TEREZA CRISTINA DA SILVA

Efeitos anti-neoplásicos da raiz de *Pfaffia paniculata* (Ginseng brasileiro) no modelo de hepatocarcinogênese murina e em cultura de células de hepatocarcinoma humano

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profª Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli

São Paulo

2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

8/1
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
18/2/08

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1953
FMVZ

Silva, Tereza Cristina da

Efeitos anti-neoplásicos da raiz de *Pfaffia paniculata* (Ginseng brasileiro) no modelo de hepatocarcinogênese murina e em cultura de células de hepatocarcinoma humano / Tereza Cristina da Silva. – São Paulo: T. C. Silva, 2008.

178 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli.

1. Plantas medicinais. 2. Neoplasias. 3. HepG2. 4. Ciclo celular.
5. Proliferação celular. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da *Pfaffia paniculata* (ginseng brasileiro) sobre lesões preneoplásicas em camundongos submetidos a modelo de hepatocarcinogênese.", Protocolo nº 83/2002, sob a responsabilidade da ProfªDrª Maria Lúcia Zaidan Dagli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado pela referida Comissão, em sessão de 17/04/2002.

(We certify that the Research "Effects of *Pfaffia paniculata* (brazilian ginseng) on Preneoplastic Lesions Induced in Mice by a Hepatocarcionogenesis Model" protocol number 83/2002, under the responsibility of ProfªDrª Maria Lúcia Zaidan Dagli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 04/17/2002 meeting.

São Paulo, 17 de abril de 2002

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos efeitos de frações purificadas do resíduo butanólico das raízes de *Pfaffia paniculata* sobre o crescimento da linhagem HepG2 de carcinoma hepatocelular humano", protocolado sob o nº1240/2007, não utilizando animais, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião da referida Comissão do dia 12 de dezembro de 2007.

We certify that the Research "Evaluation of effects of purified fractions of *Pfaffia paniculata* roots butanolic residue on the growth of human hepatocellular carcinoma HepG2 cell line", protocol number 1240/2007, under the responsibility Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 12/12/2007.

São Paulo, 14 de dezembro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Tereza Cristina da

Título: Efeitos anti-neoplásicos da raiz de *Pfaffia paniculata* (Ginseng brasileiro) no modelo de hepatocarcinogênese murina e em cultura de células de hepatocarcinoma humano

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Aos meus pais João Pires e Joana do Carmo da Silva

Vocês são responsáveis pelo melhor de mim, pela minha força, determinação e pelo amor que tenho por Deus e pelas pessoas; sem vocês não seria quem sou, não teria o que tenho, não estaria onde estou e não sonharia tanto quanto ainda sonho. Sem vocês eu não seria, apenas estaria...

Às minhas irmãs Bernadete, Vera, Ana e Juliana pela alegria, companheirismo e paciência; vocês fazem parte do meu universo de paz e tranquilidade, vocês são minha família, obrigada pelo carinho.

Ao meu sobrinho Gabriel, que está chegando...

A Deus

Porque os anjos se juntaram à luz que colocou a minha volta e agora sei que a
vida é perfeita.

À minha orientadora a Prof.^a Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli por ter me acompanhado durante toda a minha formação científica, pela doçura e paciência com as quais sempre me tratou e por toda a confiança que depositou em mim.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (proc. nº 06/51678-3) e
à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -CAPES pelo apoio
financeiro, sem o qual seria inviável a realização deste trabalho

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **Profº Dr. Gokithi Akisue** por ter acreditado nos objetivos deste projeto e confiado na seriedade do nosso grupo de pesquisa, fornecendo as raízes da planta *Pfaffia paniculata*, uma valiosa e inestimável ajuda, sem a qual, seria impossível a realização deste trabalho.

À **Profª Dra Ana Paula de Melo Loureiro da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas-USP**, pela gentileza em fornecer a linhagem de células de hepatocarcinoma humano HepG2, facilitando o início deste trabalho.

À **Profª Drª Silvana Lima Górnaiak do Depto de Patologia e Toxicologia-FMVZ** pela ajuda com a manipulação da ração, fornecendo material humano e conhecimento científico.

À **Profª Dra. Mitsue Haraguchi do Instituto Biológico** e pelo apoio técnico e por compartilhar tempo e conhecimento, peças importante para a realização deste projeto.

Ao meu colega, amigo e irmão **Bruno Cogliati**, por estar presente em cada linha deste trabalho, por ter compartilhado todas as minhas dificuldades como se fossem suas, pela imparcialidade com a qual se pronunciou sempre que requisitei seu apoio profissional e intelectual, pela amizade, carinho e cumplicidade; serei eternamente grata.

À colega e amiga **Márcia Kazumi Nagamine**, pela companhia, apoio técnico e intelectual fornecidos com dedicação e paciência durante toda a etapa experimental.

À colega e amiga **Andréia Oliveira Latorre**, pelo desprendimento com o qual compartilha seu conhecimento, obrigada pela ajuda técnica e pelo interesse em resolver problemas que não eram seus.

À **Cyntia Esteves de Lima** por compartilhar seu conhecimento técnico, pela disposição em acompanhar toda a etapa molecular e pela simpatia e carinho que sempre me dispensou.

Ao colega e amigo **Heidge Fukumasu**, pela preocupação em resolver minhas dúvidas e pela seriedade com a qual me ajudou sempre que precisei.

À colega e amiga **Patrícia Matsuzaki**, por ter sido responsável pelo início deste ciclo de pesquisas com plantas medicinais, pelo carinho e por dar a certeza de que sempre poderei contar com você.

À colega e amiga **Mirela Aline Real de Lima** pela amizade, carinho e maturidade profissional com a qual me ajudou.

À colega **Mônica Sakai**, porque mesmo longe se colocou a disposição para ajudar.

Aos colegas e amigos do **Laboratório de Oncologia Experimental Lucas, Juliana, Daniel, Luise, Tarso e Marcelo** pela amizade, preocupação e auxílio presentes sempre que solicitei.

À minha amiga **Silvia Catarina Salgado Oloris**, pelas palavras de conforto e estímulo, sinto sua falta.

Ao **Paulo César Raspantini** do **Centro de Pesquisas em Toxicologia – CEPTOX-Pirassununga**, pela atenção e eficiência que sempre dispensou às nossas solicitações.

À **Profª Dra. Nívea Lopes de Souza** do **Depto de Patologia e Toxicologia-FMVZ** pela orientação e esclarecimentos no manejo com os camundongos.

À **Claudia Madalena C. Mori** pelas sugestões e pela sincera disposição em ajudar.

Aos funcionários do biotério **Herculano, Rosiris e Idalina**, pela carinhosa e paciente acolhida e pelo auxílio no manejo com os camundongos.

À **Priscila, Ricardo e Magali**, funcionários do **Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do VPT**, pela atenciosa e paciente ajuda.

A **Cláudio Arroyo e Luciano Antas Bugalho**, funcionários do **Laboratório de Histopatologia do VPT**, pela cordialidade e paciência que sempre me dispensaram.

À amiga **Shirlei Meire da Silva** pela alegria e estímulo.

À **Claúdia, Deise e Joana**, secretárias da Pós-Graduação por todo o auxílio que me deram.

Às secretárias do **Departamento de Patologia, Claúdia, Sandra e Cristina**, pelos serviços prestados.

Às **bibliotecárias** da **FMVZ-USP** pelo empenho e competência com os quais avaliaram este trabalho.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA

O que for a profundidade do teu ser, assim será teu desejo.

O que for o teu desejo, assim será tua vontade.

O que for a tua vontade, assim serão teus atos.

O que forem teus atos, assim será teu destino.

RESUMO

SILVA, T. C. **Efeitos anti-neoplásicos da raiz de *Pfaffia paniculata* (Ginseng brasileiro) no modelo de hepatocarcinogênese murina e em cultura de células de hepatocarcinoma humano** [Antineoplastic effects of the roots of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) in a murine hepatocarcinogenesis model and in human hepatocarcinoma cells.]. 2008. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A raiz pulverizada de *Pfaffia paniculata* e seu extrato butanólico apresentam propriedades antineoplásicas, quimiopreventivas e antiangiogênicas, onde muitos indícios conferem às saponinas triterpenóides presentes nestas raízes as propriedades antitumorais observadas. Sabe-se que saponinas de diversos tipos de plantas possuem capacidade de interferir diretamente no ciclo celular de células tumorais. Assim, considerando os efeitos inibitórios das raízes e extratos de *P. paniculata* sobre a proliferação celular, o objetivo deste trabalho foi compreender os mecanismos envolvidos na ação quimiopreventiva desta raiz, tanto na fase de iniciação da carcinogênese hepática, quanto sobre células tumorais já estabelecidas. Inicialmente, foram avaliados os efeitos de diferentes concentrações da raiz em pó de *P. paniculata* adicionada à ração em camundongos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese, pela análise da proliferação celular, indução da apoptose e a comunicação intercelular hepática. Sequencialmente, foram avaliados os efeitos das frações purificadas do extrato butanólico destas raízes sobre linhagem de células de carcinoma hepatocelular humano. Neste experimento foram analisadas a influência do tratamento sobre a viabilidade celular, fases e proteínas do ciclo celular, proliferação e presença de morte celular. No modelo de hepatocarcinogênese o tratamento com a raiz reduziu a proliferação celular, aumentou a apoptose e desencadeou processo inflamatório crônico em intensidades dependentes da concentração testada e não afetou a comunicação intercelular. Estes resultados indicam que os efeitos quimiopreventivos da *P. Paniculata* são decorrentes do controle da proliferação celular e apoptose, e são diretamente influenciados pela concentração da raiz. No experimento *in vitro* o tratamento reduziu a concentração das células vivas sem aumentar a concentração de células mortas, diminuiu a porcentagem de células na fase G2 do ciclo celular, reduziu a expressão dos genes das proteínas ciclinas D1, E e CDK6 e aumentou a expressão de p27, e não induziu apoptose. Estes resultados mostraram que a redução na concentração de células observadas após o tratamento com a fração do extrato butanólico de *P. paniculata* não foi decorrente de indução de apoptose. O tratamento parou o ciclo celular das células tumorais HepG2 em G1, inibindo proteínas importantes para a progressão do ciclo

e estimulando a expressão de p27 um conhecido gene inibidor de CDKs. Os efeitos antiproliferativos observados no experimento *in vivo* em camundongos, reproduziram-se *in vitro* em células tumorais humanas, o que pode indicar que as propriedades antineoplásicas anteriormente observadas não são espécie específica. Em linhas gerais, as raízes e/ou as frações do extrato butanólico obtido a partir das raízes de *P. paniculata* apresentam propriedades antineoplásicas por inibir a proliferação celular e induzir apoptose *in vivo* e por parar o ciclo celular *in vitro*. Estes resultados consagram as propriedades antineoplásicas de *Pfaffia paniculata* e motivam o desenvolvimento de mais estudos sobre as suas potencialidades.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Neoplasias. HepG2. Ciclo Celular. Proliferação Celular.

ABSTRACT

SILVA, T. C. Antineoplastic effects of the roots of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) in a murine hepatocarcinogenesis model and in human hepatocarcinoma cells. [Efeitos anti-neoplásicos da raiz de *Pfaffia paniculata* (Ginseng brasileiro) no modelo de hepatocarcinogênese murina e em cultura de células de hepatocarcinoma humano] 2008. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The powdered roots of *Pfaffia paniculata* and their butanolic extract present antineoplastic, chemopreventive and antiangiogenic properties, and many evidences suggest that the triterpenoid saponins are the responsible for these properties. It is well known that saponins from several types of plants have the capacity to directly interfere on the tumor cell cycle. Therefore, considering the inhibitory effects of the roots and extracts of *P. paniculata* on cell proliferation, the aim of this study was to search for the mechanisms involved in the chemopreventive effects of this root, both in the initiation phase of the hepatocarcinogenesis and on tumor cell lineage. Initially, the effects of different concentrations of the powdered root of *P. paniculata* added to the mouse food were evaluated in mice submitted to hepatocarcinogenesis model. Cell proliferation, induction of apoptosis, and hepatic intercellular communication were evaluated. The effects of the purified fractions of the butanolic extract of these roots were then evaluated in human hepatocarcinoma cells. In this experiment, the influence of the treatment on cell viability, phases and proteins of cell cycle, cell proliferation and cell death were evaluated. In the hepatocarcinogenesis model, the treatment with the root decreased cell proliferation, increased apoptosis and induced a chronic inflammatory process dependent on the concentration tested, and did not affect cell communication. These results indicate that the chemopreventive effects of *P. Paniculata* are apparently dependent on the control of cell proliferation and apoptosis and are directly influenced by the concentration of the root. In the *in vitro* treatment, it has been observed a reduction in the concentration of live cells without increasing the concentration of dead cells, decreased the level of G2 phase cells, reduced the expression of proteins cyclins D1, E and CDK6, increased the expression of p27, and did not induce apoptosis. These results showed that the reduction in the concentration of cells after the treatment with the butanolic extract of *P. paniculata* was not due to induction of apoptosis. The treatment inhibited the progression of the cell cycle of HepG2 cells in phase G1, by the inhibition of the expression of proteins that are important to the progression of the cycle, and stimulating the expression of p27, a known inhibitor of CDKs. The antiproliferative effects observed in the *in vivo* experiments

were repeated in the *in vitro* study with human tumor cells. This may indicate that the antineoplastic properties previously observed are not species-specific. In conclusion, the roots and/or butanolic extract obtained from *P. paniculata* present antineoplastic properties due to inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis *in vivo*, and due to the cell cycle arrest *in vitro*. These results reinforce the antineoplastic properties of *Pfaffia paniculata* and motivate the development of more studies focusing on its antineoplastic potentials.

