Causes Control**, v. 11, p. 579-588, 2000.

POO, L.S., CHEN, Z., TSANG, D.S.C., LEUNG, L.K. Baicalein and genistein display differential actions on estrogen receptor (ER) transactivation and apoptosis in MCF-7 cells. **Cancer Letters**, v. 187, p. 33-40, 2002.

RASHMI, R., KUMAR, T.R.S., KARUNAGARAN,D.. Human colon cancer cells differ in their sensitivity to curcumin-induced apoptosis and heat shock protects them by inhibiting the release of apoptosis-inducing factor and caspases. **FEBS Letters**, v. 538, p.19-24, 2003.

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

RIZZO, M.S. **Colonização preferencial e disseminação do tumor transplantável de ehrlich em camundongos.** São Paulo, 2000. IOOp. Dissertação (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo.

ROUDIER, M., TRUE, L.D., HIGANO, C.S., VESSELLE, H., ELLIS, W., LANGE, P., VESSELLA, R.. Phenotypic heterogenicity of end-stage prostate carcinoma metastatic to bone. **Human Pathology**, v.34, n.6, p. 646-653, 2003.

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

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

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

SARAIVA, G.L., CASTRO, M.L.. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arq. Brás. Endocrnol. Metab.**, v.46, n.1, p.72-78, 2002.

SCHULER M; GREEN R.D. Transcription, apoptosis and p53: catch-22. **Trends in Genetics** Vol.21 No.3 March 2005

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

SETLOW, R.B.. Human cancer: etiologic agents/dose response/DNA repair/cellular and animal models. **Mutation Research**, GELDERBLOM, 2002v.477, p.1-6, 2001.

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

SHEIKE, N., WANIBUCHI, H. MORIMURA, K., WEI, M., NISHIKAWA, T., HIRATA, K., YOSHIKAWA, J., FUKUSHIMA, S. Enhancement of lung carcinogenesis by nonylphenol and genistein in a F344 rat multiorgan carcinogenesis model. **Cancer Letters**, v. 192, p. 25-36, 2003.

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

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

SRINIVAS, P.R., KRAMMER, B.S., SRIVASTAVA, S.. Trends in biomarker research for cancer detection. **The Lancet Oncology**, v.2, p. 698-704, 2001.

STEVENS, A., LOWE, J. **Histologia Humana**. 2ª edição, São Paulo: Manole, 2001

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

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

TAMASICH, F.D.S., AUGUSTO, V.C., LUZ, M.A., DIAS, L.A. , KATO, M. Correlação entre os marcadores tumorais CEA e CA 72-4 e a profundidade de invasão no câncer gástrico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.48, n.1, p.57-62, 2002.

TANAKA, E., YAMASHITA, J., HAYASHI, N., OGAWA, M.. A pulmonary metastatic model of human non-small cell lung carcinoma cells in SCID mice. **International Congress Series**, v.1255, p.239-242. 2003.

TEMPLE, N.J., GLADWIN, K.K., Frutis, vegetables, and the prevention of cancer: research challenges. **Nutrition**, v.19, p. 467-470, 2003.

TSUCHIYA, Y, SAWADA. S., YOSHIOKA, I., OHASHI, Y., MATSUO, M., HARIMAYA, Y., TSUKADA, K., SAIKI, I.. Increased surgical stress promotes tumor metastases. **Surgery**, v.133, n.5, p.547-555, 2003.

VILELA, M.J., MARTINS, M.L., BRAGA, J.L. Câncer – Biologia, Fractais e Inteligência Artificial. **Ciência Hoje**, p.16-25, v. 24, n. 141, 1998.

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

WANG, J., ELTOUM, I., LAMARTINIERE, C.A. Dietary genistein suppresses chemical induced prostate cancer in Lobund-Wistar rats. **Cancer Letters**, v. 186, p. 11-18, 2002.

WATANABE, S., UESUGI, S., KIKUCHI, Y. Isoflavones for prevention of cancer, cardiovascular diseases, gynecological problems and possible immune potentiation. **Biomed Pharmacother**, v. 56, p. 302-312, 2002.

WEI, H., BOWEN, R., CAI, Q., BARNES, S., WANG, Y. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein, **P.S.E.B.M.**, V. 208, P. 124-130, 1995.

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

WELSCH, U. **Sobotta – Atlas de Histologia**. 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.152-155

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

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

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

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

YOKOZAWA, T., DONG, E., LIU, Z.W., SHIMIZIU, M. Antioxidant activity of flavones and falvonols *in vitro*. **Phytotherapy Research**, vb. 11, p. 446-449, 1997.

ZGLINICKI, T. Telomeres, telomerase and the cancer cell: an introduction. **Cancer Letters**, v.194, p. 137-138, 2003.

ZHANG, W.W., Tumor markers: discovery to practice. **Drug Discovery Today**, v.8, n.10, p. 441-443, 2003.