Key words: Medicinal plants. Neoplasias. HepG2. Cell Cycle. Cell Proliferation.

LISTA DE ABREVIATURAS

AgNO ₃	Nitrato de prata
CDK.....	Proteína ciclina dependente de quinase
CKI.....	Proteína inibidora de ciclina de quinase
CO ₂	Dióxido de Carbono
CT ⁻	Grupo controle negativo (experimento de hepatocarcinogênese)
CT ⁺	Grupo controle positivo (experimento de hepatocarcinogênese)
CT-DMSO.....	Culturas tratadas com DMSO sem a fração
Cx	Conexinas
CEPTOX	Centro de Pesquisa em Toxicologia
CT	Grupo controle
DEN	Dietilnitrosamina
DMEM	Meio DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Médium
DMEM+10%	Meio DMEM+10% de soro fetal bovino
DMSO	Dimetilsufóxido
EGCG.....	Epigallocatequin-3-galato
EtBr.....	Brometo de Etídeo
g.....	<i>gramas</i>
G1.....	Fase G1 do ciclo celular
G2.....	Fase G2 do ciclo celular

HE	Hemataxilina e eosina
HepG2.....	Linhagem de células tumorais de hepatocarcinoma humano
H.....	Hidrogênio
hs	Horas
kDa.....	Quilodalton
kg	Quilograma
L.....	Litro
LSAB.....	<i>Labeled streptavidin-biotin complex"</i>
M.....	Molar
mA.....	Miliamperagem
mg	Miligrama
µg	Micrograma
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min.....	Minuto
µl	Microlitro
mL.....	Mililitro
µm	Micrômetro
mm	Milímetro
mm ²	Milímetros quadrados
mM.....	Milimolar
n	Número de amostras
NaCl	Cloreto de Sódio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio

Ng.....	Nanograma
NH ₄ NO ₃	Nitrato de Amônio
PBS	<i>Phosphate buffered solution</i>
PCNA.....	Proliferating cell nuclear antigen
R ₁	Radical 1
R ₂	Radical 2
R _f	Fator de retenção
RT-PCR.....	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
rpm	Rotações por minuto
SDS.....	Dodecil sulfato de sódio
TAE.....	Solução de Tris-EDTA-Ácido acético
TE.....	Solução de Tris-EDTA
Tris-HCl.....	Solução de Tris-Ácido Clorídrico
Tween 20.....	Polioxietilenosorbitan monolaurato
V.....	Voltagen
ZnSO ₄	Sulfato de Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	28
2	OBJETIVOS.....	30
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
2.2.1	Modelo de hepatocarcinogênese em camundongos tratados com diferentes concentrações da raiz em pó de <i>P. paniculata</i> adicionadas à ração.....	30
2.2.2	Frações purificadas do extrato butanólico da raiz de <i>P. paniculata</i> sobre o crescimento da linhagem de carcinoma hepatocelular humano HepG2	31
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	32
3.1	PROPRIEDADES DAS DROGAS QUIMIOPREVENTIVAS.....	32
3.2	PLANTAS COMO FONTE DE DROGAS ANTICÂNCER.....	35
3.2.1	Os fitoquímicos.....	36
3.3	ALVOS CELULARES DOS QUIMIOPREVENTIVOS.....	37
3.3.1	Mecanismos de bloqueio da iniciação celular – ação antimutagênica.....	37
3.3.1.1	Inibição da biotransformação.....	38
3.3.2	Mecanismos de inibição da fase de promoção.....	43
3.3.2.1	Estresse oxidativo e inflamação.....	44
3.3.2.1.1	TNFα, COX-2, NF-κB e AP-1.....	45
3.3.2.2	O receptor de fatores de crescimento HER.....	51
3.3.2.3	Vias de transdução de sinal - MAPK, PI3K, AKT, Ras, PTEN e mTOR...	53
3.3.2.4	Ciclo celular.....	59

3.3.2.4.1	<i>Fase G1</i>	60
3.3.2.4.2	<i>Checkpoint G1</i>	61
3.3.2.4.3	<i>Fase S</i>	62
3.3.2.4.4	<i>Fase G2</i>	62
3.3.2.4.5	<i>Checkpoint G2</i>	63
3.3.2.4.6	<i>Fase M</i>	63
3.3.2.4.7	<i>Checkpoint mitótico</i>	64
3.3.2.4.8	<i>Ciclo celular e quimioprevenção</i>	65
3.3.2.5	Processo apoptótico.....	66
3.3.2.5.1	<i>Regulação do processo apoptótico</i>	69
3.3.2.5.2	<i>Quimioprevenção e apoptose</i>	70
3.3.2.6	Controle da comunicação inter celular - junções comunicantes do tipo gap	71
3.3.2.6.1	As junções comunicantes do tipo gap e o câncer.....	75
3.3.2.6.2	<i>Quimioprevenção e junções comunicantes do tipo gap</i>	75
3.4	<i>PFIAFFIA PANICULATA</i>	77
3.4.1	Saponinas e o câncer	81
4	MATERIAL E MÉTODOS	84
4.1	EXPERIMENTO 1 – EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA RAIZ EM PÓ DE <i>P. PANICULATA</i> ADICIONADAS À RAÇÃO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE HEPATOCARCINOGENESE.....	84
4.1.1	Animais	84
4.1.2	<i>Pfaffia paniculata</i> - Ração Experimental	85
4.1.3	Modelo de hepatocarcinogênese	85
4.1.4	Administração do carcinógeno e formação dos grupos	87
4.1.5	Delineamento Experimental	87

4.1.6	Determinação do Índice de Atividade Histológica Hepático - Exame	
	Histopatológico.....	87
4.1.7	Avaliação da proliferação celular - Imuno-histoquímica para PCNA.....	89
4.1.8	Avaliação da indução de apoptose - Contagem dos corpúsculos apoptóticos .	89
4.1.9	Avaliação da indução de apoptose e danos ao DNA - Técnica do cometa	
	alcalino	90
4.1.10	Avaliação da comunicação intercelular.....	91
4.1.10.1	Método da transferência de corante fluorescente <i>lucifer yellow</i>	91
4.1.10.2	Imunofluorescência para conexina 32.....	92
4.1.10.3	<i>Western blot</i> para conexinas 26 e 32.....	93
4.1.10.3.1	<i>Extração das proteínas do tecido hepático.....</i>	93
4.1.10.3.2	<i>Técnica de western blot.....</i>	93
4.1.10.4	Avaliação da expressão gênica das conexinas 26 e 32 por PCR em tempo real.....	94
4.1.10.4.1	<i>Extração de RNA total.....</i>	94
4.1.10.4.2	<i>Quantificação e determinação da integridade do RNA total.....</i>	94
4.1.10.4.3	<i>Transcrição reversa.....</i>	95
4.1.10.4.4	<i>Primers e probes.....</i>	96
4.1.10.4.5	<i>Quantificação relativa por PCR em tempo real.....</i>	96
4.2	EXPERIMENTO 2 – EFEITOS DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DO EXTRATO	
	BUTANÓLICO DA RAIZ DE <i>P. PANICULATA</i> SOBRE O CRESCIMENTO DA	
	LINHAGEM DE CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO HEPG2	97
4.2.1	A linhagem de carcinoma hepatocelular humano HepG2.....	97
4.2.2	Cultivo e manutenção da linhagem de carcinoma hepatocelular humano	
	HepG2.....	97

4.2.3	Obtenção das frações a partir do extrato butanólico das raízes de <i>P.</i>	
	<i>paniculata</i>	98
4.2.3.1	Análise das frações em cromatografia de camada delgada.....	99
4.2.4	Curva de crescimento da HepG2	99
4.2.5	Avaliação da viabilidade celular	99
4.2.6	Determinação do solvente das frações	100
4.2.6.1	Preparo das culturas.....	101
4.2.6.2	Efeito dos solventes sobre a viabilidade celular.....	101
4.2.7	Tratamento com as frações - determinação das frações e das concentrações a serem testadas	101
4.2.7.1	Preparo e tratamento das culturas.....	102
4.2.7.2	Efeito das frações sobre a viabilidade celular.....	102
4.2.8	Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo	102
4.2.8.1	Preparo das culturas.....	102
4.2.8.2	Preparo das amostras e análise no citômetro de fluxo.....	103
4.2.8.3	Análise dos dados obtidos com a citometria de fluxo.....	103
4.2.9	Avaliação da expressão gênica das proteínas p27, ciclinas D1, D3, e E, CDK2, CDK4 e CDK6 por PCR em tempo real	104
4.2.9.1	Preparo das culturas.....	104
4.2.9.2	Extração de RNA.....	104
4.2.9.2.1	<i>Determinação da integridade e quantificação do RNA total</i>	105
4.2.9.2.2	<i>Transcrição reversa</i>	105
4.2.9.2.3.	<i>Primers e probes</i>	105
4.2.9.2.4	<i>Quantificação relativa em PCR em tempo real</i>	106
4.2.10	Avaliação da indução de apoptose	106

4.2.10.1	Avaliação morfológica da presença de morte celular pela técnica de laranja de acridina/brometo de etídeo.....	106
4.2.10.2	Avaliação da degradação do DNA – Técnica do DNA <i>smear</i>	107
4.2.10.2.1	<i>Preparo das culturas</i>	107
4.2.10.2.2	<i>Extração do DNA das culturas celulares</i>	107
4.2.10.2.3	<i>Quantificação do DNA</i>	108
4.2.10.2.4	<i>Avaliação da degradação do DNA – DNA smear</i>	108
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	109
5	RESULTADOS	110
5.1	EXPERIMENTO 1 – EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA RAIZ EM PÓ DE <i>P. PANICULATA</i> ADICIONADAS À RAÇÃO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE HEPATOCARCINOGÊNESE	110
5.1.1	Determinação do Índice de Atividade Histológica Hepático - Exame Histopatológico	110
5.1.2	Avaliação da proliferação celular e indução da apoptose - Imuno-histoquímica para PCNA e contagem dos corpúsculos apoptóticos	112
5.1.3	Avaliação da indução de apoptose e danos ao DNA - Técnica do cometa alcalino	115
5.1.4	Avaliação da comunicação intercelular	116
5.1.4.1	Método da transferência do corante fluorescente <i>lucifer yellow</i>	116
5.1.4.2	Imunofluorescência para conexina 32.....	118
5.1.4.3	<i>Western blot</i> e RT-PCR para conexinas 26 e 32.....	119
5.2	EXPERIMENTO 2 – EFEITOS DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DO EXTRATO BUTANÓLICO DA RAIZ DE <i>P. PANICULATA</i> SOBRE O CRESCIMENTO DA LINHAGEM DE CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO HEPG2	122

5.2.1	A linhagem de carcinoma hepatocelular humano HepG2.....	122
5.2.2	Curva de crescimento da HepG2.....	122
5.2.3	Determinação do solvente das frações.....	123
5.2.4	Tratamento com as frações - determinação das frações e das concentrações a serem testadas	124
5.2.4.1	Análise em cromatografia de camada delgada.....	130
5.2.5	Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.....	131
5.2.5.1	Análise por citometria de fluxo.....	131
5.2.6	Avaliação da expressão gênica das proteínas p27, ciclinas D1, D3, e E, CDK2, CDK4 e CDK6 por PCR em tempo real.....	132
5.2.7	Avaliação da indução de apoptose pela presença de morte celular e degradação do DNA	134
5.2.7.1	Avaliação morfológica da presença de morte celular pela técnica de laranja de acridina/brometo de etídeo.....	134
5.2.7.2	Avaliação da degradação do DNA pela técnica do DNA <i>smear</i>	137
6	DISCUSSÃO.....	138
7	CONCLUSÃO.....	146
7.1	EXPERIMENTO 1 – EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA RAIZ EM PÓ DE <i>P. PANICULATA</i> ADICIONADAS À RAÇÃO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE HEPATOCARCINOGENÊSE.....	146
7.2	EXPERIMENTO 2 – EFEITOS DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DO EXTRATO BUTANÓLICO DA RAIZ DE <i>P. PANICULATA</i> SOBRE O CRESCIMENTO DA LINHAGEM DE CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO HEPG2	146
	REFERÊNCIAS.....	148

1 INTRODUÇÃO

“Decifra-me ou te devoro”

Esta frase da mitologia grega era proferida pela esfinge que se apossara da cidade de Tebas, desafiando com um enigma quem a quisesse enfrentar, e quem solucionasse o enigma faria com que ela abandonasse a cidade. Se uma formação neoplásica fosse uma entidade pensante, capaz de arquitetar pensamentos lógicos; e o homem, conseguisse fazer contato com esse pensamento, com certeza essa frase mitológica seria a primeira mensagem das células tumorais para o homem.

Diferente da esfinge de Tebas, que só permitia uma única resposta antes de se abater sobre o oponente e devorá-lo, a história do constante desafio entre o homem e a cura do câncer é escrita por inúmeras charadas, lentamente respondidas pelo homem. Infelizmente, à semelhança da esfinge, o desfecho para algumas charadas mal respondidas é implacável.

Este eterno confronto o homem e a cura do câncer que mescla charadas e respostas, está sendo escrito em intermináveis capítulos por incansáveis escritores, que ao longo desta história, vêm tecendo as vias biológicas envolvidas no processo de carcinogênese. Os capítulos relacionados com o processo de desenvolvimento tumoral misturam-se com os destinados às armas contra sua progressão. Os primeiros são as charadas e os seguintes as respostas.

Nesta batalha, ingênuos guerreiros foram aliciados: camundongos, ratos, hamsters e plantas; todos peças importantes, ou melhor, armas importantes tanto para decifrar o quebra-cabeça da carcinogênese, quanto para atenuar suas consequências. Muito já se sabe sobre o câncer e seu processo de formação, talvez um dos maiores desafios seja a heterogeneidade da massa tumoral. Uma única célula dá origem à inúmeras células progressivamente diferentes. Essas diferenças conferem alta capacidade proliferativa, invasiva e resistência ao ataque do sistema imunológico e a inúmeras drogas quimioterapêuticas.

Uma solução seria sermos tão rápidos e versáteis quanto uma massa tumoral, e tão unidos quanto ela, estudarmos todos os mecanismos de inibição possíveis, para com isso renovar e intensificar, sem toxicidade, os quimioterápicos a nossa disposição hoje.

Uma das armas mais promissoras foi a descoberta do potencial das plantas como fonte de novas drogas. Incrivelmente, um único composto fitoquímico pode ter a capacidade de estimular vários mecanismos para inibir o processo de carcinogênese. Não superestimando o potencial das plantas, pois, do mesmo modo que não existem fórmulas mágicas, não existem

plantas milagrosas. O fato é, que o conhecimento gerado até o momento declara a importância das plantas como fonte de quimiopreventivos, mas infelizmente, o ritmo das pesquisas é muito lento.

A urgência de vencer cada batalha deste quebra-cabeça com o lucro de centenas de vidas é motivação suficiente para que todo o conhecimento seja reunido, o que significa unir o indígena ao popular, e ao científico, e testar, analisar, quantificar para encerrar mais um capítulo, não deixando perguntas sem respostas, com a punição de ser “devorado”.

A planta *Pfaffia paniculata* têm gerado muitas perguntas sobre os mecanismos que envolvem as suas propriedades quimiopreventivas. As raízes de *P. paniculata* e/ou seus extratos apresentam propriedades antineoplásicas e antiproliferativas comprovadas pela maioria dos estudos realizados nos últimos 20 anos. Entretanto, os mecanismos deste controle sobre a proliferação celular não foram esclarecidos e, portanto, são perguntas que precisam ser respondidas. Desta forma, inicialmente analisamos os mecanismos de ação que promoveram os efeitos inibitórios observados no modelo de hepatocarcinogênese murina desenvolvido por Da Silva et al. (2005). Para isso, avaliamos a ação sobre a proliferação celular, indução de apoptose e comunicação intercelular via junções *gap*. E em um segundo momento, avaliamos se as propriedades antineoplásicas apresentadas pela *Pfaffia paniculata* seriam reproduzidas em células tumorais de carcinoma hepático humano, e qual o possível mecanismo de ação envolvido. Assim, a linhagem de células HepG2 foi tratada com diferentes frações purificadas do extrato butanólico, obtido a partir das raízes de *P. paniculata*, sendo avaliados os efeitos sobre a viabilidade celular, ciclo celular e apoptose.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a propriedade quimiopreventiva da *Pfaffia paniculata* na fase de iniciação da hepatocarcinogênese em camundongos tratados com diferentes concentrações da raiz em pó adicionadas à ração.
- Avaliar os efeitos de frações purificadas do extrato butanólico da raiz de *Pfaffia paniculata* sobre a linhagem de carcinoma hepatocelular humano HepG2.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Modelo de hepatocarcinogênese em camundongos tratados com diferentes concentrações da raiz em pó de *P. paniculata* adicionadas à ração:

- Determinar o índice de atividade histológica do tecido hepático.
- Avaliar a proliferação celular pela contagem de hepatócitos PCNA positivos.
- Avaliar a apoptose pela contagem dos corpúsculos apoptóticos fagocitados e técnica do cometa alcalino.
- Avaliar a comunicação intercelular mediada pelas conexinas 32 e 26 pelas técnicas: transferência de corante - *Incision Loading / Dye Transfer*, imunofluorescência, *western blot* e PCR em tempo real.

2.2.2 Frações purificadas do extrato butanólico da raiz de *P. paniculata* sobre o crescimento da linhagem de carcinoma hepatocelular humano HepG2:

- Avaliar qual a fração do extrato butanólico e qual concentração apresentam efeitos expressivos sobre a viabilidade celular pela incorporação do cristal violeta.
- Avaliar o efeito do tratamento sobre as fases do ciclo celular por citometria de fluxo.
- Avaliar a expressão gênica das proteínas envolvidas no ciclo celular p27, ciclinas D1, D3, e E, CDK2, CDK4 e CDK6 por PCR em tempo real.
- Avaliar a presença de morte celular pelas alterações morfológicas celulares e degradação de DNA utilizando, respectivamente, a técnica de *acridine orange* - brometo de etídeo e DNA *smear*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PROPRIEDADES DAS DROGAS QUIMIOPREVENTIVAS

Em 1985, Wattenberg dividiu os quimiopreventivos em duas categorias: bloqueadores da formação do carcinógeno, que agem na fase de iniciação da carcinogênese, e agentes supressores da ação mutagênica dos carcinógenos, que inibem a expressão da neoplasia e atuam nas fases de promoção e progressão. A procura por agentes quimiopreventivos e quimioterápicos no tratamento do câncer foi gradativamente impulsionada pelo conhecimento de que o desenvolvimento desta doença está dividido em múltiplas etapas, além da conceituação de neoplasia e preneoplasia, caracterização molecular e bioquímica de cada etapa (ABBRUZZESE; LIPPMAN, 2004). A busca por quimiopreventivos avançou em direção às principais características e alvos celulares das neoplasias, fazendo com que fossem gradativamente classificados de acordo com seus mecanismos de ação.

Quase um quarto de século após a classificação de Wattenberg (1985), De Flora e Ferguson (2005) dividiram os mecanismos dos agentes quimiopreventivos em três estágios de prevenção, os quais estão transcritos no quadro 1. No primeiro estágio de prevenção, estão inclusos os mecanismos que inibem mutação, iniciação celular e promoção tumoral. Na prevenção secundária, estão os mecanismos envolvidos na inibição da progressão tumoral, como inibição de efeitos genotóxicos, ação sobre o sistema imunológico e inibição de angiogênese. E no terceiro estágio de prevenção, estão relacionados os mecanismos envolvidos na inibição de invasão e metástase. Segundo o autor, alguns dos mecanismos são hipotéticos ou reflexo de interesse puramente acadêmico.

Entretanto, a exposição dos mecanismos estudados até o momento de sua publicação e proposições por De Flora e Ferguson (2005) fornece um panorama dos inúmeros alvos dos quimiopreventivos e, conseqüentemente, uma visão de que a divisão clássica da carcinogênese em iniciação, promoção e progressão nada mais é que a simplificação de um processo composto por uma seqüência de múltiplos eventos que podem ser repetir ao longo da evolução do processo carcinogênico. Um exemplo seria a inibição da proliferação celular, que está presente no primeiro e terceiro estágio, bem como a atividade antioxidante que pode ser observada em todos os estágios. Esta constatação torna clara a necessidade de não apenas conhecer a eficiência do quimiopreventivos, mas também seus diferentes mecanismos de

ação, o que poderá auxiliar no direcionamento de estratégias de quimioprevenção (DE FLORA; FERGUSON, 2005).

Prevenção Primária	
Inibição de mutação e iniciação do câncer extracelular ou longe do alvo celular da mutação	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição da penetração e remoção do organismo; • Inibição da formação endógena de agentes carcinogênicos e mutagênicos; • Inativação, diluição e detoxicação de mutagênicos; • Favorecimento de absorção de agentes protetores.
Inibição da mutação e iniciação em células alvo	<ul style="list-style-type: none"> • Modificação do transporte transmembrânico; • Modulação do metabolismo (enzimas de fase I e II) • Bloqueio dos agentes por ação antioxidante e protetora dos sítios alvo (ácidos nucleicos); • Inibição da replicação celular; • Manutenção da estrutura e reparo do DNA; • Controle da expressão gênica;
Inibição da promoção tumoral	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição de efeitos genotóxicos; • Ação antioxidante e eliminação de radicais livres; • Ação antiinflamatória; • Inibição de proteases; • Inibição de proliferação e diferenciação celular; • Modulação da apoptose; • Modulação da transdução de sinal; • Proteção à comunicação intercelular.
Prevenção Secundária	
Inibição da progressão tumoral	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição dos efeitos genotóxicos • Ação antioxidante e eliminação de radicais livres; • Inibição de proteases; • Modulação da transdução de sinal; • Regulação hormonal; • Ação sobre o sistema imune • Inibição da angiogênese.
Prevenção Terciária	
Inibição da Invasão e Metástase	<ul style="list-style-type: none"> • Ação antioxidante e eliminação de radicais livres; • Modulação da transdução de sinal; • Inibição da proliferação celular; • Modulação da apoptose; • Indução de diferenciação celular; • Inibição da angiogênese; • Ação sobre moléculas de adesão; • Inibição de proteases envolvidas na degradação da membrana basal e modulação da interação com a matriz extracelular; • Ativação de genes antimetastáticos.

Quadro 1 – Classificação dos mecanismos inibidores de mutagênese e carcinogênese modificada de De Flora e Ferguson (2005)

3.2 PLANTAS COMO FONTE DE DROGAS ANTICÂNCER

O potencial das plantas medicinais vem sendo explorado há mais de mil anos, inicialmente como tinturas, chás, cataplasmas ou outras formulações herbais. O primeiro registro data do século XIX e corresponde ao isolamento da morfina a partir do ópio. Outras drogas foram isoladas a partir de plantas como o quinino, a cocaína, a codeína e a digitoxina, das quais a morfina ainda é largamente utilizada. Recentemente quatro novas drogas derivadas de plantas foram introduzidas no mercado mundial: Artemotil, uma droga anti-malária derivada da artemisinina, isolada da *Artemisia annua*, uma planta da medicina tradicional chinesa da família Asteraceae; Galantamina (nome comercial Reminyl), isolada primeiramente na Rússia da planta *Galanthus woronowii* da família Amarilidaceae, utilizada no tratamento do mal de Alzheimer; Nitisinone (nome comercial Orfadin) é um produto obtido a partir de modificações feitas em derivados da planta *Callistemon citrinus* da família Mirtaceae, utilizado no tratamento de uma doença rara, a tirosinanemia; e o último é o Tiotropium (nome comercial Spiriva), utilizado no tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica e obtida a partir da planta *Atropa belladonna* da família Solanaceae (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Outras drogas ainda são modificações de drogas de uso clínico habitual, como: M6G, um metabólito da morfina de *Papaver somniferum* (Papaveraceae); a Calanolide A uma dipiranocoumarina, natural utilizada como anti-HIV, isolada da planta *Calophyllum lanigerum* (Clusiaceae); a Vinflunine, modificação da vinblastina da *Catharanthus roseus* e Exatecan, um análogo do camptotequin da planta *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) utilizadas no tratamento do câncer (BALUNAS; KINGHORN, 2005). A contribuição das plantas medicinais para o tratamento do câncer no período de 1940 a 2002 corresponde a 40% de todas as drogas desenvolvidas, sendo que 8% correspondem a compostos desenvolvidos a partir de modificações realizadas em produtos extraídos de plantas (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

A cada ano surgem aproximadamente cerca de 10 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo e, apesar de todas as descobertas e terapias disponíveis, aproximadamente mais de 6 milhões de pessoas podem morrer vitimadas por esta doença (estimativa feita em 2000). Desta forma, a quimioprevenção é a maior arma no combate ao câncer, estimando-se que cerca de 2/3 dos casos de cânceres humanos poderiam ser prevenidos por modificações no estilo de vida, incluindo os hábitos alimentares. (SARKAR; LI, 2004). Assim, os produtos

naturais como ervas medicinais e suplementos alimentares têm apresentado grande importância à quimioprevenção do câncer, devido ao histórico de consumo humano (BALUNAS; KINGHORN, 2005) e ao potencial medicinal das plantas como fonte de novas drogas revelada pelas pesquisas científicas.

3.2.1 Os fitoquímicos

O termo “fito” da palavra fitoquímico deriva do grego *phyto*, que significa planta. Assim, os fitoquímicos são químicos derivados de plantas e definidos como compostos não nutricionais bioativos presentes em frutos, folhas, sementes e raízes (LIU, 2004). Nas últimas décadas, os fitoquímicos derivados da dieta do ser humano têm despertado o interesse da comunidade científica. Isto decorre da estimativa de que, aproximadamente, 2/3 dos cânceres humanos podem ser prevenidos por modificações no estilo de vida, incluindo a dieta. O consumo de frutas, soja e vegetais tem sido associado com redução no risco de vários tipos de cânceres (SARKAR; LI, 2004), sendo que os fitoquímicos mais estudados pertencem às classes dos compostos fenólicos e carotenóides (LIU, 2004).

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande variedade de estruturas, simples e complexas, as quais possuem pelo menos um anel aromático onde, ao menos um hidrogênio, é substituído por um grupamento hidroxila. Pertencem a esta classe os polifenóis, representados pelos flavonóides, taninos e antraquinonas, substâncias que apresentam propriedades redutoras (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2002). Destes, destacam-se os flavonóides e seus representantes mais conhecidos são quercetina, caempferol, catequina, catequina galato, epigallocatequina e epigallocatequina galato (LIU, 2004).

Os carotenóides são os pigmentos mais difundidos na natureza e recebem atenção especial devido suas propriedades antioxidantes. Estruturalmente possuem 40 átomos de carbono, podendo apresentar em uma ou em ambas as terminações da cadeia vários níveis de hidrogenação ou grupos funcionais contendo oxigênio. Mais de 600 carotenóides diferentes foram identificados, sendo os mais conhecidos o β -caroteno, a luteína e o licopeno (LIU, 2004).

3.3 ALVOS CELULARES DOS QUIMIOPREVENTIVOS

O desenvolvimento do câncer é um processo que envolve múltiplas etapas compostas por uma rede complexa de mecanismos de proteção contra danos oxidativos, vias transdutoras de sinal extra e intracelulares e fatores de transcrição que se inter-relacionam numa rede de ativação e modulação, culminando em eliminação do dano celular, via morte celular programada ou propagação do dano celular e estabelecimento da malignidade via estímulos proliferativos. A busca por novos quimiopreventivos parte do conhecimento de cada engrenagem envolvida nesta maquinaria e de seu múltiplo inter-relacionamento, procurando alvos chaves que, por exemplo, desliguem a transformação de uma droga em um carcinógeno ou o envio de mensagens inadequadas de proliferação. Ou ainda, drogas que disparem mecanismos de eliminação das células alteradas sempre que sua sobrevivência ocasionar riscos de uma transformação maligna.

Inúmeros alvos moleculares já foram identificados e muitos ainda serão descobertos, no entanto, os mecanismos mais críticos até o momento são os que controlam a carcinogênese nos estágios onde ainda não são observados os níveis mais elevados de malignidade, ou seja, quando as células desenvolvem a capacidade invasiva e metastática. Assim, estes alvos estão envolvidos nas duas fases iniciais da carcinogênese e estão relacionados com a biotransformação e/ou eliminação dos carcinógenos, a via de transdução de sinal, os fatores de transcrição, as vias que disparam o processo apoptótico e o controle do ciclo celular.

3.3.1 Mecanismos de bloqueio da iniciação celular – ação antimutagênica

A quimioprevenção do câncer inclui a inibição, reversão e/ou o retardamento do processo de carcinogênese (STEELE; KELLOFF, 2005) que tem início quando, após a exposição ao carcinógeno, ocorre uma alteração celular genética ou epigenética envolvendo genes fundamentais para os processos de crescimento e diferenciação celulares, e remoção celular programada (EVANS, 1993). Desta forma, um dos primeiros alvos da quimioprevenção é a inativação do carcinógeno ou o bloqueio da fase de iniciação.

A transformação neoplásica de uma célula origina-se com as alterações que podem ser provocadas por agentes químicos, radiação ultravioleta e ionizante ou por ação viral. Os

mecanismos de inibição do carcinógeno variam desde uma simples ação extracelular, como a proteção de um filtro solar ou a proteção das mucosas, até a ação intracelular composta por cascatas de reações mais complexas.

Inicialmente, os agentes quimiopreventivos podem inibir a biotransformação de uma substância química em um carcinógeno pela modulação da atividade das enzimas de fase I no interior das células, e promover a detoxicação pela ação sobre a atividade das enzimas de fase II. No caso de agentes com ação cancerígena direta, ou seja, que não precisam de biotransformação, os efeitos quimiopreventivos direcionam-se para evitar a mutação através da correção do dano causado, ativação de mecanismos de eliminação da célula lesada ou pela inibição da proliferação celular.

3.3.1.1 Inibição da biotransformação

A metabolização de drogas e outros xenobióticos é realizada principalmente no fígado, por enzimas classificadas como enzimas de fase I e de fase II. A fase I inclui reações de oxidação, redução e hidrólise mediadas por enzimas do citocromo P450 ou monooxigenases CYPs (NELSON et al., 1993) que catalisam cerca de 70 a 80% das reações (EVANS; RELLING, 1999), e por outras enzimas relacionadas no quadro 2. Estas reações produzem metabólitos eletrofílicos altamente reativos, os quais podem ser mutagênicos ou carcinogênicos e interagirem com proteínas ou DNA, formando aductos. Outro produto são as espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem provocar danos celulares irreversíveis, desencadeando o processo apoptótico (DEROUET-HUMBERT; ROEMER; BUREIK, 2005).

Vários estudos associam a hiper expressão de CYPs no processo carcinogênico, sendo identificada em diferentes tipos de câncer como na próstata (OLSSON et al., 2007), na mama (RIEGER et al., 2004) e em carcinoma de células escamosas do esôfago, adenocarcinoma esofageal, carcinoma de células escamosas pulmonares, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de células pequenas, carcinoma de mama, carcinoma de estômago, hepatocarcinoma e adenocarcinoma de colon (JIANG et al., 2005). Jiang et al. (2005) demonstraram que os efeitos da hiper expressão de CYPs acarretam na ativação da via de transdução de sinal PI3K/AkT e aumento da fosforilação do receptor do fator de crescimento EGFR, o que segundo os autores, conferem a CYP um papel desconhecido na promoção do fenótipo neoplásico e na patogênese do câncer em diferentes tecidos humanos.

*Enzimas de Fase I	Citocromo P450 (CYPs), hidrolases, redutases, aldoquetoreduases (AKRs), monooxigenases contendo flavinas (FMOs), lipoxigenases (LOXs) ciclooxigenases (COXs), peroxidases, epoxigenases, oxidases, monoamina oxidase (MAOs), dioxigenases, álcool deidrogenases dependente de NAD, álcool deidrogenases depende de NADP (ADHs), aldeído deidrogenases dependente de NAD, aldeído deidrogenases depende de NADP (ALDHs), esteróide deidrogenases dependente de NAD, esteróide deidrogenases depende de NADP, carboxilesterase, glicosilases, glurononidasas, hidrolases, esterases e sulfatases.
*Enzimas de Fase II	Uridia difosfato glucuronosiltransferase (UGTs), glutathione S-transferase (GSTs), sulfotransferases (SULTs) epoxidases, aciltransferase, acetiltransferase, metiltransferases e transaminases.

*Esta classificação não é rígida, algumas destas classes podem atuar igualmente nas duas fases.

Quadro 2 – Relação das classes de enzimas de fase I e II responsáveis pela biotransformação de drogas e xenobióticos, modificada de Nerbert e Dalton (2006)

Os produtos da fase I são inativados pelas reações de conjugação mediadas pelas enzimas da fase II (Quadro 2), que catalisam a formação de conjugados hidrofílicos de baixa reatividade, que podem ser eliminados pelos rins ou pela bile (WILLIAMS, 1971). A principal enzima catalisadora é a glutathione S-transferase (GST), que promove a conjugação de muitos carcinógenos e radicais com a glutathione (GSH). A glutathione é um tripeptídeo produzido naturalmente no organismo e podendo ser encontrada no fígado, pulmões e rins. Este é o maior antioxidante celular e possui um papel crucial na manutenção do balanço entre oxidação e antioxidação, apresentando também funções detoxicantes (KAPLOWITZ; AW; OOKHTENS, 1985).

O metabolismo de GSH tem um complicado papel no câncer e na terapia antineoplásica. Apesar de sua importante ação detoxicante de carcinógenos, a hiper expressão

de GST e o aumento na concentração de GSH em tumores estão associados ao aumento da resistência aos quimio e radioterápicos (NGUYEN et al., 2001; VUKOVIC; NICKLEE; HEDLEY, 2001). Esta resistência pode ocorrer pela conjugação dos quimioterápicos com GSH e detoxicação, envolvendo uma combinação dos mecanismos de GSH, GST e uma bomba que exporta os conjugados de glutathione S dependente de ATP (bomba GS-X) (SUZUKI; NISHIO; TANABE, 2001). Por outro lado, a perda ou baixa expressão de GSTM1 (polimorfismo de GST) está correlacionada com aumento da susceptibilidade ao câncer de pulmão (NAKAJIMA et al., 1995), cabeça e pescoço (SUZEN et al., 2007), provavelmente devido ao desequilíbrio no balanço entre aumento de ativação de carcinógenos e redução da atividade detoxicante (BALENDIRAN; DABUR; FRASER, 2004).

A modulação da expressão das enzimas de fase II demonstra ser um importante alvo dos quimioterápicos, uma vez que a hiper expressão pode influenciar no mecanismo de resistência as drogas anticâncer e a baixa expressão pode aumentar a incidência de diferentes cânceres. Assim, alvos moleculares que envolvam a regulação da transcrição gênica destas enzimas são fortes candidatos à ação das drogas quimiopreventivas.

A expressão da maioria das enzimas antioxidantes é regulada pela ativação do fator relacionado ao fator nuclear eritróide 2 p45 (NF-E2), usualmente denominado de Nrf2 (LEE; SURH, 2005). O Nrf2 é um fator de transcrição que no citoplasma está inativo pela ligação com Keap-1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), formando o complexo Nrf2-Keap1. Este complexo é desfeito pela ação de proteínas quinases induzidas pelo aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio ou pela ação de quimiopreventivos. Uma vez desfeito este complexo, Nrf2 se desloca para o núcleo onde forma heterodímeros com outros fatores de transcrição, como as pequenas proteínas Maf, ligando-se à região promotora e ativando a transcrição gênica (DINKOVA-KOSTOVA et al., 2002) (Figura 1). A região promotora de ligação do Nrf2 é conhecida como região ARE (elemento de resposta a antioxidantes) ou elemento resposta eletrofílico (EpRE) e está presente nos genes de algumas enzimas de fase II (LEE et al., 2005). A ativação de Nrf2 é mediada por uma ou mais quinases, incluindo as MAKs, PI3K, PKC e AKT (KWAK; WAKABAYASHI; KENSLER, 2004; LEE; SURH, 2005).

Figura 1 – Desenho esquemático da via de transcrição de enzimas de fase II (KWON et al., 2007): ARE – elemento de resposta a antioxidantes; Keap-1 - *Kelch-like ECH-associated protein*; sMaf – pequena proteína da família Maf; Nrf2 - fator relacionado ao fator nuclear eritróide 2 p45

Estudos com camundongos deficientes em Nrf2 têm correlacionado a regulação de enzimas de fase II exercida por Nrf2 regular a expressão de muitas enzimas de fase II sobre o estresse oxidativos e eletrofilico tem sido verificada por estudos em camundongos deficientes em Nrf2.

Xu et al. (2006) analisaram os efeitos da perda de Nrf2 em camundongos geneticamente modificados e selvagens submetidos ao modelo de carcinogênese cutânea induzida pelo carcinógeno 7,2-dimetilbenzantraceno (DMBA) e promotor tumoral 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Dois grupos de animais de ambos os genótipos foram submetidos a este modelo, sendo que apenas um deles recebeu tratamento com o quimiopreventivo sulforane (fitoquímico). Os autores observaram que os camundongos *knockout* para Nrf2 apresentaram maior susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores cutâneos e o tratamento não apresentou efeitos nestes animais.

Aoki et al. (2001) demonstraram que camundongos *knockout* para Nrf2 expostos a modelo de toxicidade respiratória com escape de diesel (*diesel exhaust*) apresentaram severa hiperplasia e acúmulo de aductos na epiderme bronquial. Outros estudos também evidenciaram a importância de Nrf2 na resistência aos carcinógenos, sendo um alvo da ação dos agentes quimiopreventivos (ENEMOTO et al., 2001; RAMOS-GOMEZ et al., 2001).

Estudos com diferentes tipos de plantas mostraram propriedades inibidoras da formação de carcinógenos pela inativação de enzimas de fase I e ativação de fase II e/ou efeito antioxidante sobre as espécies reativas de oxigênio.

O epigallocatequina-3-galato (EGCG) é um dos polifenóis mais abundantes no chá verde, e análises *in vivo* e *in vitro* demonstraram propriedades quimiopreventivas e antitumorais pela inibição da ativação de carcinógenos ou indução de enzimas detoxicantes de fase II. Jimenez-Lopez e Cederbaum (2004) observaram que linhagem de células com hiperexpressão de CYP, induzidas a estresse oxidativo e peroxidação lipídica e tratadas com EGCG, foram protegidas contra os danos decorrentes da indução pela manutenção dos níveis de glutatona. Steele et al. (2000) mostraram, em estudo com várias linhagens de células diferentes, que o tratamento com diferentes extratos e frações dos chás preto e verde reduziu a transformação neoplásica das células, assim como a proliferação celular e a formação de aductos decorrentes da indução por BaP (benzo- α -pireno) ou TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato). Em contrapartida, houve aumento da atividade das enzimas de fase II GST e quinona redutase. Segundo os autores, os resultados indicam que o mecanismo anticâncer dos dois chás também pode apresentar respostas eficazes em humanos.

O oltipraz é uma ditiolitiona sintética similar às encontradas em diversos vegetais, que foi desenvolvida inicialmente para o tratamento da esquistossomose. Estudos em camundongos sobre os seus mecanismos de ação, demonstraram que o tratamento com o oltipraz restabelecia níveis de GST que se apresentavam muito reduzidos pela doença (BUEDING; DOLAN; LEROY, 1982). Chua et al. (2005) observaram que o tratamento prévio com oltipraz em linhagem de células deficientes de DNA mitocondrial e leucêmicas elevou os níveis de GST e GSH, conferindo resistência ao estresse oxidativo mitocondrial. Nelson et al. (2002) mostraram que o tratamento com oltipraz protege linhagem de células epiteliais do pigmento retinal humano de contra injúria oxidativa, pelo aumento dos níveis mitocondriais de GSH e pela indução de enzimas detoxicantes como GST e quinona redutase-NADPH (NQR).

Um mecanismo de ativação encontrado em alguns quimiopreventivos é o restabelecimento ou manutenção dos níveis de GST pela regulação da transcrição da enzima via região ARE. Este mecanismo foi observado em alguns dos polifenóis presentes no chá verde (CHEN et al., 2000), nos isotiocianatos encontrados no brócoli, repolho, couve-flor e agrião (KONG et al., 2001), no curcumin, um pigmento amarelo isolado do rizoma da planta *Curcuma longa* (BALOGUN et al., 2003) e no oltipraz (DAVIDSON et al., 1990). A ação destes quimiopreventivos sobre esta via de transcrição pode ocorrer em três níveis: afetando a

estabilidade do complexo Nrf2-Keap1, a atividade de Nrf2 e a formação do heterodímero no núcleo (POOL-ZOBEL; VEERIAH; BÖHMER, 2005).

A modulação das enzimas de fase I, principalmente as CYPs, foi observada no curcumin e no EGCG (epigallocatequim galato), dentre outros quimiopreventivos. Conforme Ciolino et al. (1998), o pigmento curcumin inibe a ativação de carcinógenos pela competição com o sítio de ligação gênica AHR (*aryl hydrocarbon receptor*), que induziria a transcrição de algumas CYPs. Williams et al. (2000) demonstraram *in vitro* que EGCG apresenta efeito antagonista em AhR, inibindo a transcrição de enzimas de fase I. Conforme Pool-Zobel et al. (2005), o aumento da incidência de câncer humano pode ser prevenido pelo consumo de fatores protetores que modulem os mecanismos de defesa do organismo. A cuidadosa coordenação e balanço entre as enzimas do metabolismo de fase I e II são necessários para a proteção contra xenobióticos.

3.3.2 Mecanismos de inibição da fase de promoção

Na fase de promoção tumoral ocorre a persistente replicação de um clone de células alteradas que cresce formando um foco de células preneoplásicas. Os agentes fitoquímicos apresentam alguns mecanismos de ação anti-promoção tumoral como a inibição da transformação neoplásica pela inibição da ativação de AP-1 ou NF- κ B ou supressão do aumento de expressão de COX-2; o controle da ativação das cascatas de transdução de sinal pelos promotores tumorais; e a indução de apoptose em células cancerosas (BODE; DONG, 2004). A inibição da ação de AP-1, NF- κ B e COX-2 auxilia no controle do desenvolvimento do estresse oxidativo e, conseqüentemente, no processo inflamatório, o que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer, gerando danos ao DNA ou promovendo a expansão clonal de células alteradas. A inativação da ação dos promotores tumorais sobre a transdução de sinal evita a propagação de informações que desencadeiam vários processos que contribuem para a evolução da fase de promoção da carcinogênese.

3.3.2.1 Estresse oxidativo e inflamação

Estresse oxidativo e inflamação contribuem diretamente para as múltiplas etapas da carcinogênese por vários mecanismos, incluindo danos diretos ao DNA (BARTSCH; NAIR, 2004) ou indiretos pela modulação de vias de transdução de sinal intracelular (SURH, 2002), levando ao crescimento anormal e forçando células danificadas ou iniciadas a sofrerem promoção e progressão (SURH et al., 2005).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) como o radical ou ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical perhidroxil ($HO_2^{\bullet}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) são constantemente geradas em baixa concentração nas células como produtos do metabolismo aeróbico. Em condições fisiológicas normais, o baixo nível de ROS é eliminado efetivamente pelo sistema de defesa antioxidante (SURH et al., 2005). Entretanto, um desequilíbrio entre a geração de ROS e a capacidade antioxidante celular leva a um estado de estresse oxidativo que contribui para várias condições patológicas, inclusive o câncer. Uma dessas alterações seria o processo inflamatório que contribui para o desenvolvimento do câncer, não somente como uma consequência direta de mediadores pró-inflamatórios, mas também por criar um ambiente de estresse oxidativo (COUSSENS; WERB, 2002). De fato, Symons e King (2003) analisaram os níveis de ROS em modelo de inflamação na pata de rato e observaram que a inibição de ROS é paralela com a redução da inflamação, sugerindo que o seu depósito leva à inflamação (SURH et al., 2005).

Níveis constantemente elevados de ROS ativam fatores de transcrição sensíveis às reações de oxidação e redução (redox), como o fator nuclear κB (NF- κB) e o ativador de proteína 1 (AP-1), os quais podem atuar como moléculas chaves para transformar células normais em pré-malignas, com subsequente expansão clonal para formas sólidas de tumor (KARIN et al., 2001). Estes fatores são responsáveis pela ativação transcricional de genes envolvidos na inflamação, proliferação e crescimento celulares e a sua ativação aberrante tem sido implicada em várias neoplasias malignas (ANGEL; KARIN, 1991; LIN; KARIN, 2003). NF- κB , AP-1 juntamente com o fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$) e outros fatores, podem ainda estimular a produção de COX-2, uma isoenzima pró-inflamatória, a qual é hiper regulada em vários tecidos premalignos e malignos (NA; SURH, 2006).

Os agentes fitoquímicos com propriedades anticâncer apresentam efeitos sobre o desenvolvimento do processo inflamatório e geração de ROS. Kim et al. (2007) mostraram, em células endoteliais da veia do cordão umbilical humano estimuladas com $TNF\alpha$, que o

tratamento com curcumin bloqueia a ativação do fator NF- κ B por TNF- α , reduz ROS intracelular, a fosforilação de c-Jun N terminal (JNK) e p38 que são ativados por estresse oxidativo, dentre outras ações anti-inflamatórias. Balogun et al. (2003) demonstraram que curcumin estimula a atividade da enzima heme-oxigenase-1 (HO-1) *in vitro*, por promover a inativação do complexo Nrf2-Keap-1 e liberar o Nrf2, o que leva ao aumento da sua ligação com a região ARE e conseqüente aumento na transcrição de HO-1.

Katiyar et al. (2001) mostraram em cultura de pele humana, pré-tratada com EGCG e exposta a UV, que o tratamento prévio com EGCG inibe a formação de H₂O₂ e a fosforilação de MAPK (via dependente de proteína ativadora de mitógeno), sugerindo que o EGCG pode atenuar os efeitos do estresse oxidativo provocados pela exposição aos raios ultravioletas, que causam danos à pele humana. Os efeitos de EGCG sobre a inflamação também foram testados *in vivo*, mostrando redução da colite induzida em camundongos pela inibição de NF- κ B e AP-1 (ABBOUD et al., 2008). No câncer de próstata, demonstrou inibição da inflamação *in vivo* e redução do poder invasivo *in vitro* (SARTOR et al., 2004).

3.3.2.1.1 TNF α , COX-2, NF- κ B e AP-1

O processo inflamatório persistente cria um micro ambiente anormal onde alguns mediadores pró-inflamatórios específicos promovem transformação neoplásica das células. Uma das mais plausíveis ações dos quimiopreventivos fitoquímicos pode ser a supressão da hiper expressão anormal de mediadores pró-inflamatórios como as interleucinas (IL), TNF α e prostaglandinas (PG), especialmente PGE₂ e PGE_{2 $\alpha\alpha$} . Em resposta ao estímulo inflamatório, PG são produzidas em abundância através da conversão metabólica do ácido araquidônico pela enzima COX-2, a qual é inapropriadamente hiper regulada em vários tecidos premalígnos e malignos (NA; SURH, 2006).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF α) é uma citocina pró-inflamatória com uma grande variedade de funções biológicas no processo de inflamação, como remodelamento de tecido, alteração de permeabilidade da barreira epitelial, aumento da permeabilidade vascular, ativação de macrófagos, recrutamento de células inflamatórias e hiper regulação de moléculas de adesão celular (AGGARWAL, 2003). Quase todos os tipos celulares, quando expostos a TNF, ativam NF- κ B que leva à expressão de genes inflamatórios. Estes genes incluem citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, COX-2, sintetase induzida por óxido nítrico (iNOS),

lipoxigenase-2 (LOX-2) e moléculas de adesão celular. TNF α é considerado um fator de crescimento para a maioria dos tumores, como câncer de ovário, linfoma de células T cutâneas, leucemia mielogênica aguda e linfoma de células B (KWON et al., 2007). Segundo Moore et al. (1999), camundongos *knockout* para TNF α apresentaram maior resistência à carcinogênese cutânea, sugerindo que a neutralização da produção de TNF α pode ser usada em tratamento e prevenção destes tipos de câncer. A crítica função de TNF α em mediar a tumorigênese indica que agentes que suprimem esta propriedade tem potencial como quimiopreventivos antineoplásicos (KWON et al., 2007).

O mecanismo dos quimiopreventivos que inibem a ação inflamatória de TNF α envolve, muitas vezes, a inativação do fator de transcrição NF- κ B. Yang et al. (1998) mostraram *in vitro* que o tratamento com EGCG inibe a expressão do mRNA de TNF α e a atividade nuclear de NF- κ B. *In vitro*, muitos fitoquímicos apresentaram a propriedade de aumentar a sensibilidade das células tumorais à apoptose induzida pelo TNF α por um mecanismo que incluiu a redução da atividade de NF- κ B. Isto também foi observado em linhagem de célula de câncer de próstata humana tratada com CAPE (*caffeic acid phenethyl ester*), o maior quimiopreventivo encontrado no própolis (MCELENY et al., 2004); com silimarina, um composto derivado da silibinina isolada da planta *Silybum marianum* (DHANALAKSHMI et al., 2002); e com linhagem de células leucêmicas tratadas com wogonin, derivado de erva chinesa (FAS et al., 2006). Pajonk et al. (2006) trataram com aplicações tópicas de chá verde preto a pele de 60 pacientes com diferentes tipos de câncer submetidos à radioterapia. Segundo os autores, o tratamento restitui a integridade da pele e suprimiu a liberação de várias citocinas, incluindo TNF α .

O metabolismo do ácido araquidônico divide-se em dois caminhos, via da ciclooxigenase (COX) que cataliza a conversão do ácido em prostaglandinas e a via catalizada por lipoxigenase (LOX), que leva a produção de leucotrienos (LTs) e do ácido hidroperoxieicosatetraenóico (HPETEs). Os LTs induzem a síntese e liberação de outros mediadores pró-inflamatórios como as IL-8 e fatores ativadores de plaquetas (KWON et al., 2007). Tanto COX quanto LOX estão envolvidos no processo inflamatório e estão relacionados com o potencial metastático de células tumorais e, portanto, à fase de progressão da carcinogênese.

As enzimas COX têm dois sítios de atividade, um ciclooxigenase e um peroxidase, os quais são responsáveis pela produção de prostaglandinas (PG). As prostaglandinas têm efeitos variados, atuando na inflamação, proliferação celular, contração da musculatura lisa dos vasos sanguíneos, no tubo digestivo, brônquios e na secreção celular. Existem aproximadamente 10

famílias de prostaglandinas e vários subtipos: PGA, PGB, PGC, PGD, PGE, PGF, PGG, PGH, PGI e PGJ. COX apresenta duas isoformas designadas como COX-1 e COX-2, com distribuição e funções fisiológicas distintas no tecido. COX-1 é expressa em muitos tecidos e tipos celulares, por outro lado, COX-2 é pró-inflamatória e expressa somente em resposta a certos estímulos como mitógenos, citocinas, fatores de crescimento ou hormônios. Esta classe de moléculas inflamatórias exerce profundos efeitos biológicos que aumentam o desenvolvimento e a progressão de cânceres humanos (KWON et al., 2007). A transcrição de COX-2 pode ser estimulada por vários fatores transcricionais, incluindo AP-1, NF-IL-6 e NF- κ B (SUBBARAMAIAH; DANNENBERG, 2003).

Através de sua atividade peroxidase, COX pode ativar muitos procarcinógenos a carcinógenos. Por exemplo, a COX pode oxidar o diidodiol de bezoapirene a sua forma epóxida, a qual é levada a se transformar em carcinógeno com capacidade de se ligar ao DNA, produzindo mutações. A mesma enzima COX pode transformar aminas aromáticas em suas formas mutagênicas. COXs também podem produzir radicais livres indiretamente, os quais ativam c-fos, c-myc e c-jun e então estimulam a proliferação celular (STEELE; KELLOFF, 2005).

A COX-2 é hiper expressa em todas as condições pré-malignas ou malignas envolvendo câncer de reto, fígado, pâncreas, mama, pulmão, bexiga, pele, estômago, cabeça e pescoço (SUBBARAMAIAH; DANNENBERG, 2003). A inibição da atividade de COX-2 tem sido ligada a diversos mecanismos anticâncer, como a redução na atividade angiogênica (PERRONE et al., 2006; BARNES et al., 2007; BOOSANI et al., 2007; LASCHKE et al., 2007), redução do crescimento tumoral (BARNES et al., 2007), indução de apoptose (CHURCHMAN; BAYDOUN; HOFFMAN, 2007; LASCHKE et al., 2007) e redução da capacidade metastática de células tumorais prostáticas (ATTIGA et al., 2000).

A inibição da atividade de LOX também pode ter significativo efeito quimiopreventivo. Estudos *in vitro* (TIMÁR et al., 2000; NIE et al., 2003) e *in vivo* (TIMÁR et al., 2000) mostraram, em linhagem de carcinoma prostático humano, que a aderência, motilidade e capacidade invasiva das células estão diretamente relacionadas com expressão ou atividade de LOX, afetando o potencial metastático das células tumorais.

A ação dos quimiopreventivos sobre COX-2 geralmente ocorre via NF- κ B e AP-1 devido a sua transcrição ser influenciada por estes fatores. Os efeitos após a inibição de NF- κ B incluem a redução da expressão de enzimas pró-inflamatórias chaves como COX-2 e NO (JOHNSON, 2007). Desta forma, o fitoquímico curcumin mostrou inibição de COX-2 *in vitro* (PLUMMER et al., 1999; LEE et al., 2005; SHAKIBAEI et al., 2007) e *in vivo* (CHUN et al.,

2003) pela inativação de NF- κ B. Um dos mecanismos do curcumin é bloquear a degradação de I κ B α , impedindo a translocação NF- κ B para o núcleo (PLUMMER et al., 1999). O mesmo mecanismo de inibição de COX foi observado na ação de flavonóides (LIANG et al., 1999); como o de EGCG (KUNDU et al., 2003; PENG et al., 2006); de resveratrol, uma fitoalexina presente nas uvas (KIM et al., 2006); de CAPE (*caffeic acid phenethyl ester*) (LEE et al., 2004). Entretanto, EGCG e curcumin também podem suprimir a expressão de COX-2 via inibição de ERK1/2 (CUI et al., 2004) e p38MAPK (CUI et al., 2004; CAMACHO-BARQUERO et al., 2007).

O fator nuclear-kappa B (NF- κ B) é um fator transcricional sensível a redox que pertence a uma família composta de 6 membros: NF- κ B1 (p50 e seu precursor p105), NF- κ B2 (p52 e seu precursor p100), RelA (p65), RelB (p68), c-Rel (p75) e v-Rel. Estas proteínas permanecem no citoplasma ligadas à proteína I κ B, formando um complexo inativador (SIMEONIDIS et al., 1999). A exposição a estímulos inflamatórios e oxidativos, como TNF- α , IL-1, estér de forbol, radiação ultravioleta ou infecção microbiana promove a fosforilação de I κ B, pela proteína quinase I κ B (IKK), e posterior degradação proteossomal de I κ B, desfazendo o complexo inativador. A atividade de IKK libera NF- κ B (Figura 2) que transloca-se para o núcleo (KARIN, 1999), onde regula a transcrição de genes reguladores de mediadores pró-inflamatórios como, TNF- α , IL-8, IL-1, iNOS e COX-2 (RAHMAN; MARWICK; KIRKHAM, 2004), e genes ligados a proliferação celular e apoptose como c-myc, TNF- α e FasL (CHEN; CASTRANOVA; SHI, 2001). A ativação de NF- κ B, geralmente, protege a maioria das linhagens de células tumorais contra estímulos apoptóticos, provavelmente pela indução de genes de sobrevivência celular. O bloqueio de NF- κ B pode aumentar a sensibilidade de cânceres às drogas quimioterápicas (KWON et al., 2007).

Figura 2 – Esquema simplificado da via de sinalização de NF-κB e AP1, modificada de Surth et al. (2005). A exposição celular a estímulos inflamatórios e oxidativos ativa uma série de quinase como as MAPKs, IKK, PKC e PI3K as quais ativam NF-κB (heterodímero p65/p50) que se transloca para o núcleo unindo-se a seqüência promotora do gene alvo. Alternativamente, MAPKs podem ativar AP-1 (heterodímero c-Jun/c-Fos) que se liga ao elemento resposta a AMP cíclico (CRE)

Estudos mostram que NF-κB está hiper expresso em diferentes tipos de câncer, como leucemia (HATTA et al., 2003), câncer de próstata (HUANG et al., 2001), mama (KIM et al., 2000) e pâncreas (WANG et al., 2000). A inibição NF-κB aumenta a sensibilidade dos cânceres à quimioterapia e sua ação modulada sobre genes inflamatórios pode ser um crítico componente para a ponte entre inflamação e câncer (BHARTI; AGGARWAL, 2002).

Muitos quimiopreventivos mostraram efeitos inibitórios sobre a atividade de NF-κB pelo bloqueio da degradação de IκBα, impedindo a translocação NF-κB para o núcleo. Isto foi observado *in vitro* no tratamento de diferentes linhagens de células tumorais com os fitoquímicos, EGCG (NOMURA et al., 2000; XIA et al., 2005; PENG et al., 2006); curcumin (PLUMMER et al., 1995; DIVYA; PILLAI, 2006; SU et al., 2006; LIN et al., 2007; MARIN et al., 2007); resveratrol (ADHAMI; AFAQ; AHMAD, 2003; ESTROV et al., 2003; BHARDWAJ et al., 2007) e isotiocianatos (SRIVASTAVA; SINGH, 2004; KIM et al., 2005; XU et al., 2005). Em alguns fitoquímicos, como o resveratrol (SUN et al., 2006) e o CAPE (*caffeic acid phenethyl ester*) (WATABE et al., 2004), a redução da atividade de NF-κB,

desencadeou o processo apoptótico pela inibição da expressão de genes anti-apoptóticos promovida por NF- κ B.

O ativador de proteína-1 (AP-1) é outro fator de transcrição sensível ao redox que pode ser regulado por uma larga variedade de estímulos, inclusive citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, estresse oxidativo e promotores tumorais. AP-1 é um fator de transcrição dimérico que consiste de membros da família *leucine-zipper*, incluindo Jun (c-Jun, JunB e JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 e Fra-2), ATF (ATF2, B-ATF, JDP1 e JDP2), e a família de proteínas Maf (MafA, MafB, c-Maf e MafG/F/K), na qual o dímero Jun e Fos é o mais comum par de proteínas encontrado nos eucariotos (KWON et al., 2007).

A transcrição de Nrf2, NF- κ B e AP-1 é amplificada por membros de uma rede de sinalização intracelular que incluem as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), proteína quinase C (PKC), quinase 3-fosfatidilinositol (PI3K), quinase glicogênio sintase, proteína quinase B e tirosinas quinases (receptor de fator de crescimento). Estas proteínas, quando ligadas aberrantemente por diversos estímulos provocados por estresse oxidativo e inflamatório, amplificam a via de ativação de uma bateria de fatores de transcrição (SURH et al., 2005).

Após ativação, AP-1 reconhece e liga-se ao elemento resposta de TPA (TER) ou ao elemento resposta de cAMP (CRE) dentro da região promotora dos genes alvo. Por causa de sua implicação em uma variedade de respostas celulares, a função de AP-1 na carcinogênese vem sendo altamente investigada. A inibição de AP-1 tem sido implicada na redução da proliferação celular (SHAULIAN; KARIN, 2001; EFERL et al., 2003; VILLANUEVA et al., 2006), na progressão do ciclo celular (SHAULIAN; KARIN, 2001; DUAN; GINSBURG; VONDERHAAR, 2008) e na redução da resistência à apoptose (TAKEUCHI; MOTODA; ITO, 2006).

A inibição de AP-1 por muitos quimiopreventivos ocorre pela inativação da via de transdução de sinal MAPK, bloqueando a sinalização de JNK (c-Jun-N-termianl). Isto foi observado *in vitro* no tratamento de diferentes linhagens de células tumorais com os fitoquímicos, EGCG (DONG et al., 1997; NOMURA et al., 2000; KIM et al., 2004), curcumin (DHANDAPANI; MAHESH; BRANN, 2007), resveratrol (WOO et al., 2004; KIM et al., 2006) e isotiocianatos (XU et al., 2006). Alguns fitoquímicos, como o EGCG (BARTHELMAN et al., 1998), o curcumin (TOMITA et al., 2006) e alguns flavonóides (HAHM; PARK; YANG, 2003) apresentaram inibição direta nos heterodímeros de AP-1 ou ainda, agiram conjuntamente sobre MAPK e AKT (DHANDAPANI; MAHESH; BRANN, 2007).

3.3.2.2 O receptor de fatores de crescimento HER

Os fatores de crescimentos e seus receptores de membrana geralmente estão hiperexpressos em células cancerosas humanas e estão envolvidos na proliferação celular, diferenciação e sobrevivência (BIANCO et al., 2006). A célula inicialmente reconhece a mensagem dos fatores de crescimento via receptores específicos de membrana.

A família HER (erbB) é um dos sistemas de receptores de fatores de crescimento mais conhecido. Esta família consiste em quatro distintos, mas estruturalmente similares, receptores de tirosinas quinases transmembrânicos, chamados de HER1/erbB-1 (ambos receptor de fator de crescimento endotelial-EGFR), HER2/erbB-2, HER3/erbB-3 e HER4/erbB-4 (YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001). O receptor EGFR é uma proteína transmembrânica de 170 kDa, com habilidade de interagir com vários ligantes, como o fator de crescimento endotelial (EGF), fator alfa de crescimento transformador (TGF- α), fator de crescimento endotelial, dentre outros (NORMANNO et al., 2003). Uma vez que o ligante une-se ao receptor, este último sofre dimerização e auto-ativação, que dispara uma cascata de vias de sinalização intracelular. O receptor HER2 (ou erbB-2) apresenta um comportamento interessante, na ausência de seu ligante, usualmente heterodimeriza com outros receptores como EGFR ou HER3 e interage com os ligantes destes receptores para sofrer ativação (MUTHUSWAMY; GILMAN; BRUGGE, 1999; YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001).

A ativação de EGFR ou HER2 dispara respostas biológicas múltiplas e integradas, incluindo mitogênese, apoptose, motilidade celular, angiogênese e regulação da diferenciação (YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001). A propagação cadeia abaixo da sinalização de EGFR/HER2 envolve pelo menos duas vias maiores (Figura 3): a via dependente de proteína ativadora de mitógeno (MAPK) e a via dependente de quinase 3-fosfatidilinositol (PI3K) (MUTHUSWAMY; GILMAN; BRUGGE, 1999; YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001).

Figura 3 – Esquema simplificado do envio da sinalização dos fatores de crescimento a partir dos receptores de membrana até o núcleo, via cascatas de transdução de sinal, modificado de (NORMANNO et al., 2003): AKT ou também PKB – proteína quinase B; MEK - proteína quinase ativada por mitógenos (MEK/ERK), STAT – transdutor de sinal e ativador de transcrição; ras – proteína que controla cascatas de transdução de sinal

Os receptores de HER e seus ligantes são freqüentemente hiper expressos em muitos tipos de tumores, incluindo os de linhagem epitelial e mesenquimal, e têm sido implicados na patogênese do câncer, sendo freqüentemente associados com doenças avançadas e prognósticos pobres (SALOMON et al., 1995). Estudos com agentes quimiopreventivos fitoquímicos mostraram inibição do crescimento e estímulo apoptótico em diferentes linhagens de células tumorais pela redução da ativação e expressão de HER. Foram avaliados *in vitro* o EGCG (PIANETTI et al., 2002; MASUDA et al., 2003; HOU et al., 2005) e o curcumin (PATEL et al., 2008), e *in vivo* com o curcumin (PROVINCIALI et al., 2005) e a silibina (PROVINCIALI et al., 2007).

3.3.2.3 Vias de transdução de sinal - MAPK, PI3K, AKT, Ras, PTEN e mTOR

A via de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) é uma das mais importantes vias de transdução de sinais ativadas por promotores tumorais. Estas proteínas convertem vários sinais extracelulares em resposta intracelular, através de cascatas de fosforilação (COBB; GOLDSMITH, 1995), compostas por três proteínas quinases ativadas sequencialmente (Figura 4). A partir do estímulo extracelular, a primeira proteína ativada é MEKK [MEK quinase ou MAP3K (MAPK quinase)], a qual fosforila e ativa MEK [MAPK/ERK ou MAP2K (MAP quinase) ou MKK (MAPK quinase)] que por sua vez fosforila MAPK (ou ERK quinase regulada por sinal extracelular) (MAEDA, 1994; MAEDA; TAKEKAWA; SAITO, 1995). Até o momento, foram identificadas três cascatas diferentes e paralelas de MAPK quinases em células de mamíferos: as proteínas quinases reguladas por sinal extracelular (ERKs), proteínas quinases c-Jun N-terminal ativadas por estresse (JNK) e quinases p38 (BODE; DONG, 2004).

Figura 4 – Esquema simplificado das vias de sinalização MAPK, PI3K, AKT e da ativação de NF-κB via MAPKs, modificado de Sarkar e Li (2004): AKT ou também PKB – proteína quinase B; PI3K – quinase-3-fosfatidilinositol

MAPKs são ativadas por uma grande cadeia de cascatas de sinalização que podem servir como um mecanismo comum e integrado com outras vias de sinalização para controlar respostas celulares a vários estímulos, incluindo xenobióticos e agentes farmacológicos (KWON et al., 2007). Em geral, a ERK é a principal proteína quinase ativada por mitógenos e fatores de crescimento e JNK e p38 seriam mais sensíveis à ativação por estresse do meio ambiente como UV e radiação ionizante, com a consequência de morte celular apoptótica (CHEN et al., 1996).

Uma vez ativada, estas três MAPKs (ERK, JNK e p38) podem fosforilar muitos fatores transcricionais, como Nrf2 (KWAK;WAKABAYASHI; KENSLER, 2004), NF-κB (KIM et al., 2005), c-Myc e alguns membros da família AP-1, c-Jun, c-Fos, ATF, dentre

outros. Isto pode levar às mudanças definitivas na expressão gênica (KARIN, 1995), afetando o crescimento e a sobrevivência celulares (YAMASHITA et al., 2008).

Estudos com quimiopreventivos derivados de plantas mostraram que a modulação da via de sinalização MAPK pode reduzir a inflamação. Conforme Salh et al. (2003), camundongos submetidos ao modelo de colite e tratados com curcumin apresentaram redução no processo inflamatório pela redução da indução de NF- κ B e da atividade de p38MAPK. Maeda-Yamamoto et al. (2003), em estudo *in vitro*, demonstrou que o tratamento com EGCG inibe a fosforilação de ERK e suprime a atividade de p38MAPK em células de fibrosarcoma humano. Os efeitos dos fitoquímicos sobre a via MAPK, aparentemente, variam conforme o tipo celular estudado (XIAO et al., 2005), visto que o mesmo quimiopreventivo apresentou inibição e ativação desta via. A ativação da via foi observada nos tratamentos *in vitro* com o EGCG (DEGUCHI et al., 2002), o curcumin (WEIR et al., 2007), o resveratrol (ALKHALAF; JAFFAL, 2006), o CAPE (*caffeic acid phenethyl ester*) (LEE et al., 2003), isotiocianatos (BODO et al., 2007; XU et al., 2006) e a inibição foi observada em tratamento *in vivo* com o EGCG (HARPER et al., 2007) e *in vitro* com o mesmo composto (KIM et al., 2004), com curcumin (WOO et al., 2005) e isotiocianatos (JAKUBÍKOVÁ et al., 2005).

A via quinase 3-fosfatidilinositol (PI3K) é outra via ativada pela sinalização de EGFR/HER2. As PI3Ks fazem parte de uma família de enzimas divididas em três classes, denominadas classe IA e IB, classe II e classe III, compostas estruturalmente por uma subunidade catalítica, uma adaptadora e uma regulatória que formam heterodímeros complexos entre si (VANHAESEBROECK; WATERFIELD, 1999). A PI3K IA é a principal classe de enzimas que responde a estímulos de fatores de crescimento. Esta resposta inicia-se com a interação da subunidade catalítica (p110) com resíduos fosfotirosina dos receptores de fator de crescimento ativados e a subsequente ligação de p110 a Ras (ativada por fatores de crescimento), que estimula a atividade de PI3K. Várias proteínas sinalizadoras interagem em domínios específicos de PI3K ativada, sendo as principais AKT (ou proteína quinase B-PKB) e quinase 1 dependente de fosfoinosítide (PDK1). A proximidade destas proteínas possibilita a fosforilação de AKT por PDK1, resultando na ativação de outras proteínas e levando ao crescimento celular, entrada no ciclo, migração e sobrevivência celulares (CANTLEY, 2002). A ativação de AKT fornece às células sinais de sobrevivência que conferem resistência a estímulos apoptóticos pela fosforilação/inativação de proteínas pró-apoptóticas, como as BAD, caspase 9 e fatores de transcrição (BIANCO et al., 2006). AKT é também um regulador positivo indireto de rapamicina (mTOR), a qual controla eventos centrais no crescimento e metabolismo celulares. Esta regulação ocorre pela inativação dos inibidores de mTOR, como

as tuberinas (TSC2), podendo ocorrer fosforilação direta de mTOR por AKT (BJORNSTI; HOUGHTON, 2004).

A via PI3K/AKT é inativada pela regulação de PTEN (fosfatase e tensina homóloga suprimidas do cromossomo 10), uma fosfatase que desfosforila AKT e que, portanto, funciona como um supressor tumoral (BADER et al., 2005).

Os genes que codificam e/ou as proteínas membros da cascata de sinalização PI3K/Ras/AKT/PTEN encontram-se hiper expressos ou inativos em muitas formas de tumores, geralmente decorrentes de mutações ou estímulo excessivo. A enzima PI3K apresenta aumento de atividade por hiper expressão gênica ou mutações respectivamente nas subunidades p110 (CAMPBELL et al., 2004; SAMUELS et al., 2004) e p85 (JANSSEN et al., 1998; BORLADO et al., 2000), que foram identificadas em diferentes tipos de câncer, como câncer de mama (BACHMAN et al., 2004; CAMPBELL et al., 2004; LEVINE et al., 2005), de ovário (PHILP et al., 2001; CAMPBELL et al., 2004; WANG et al., 2005), de fígado (LEE et al., 2005; LEVINE et al., 2005), de cólon (PHILP et al., 2001), dentre outros.

A proteína AKT ou PKB apresenta aumento de atividade por hiper expressão gênica (BALSARA et al., 2004) ou aumento de fosforilação (MIN et al., 2003) identificados em câncer de pâncreas (CHENG et al., 1996), carcinoma de pulmão (BALSARA et al., 2004), leucemia mieloide aguda (MIN et al., 2003), melanoma (STAHL et al., 2004) e outros (VIVANCO; SAWYERS, 2002).

As funções reguladoras de PTEN sobre a via PI3K/AKT podem ser depletadas por mutações ou redução na transcrição e foram identificadas em câncer de cérebro (LI et al., 1997), próstata (LI et al., 1997; WANG et al., 2003; YOSHIMOTO et al., 2007), mama (LI et al., 1997; DEPOWSKI et al., 2001), pulmão (SORIA et al., 2002) carcinoma endometrial (WU et al., 2006) estão associadas a um prognóstico ruim (YOSHIMOTO et al., 2007).

Ras é membro de uma família de proteínas que se ligam a GTP, dividida em várias outras famílias de acordo com o grau de conservação da sequência gênica. As diferentes famílias são importantes para diferentes processos celulares. A família RHO é responsável pelo controle do citoesqueleto e a família Ras controla o crescimento celular e apresenta quatro isoformas: HRAS, KRAS4a, KRAS4b e Nras (LOWY; WILLUMSEN, 1993). Os membros desta família são regulados por GTP (guanosina trifosfato) que modula muitos aspectos do desenvolvimento celular como proliferação, diferenciação, motilidade e morte. Estas proteínas fazem parte de uma cascata de transdução de sinal ativada por receptores de fatores de crescimento, citocinas e hormônios; regulada por fatores que permutam o

nucleotídeo guanina (GEFs), causando a troca de GDP (guanosina difosfato) por GTP e promovendo a ativação de Ras pela ligação Ras/GTP.

Ras ativada se liga a enzimas efetoras como RAF (proteína quinase serina/treonina), PI3K, RALGDS (proteína relacionada a RAS estimuladora de dissociação de guanina) e PLC ϵ (fosfolipase C ϵ) que ativam outras vias de sinalização (figura 5), desencadeando, respectivamente, progressão do ciclo celular, sobrevivência por inativação de genes pró-apoptóticos, transporte de vesículas e ativação e mobilização de cálcio (DOWNWARD, 2003).

Figura 5 – Vias de sinalização de Ras mostrando e as quatro enzimas efetoras RAF, PI3K, RALGDS e PLC ϵ e as subseqüentes cascatas ativadas (DOWNWARD, 2003): $\perp$ inativação e $\downarrow$ ativação

A ativação de Ras é modulada pela ação de proteínas ativadoras de GTPase (GAP) que promovem a hidrólise da ligação Ras/GTP, inativando Ras. Em muitos tumores, mutações oncogênicas tornam Ras insensível à regulação negativa de GAP, perpetuando a ligação Ras/GTP (COX; DER, 2003) e levando ao constante envio de informações ao núcleo, como por exemplo, informações proliferativas. Entretanto, mesmo na ausência de mutação, a ininterrupta ativação de Ras pode ocorrer como resposta a sinais contínuos particularmente originados da ativação dos receptores da família HER (BIANCO et al., 2006).

Mutações nas diferentes isoformas de Ras foram identificadas em tipos distintos de tumores, com frequência variada: câncer de pâncreas (90%), pulmão (35%), coloretal (45%); tireóide (55-60%); melanoma (15%), bexiga (10%), fígado (30%); rim (10%); síndrome mielodisplásica (40%) e leucemia mielogênica aguda (30%) (DOWNWARD, 2003).

As vias de transdução estão conectadas entre si, desta forma, os efeitos quimiopreventivos das drogas anticâncer podem afetar mais de uma via de sinalização. Os polifenóis do chá verde, em estudos *in vitro* com diferentes linhagens de células tumorais, mostraram inibição da ativação da via PI3K/AKT (SIDDIQUI et al., 2004; PAN et al., 2007; QIN et al., 2007; SYED et al., 2007) o que acarretou a indução de apoptose pela modulação de genes envolvidos na inativação da cascata apoptótica, como a família Bcl-2, (QIN et al., 2007). A inativação desta via por muitos fitoquímicos induz a apoptose como ocorre com o curcumin (SQUIRES et al., 2003; SHANKAR; SRIVASTAVA, 2007) e o resveratrol uma fitoalexina natural (BENITEZ et al., 2007).

Lee et al. (2007) demonstraram, *in vitro*, que o bloqueio de PI3K/AKT está envolvido no mecanismo inibitório do flavonóide apigenina sobre o crescimento invasivo e metastático. Os efeitos inibidores sobre a capacidade invasiva de células tumorais, pela inativação de PI3K/AKT, foram identificados em outros quimiopreventivos como a silibinina (CHEN et al., 2005).

O tratamento da linhagem MCF-7 de células de câncer de mama com quimiopreventivos como o resveratrol, quercetina e genisteína apresentaram elevação nos níveis de PTEN (DAVE et al., 2005; WAITE; SINDEN; ENG, 2005) e por consequência a redução da atividade de AKT e o aumento de genes bloqueadores do ciclo celular, como p27 (WAITE; SINDEN; ENG, 2005).

Estudos *in vitro* mostraram a capacidade de EGCG inibir a atividade da proteína Ras não oncogênica (SHANKAR; SUTHAKAR; SRIVASTAVA, 2007) ou em Ras oncogênica (PENG; WARGOVICH; DIXON, 2006), levando à parada do crescimento celular. Kim, Kang e Moon (2001) demonstraram que o tratamento com curcumin inibe a capacidade invasiva induzida por H-ras em linhagem de células epiteliais de câncer de mama humano MCF10A. Modelos de carcinogênese em camundongos mostraram que os efeitos inibitórios de EGCG sobre a expressão de Ras também podem ser observados *in vivo* (HU; HAN; CHEN, 1995; SAHA et al., 2005).

3.3.2.4 Ciclo celular

A proliferação ou divisão celular gera duas células filhas idênticas a partir da duplicação e divisão do material genético, sendo um processo cíclico composto de quatro fases distintas: G1 (*gap-1*), S (síntese), G2 (*gap-1*) e M (mitose). As células executam dois eventos básicos de divisão celular durante as fases S e M; primeiramente ocorre a geração de uma simples cópia do material genético na fase S e depois, na fase M ocorre a divisão de todos os componentes celulares em duas células idênticas. As demais fases (G1 e G2) representam períodos de *gap* ou intervalos, nas quais as células se preparam para completar com sucesso a fase posterior (MALUMBRES; BARBACID, 2001).

Antes do início de G1, as células encontram-se num estado chamado de G0, no qual se mantém por um balanço entre proteínas reguladoras chamadas de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e ciclinas, onde a atividade das CDKs é inibida pela baixa concentração de ciclinas. As CDKs pertencem à uma família de proteínas quinases composta por 11 membros e são ativadas no ciclo celular de maneira fase dependente, sendo absolutamente necessária a associação com as ciclinas para que sejam ativadas. As ciclinas formam uma família de proteínas que aparecem e desaparecem durante as fases do ciclo celular, obedecendo a um padrão cíclico altamente controlado. As CDKs de mamíferos ligam-se a ciclinas específicas formando complexos ciclina-CDK; assim, CDK4 ou CDK6 ligam-se a ciclinas D; CDK2 à ciclina E e A e CDK 2 às ciclinas A e B (Figura 6). Cada um destes complexos tem função e substrato específicos no ciclo celular (KALDIS; ALEEM, 2005). Por exemplo, na ausência de CDKs, a proteína retinoblastoma (pRb) permanece ligada ao fator de transcrição E2F, o qual é responsável pela transcrição de genes importantes para a replicação do DNA. Entretanto, com a ligação com pRb, E2F fica inativo e impede a progressão do ciclo (TESSEMA; LEHMANN; KREIPE, 2004). A transição de uma fase do ciclo para outra depende da formação de diferentes complexos ciclina-CDKs. À medida que o ciclo progride ocorre a inativação de um tipo de complexo e a consecutiva formação de outro, que agem degradando fatores inibidores da progressão do ciclo celular (Figura 6).

Figura 6 – Representação simplificada do ciclo celular e dos complexos ciclina-CDK formados ao longo das fases do ciclo, modificada de van den Heuvel (2005)

3.3.2.4.1 Fase G1

Com o início da fase G1, as células respondem a estímulos proliferativos ou anti mitogênicos originados no meio extra ou intracelular. Estes estímulos culminam ou com o início do processo de divisão celular ou com a parada do ciclo, tornando a célula quiescente ou ainda com a diferenciação celular definitiva (TESSEMA; LEHMANN; KREIPE, 2004). Os receptores de sinalização externa, principalmente os de insulina ou de fatores semelhantes à insulina, são ativados pela ligação com seus respectivos ligantes, os quais recrutam um substrato receptor de insulina fosforilada (IRS), que por sua vez se liga ao PI3K e ativa AKT, desencadeando uma cascata que culmina com a ativação de mTOR. Rapamicina ou mTOR é uma proteína quinase responsável pelo aumento da biosíntese de proteínas que possibilitam o crescimento celular e progressão do ciclo celular pela fase G1 (SEELIGER et al., 2007).

O estímulo proliferativo aumenta a expressão de ciclinas tipo D (D1, D2 e D3) que se acumulam na célula. Este acúmulo possibilita à célula transpor o ponto de restrição (R), onde a partir deste momento, o ciclo transcorrer independente de estímulos mitogênicos. As ciclinas D são consideradas importantes integradoras da sinalização mitogênica e sua síntese ocorre pela via RAS/RAF/MAPK (MALUMBRES; BARBACID, 2001). O aumento da concentração permite a formação de complexos entre a ciclina D e as CDKs 4 e 6, que são ativados por duas reações opostas, uma desfosforilação catalisada pela fosfatase CDC25 e

uma fosforilação pelas proteína quinase ativadora de CDKs (CAK) (GASTWIRT; MCANDREW; DONOGHUE, 2007). Numerosos genes incluindo c-myc são conhecidos por inibir ou ativar a proliferação celular, agindo sobre a formação e atividade dos complexos ciclina-CDKs. A expressão de c-myc é requerida para as células quiescentes entrarem no ciclo. A proteína c-myc ativa a transcrição da CDC25, uma fosfatase que ativa CDKs, sendo a expressão de CDC25 necessária para que c-myc induza a ativação do ciclo celular (KING; CIDLOWSKI, 1998).

A ação da CAK CDC25 ativa o complexo ciclina D-CDK4/6, o qual fosforila pRb que se desliga de E2F, permitindo que E2F promova a transcrição de muitos genes necessários para a entrada na fase S. O aumento da atividade do fator E2F durante a fase G1 induz o aumento na concentração das ciclina E e CDK2, que formam o complexo ciclina E-CDK2, induzindo a degradação dos fatores de inibição Hct1 e p27 (TESSEMA; LEHMANN; KREIPE, 2004) e a expressão de ciclina A (JOHNSON et al., 2002). O complexo ciclina E-CDK2 permite que as células progridam da fase G1 para a fase S. Nesta fase, a ciclina E sofre ubiquitinação e é degradada via proteossomos (JOHNSON et al., 2002).

3.3.2.4.2 Checkpoint G1

A transição entre as fases é um processo extremamente controlado, e se acontecer algo errado a célula possui sistemas que interrompem o ciclo. Estes pontos de controle são chamados de *checkpoints*, e estão situados antes da fase S (*checkpoint* G1) e da fase M (*checkpoint* G2), que são sensíveis a sinais anti-proliferativos ou danos ao DNA (SANDAL, 2002). Caso ocorra dano ao DNA, um importante gene supressor de tumor, p53, é ativado e estimula famílias de proteínas inibidoras de quinases dependentes de ciclinas, as CKIs a inibirem a formação dos complexos ciclinas/CDKs, impedindo a progressão do ciclo. No *checkpoint* G1, observa-se a ação de duas famílias de CKIs: a família INK4 (p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C} e p19^{INK4D}), que inibem as CDK4 e CDK6; e a CIP/KIP (p21^{CIP1}, p27^{KIP1} e p57^{KIP2}), que inibem a atividade do complexo CDK2-ciclina E (MALUMBRES; BARBACID, 2001).

3.3.2.4.3 Fase S

A fase S, onde ocorre a duplicação do material genético, apenas tem início quando as proteínas necessárias para a replicação do DNA atingem um nível adequado. A replicação nos eucariotos inicia-se em múltiplos pontos do cromossomo simultaneamente. Nesta fase há a formação de um sistema que impede que uma nova replicação do DNA reinicie antes da divisão tenha se processado corretamente, chamado de sistema licenciador de replicação (*replication licensing system*). Este sistema promove a formação de complexos pré-replicativos em cada ponto de início de replicação. Um complexo capaz de reconhecer a origem de replicação é formado e proteínas específicas (cdc6/18, cdt1 e Mcm) associam-se a este ponto.

Depois de estabelecida a origem, uma proteína helicase (Mcm) desenrola a fita de DNA a frente de cada origem. O deslocamento desta helicase previne o reinício da replicação. A progressão pela fase S é regulada pelos complexos de ciclina-CDK, como ocorre na fase G1 (TESSEMA; LEHMANN; KREIPE, 2004). A ciclina A, que foi expressa em resposta à atividade da ciclina E-CDK2, associa-se com CDK2 e fosforila um grande número de proteínas, como pRb, p107, fatores de transcrição, regulares de fatores de transcrição e complexos replicativos (JOHNSON et al., 2002). Desta forma, a fosforilação dos componentes do processo de replicação do DNA pelo complexo ciclina A-CDK2 é necessária para que a replicação tenha início. O ciclo entra na fase G2 depois da completa duplicação dos cromossomos (TESSEMA; LEHMANN; KREIPE, 2004).

3.3.2.4.4 Fase G2

A formação e ativação do complexo ciclina A-CDK2 ou CDK1 possibilita que o ciclo progrida pela fase G2 (KALDIS; ALEEM, 2005). As células na fase G2 contêm cromossomos duplicados consistindo de duas cromátides irmãs. Nesta fase do ciclo ocorre a conferência se o material genético e as estruturas, como os centrômeros, estão corretamente duplicados antes que o processo de divisão celular se inicie. A presença de dano no DNA ou duplicação incompleta ocorrida durante a fase S ativa o mecanismo de *checkpoint* G2 (TESSEMA; LEHMANN; KREIPE, 2004).

3.3.2.4.5 Checkpoint G2

Na presença de dano no DNA sinais dependentes de ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) e ATR (ATM e Rad3-*related*) param o ciclo pela ação de uma proteína quinase (Chk1), que inibe por fosforilação CDC25, impedindo que participe da ativação de CDC2 (ou CDK1). Esta fosforilação de CDC25 cria um sítio de ligação para uma proteína chamada 14-3-3 σ , que se une a CDC25 e a leva para o citoplasma (ABRAHAM, 2001). Similarmente, 14-3-3 σ liga-se ao complexo ciclinaA-CDC2 e o leva para o citoplasma, parando o ciclo. CDC25 também é inibida pela ação da CKI p21, que se liga a CDC25 impedindo que interaja com outras proteínas relacionadas como a progressão do ciclo (NYBERG et al., 2002), como PCNA, uma molécula envolvida com a replicação e reparo. Esta ligação poderia auxiliar na ativação de CDC25 ou como um sinal de término da síntese e reparo do DNA (KAWABE et al., 2002), levando à inativação do *checkpoint* e à continuação do ciclo.

A partir do bloqueio do ciclo, mecanismos de reparo do DNA são acionados e na impossibilidade de restaurar o dano, a célula entra em processo apoptótico.

3.3.2.4.6 Fase M

A fase M (mitose) combina dois processos: a mitose (segregação dos componentes celulares) e a citocinese (divisão da célula em duas). A entrada na mitose é induzida pelo aumento da atividade do complexo ciclina B-CDC2, também conhecido como MPF (fator promotor de mitose). MPF é inativado pela fosforilação de duas quinases Myt1 e Wee1 e ativado pela ação da fosfatase CDC25 (LEE; YANG, 2001). A função de MPF é fosforilar proteínas motoras relacionadas com os microtúbulos, que são importantes para a condensação dos cromossomos, quebra do envelope nuclear, montagem do fuso e separação dos centrômeros (NIGG, 2001).

Os processos de separação das cromátides irmãs e saída da mitose são controlados por um complexo promotor de anáfase (APC), uma proteína ubiquitina ligase que direciona proteínas chaves para proteólise. As cromátides irmãs estão unidas no cinetócoro por uma proteína chamada de coesina e a separação ocorre apenas pela ação da separase que cliva a coesina. Entretanto, a separase até o momento da separação das cromátides, permanece

inativa pela ligação com a proteína securina. Sob ação de APC, a ligação separa-se e a securina é desfeita e as cromátides separadas (NIGG, 2001).

Outro *checkpoint*, chamado *checkpoint* mitótico previne que a célula entre em anáfase antes que os cinetócoros de cada cromátide estejam devidamente ligados às fibras do fuso.

3.3.2.4.7 Checkpoint mitótico

A identificação de que um dos cinetócoros não está ligado às fibras do fuso, ativa Mad2 que se liga ao cinetócoro e inativa APC, parando o ciclo. O restabelecimento da ligação cinetócoro-fibras do fuso, desfosforila Mad2 que se desliga cessando a inibição de APC, completando a mitose e finalizando o ciclo (SCHOLEY; BRUST-MASCHER; MOGILNER, 2003).

A figura 7 resume a regulação positiva e negativa, das fases e dos *checkpoints* do ciclo celular.

Figura 7 – Representação simplificada da regulação positiva e negativa, das fases e dos *checkpoints* do ciclo celular, modificada de Tessema; Lehmann e Kreipe (2004)

3.3.2.4.8 Ciclo celular e quimioprevenção

A desregulação do ciclo celular é uma característica de células malignas ou transformadas (NA; SURH, 2006). A análise molecular de tumores humanos mostra que os reguladores do ciclo celular estão frequentemente mutados nas neoplasias. As alterações incluem hiper expressão de ciclinas (principalmente D1 e D3) e CDKs (principalmente CDK4 e CDK6); perda das CKIs (principalmente p15^{INK4B}, p16^{INK4A} e p27^{KIP1}) e da expressão de RB (MALUMBRES; BARBACID, 2001). Outra proteína crítica na regulação do ciclo celular é a proteína supressora p53, que regula a expressão dos genes envolvidos na parada do ciclo. Esta proteína é uma das mais mutadas em neoplasias humanas, mais de 50% dos tumores malignos estão associados às mutações em p53, incluindo câncer de bexiga, mama, pulmão, cólon, fígado, próstata e pele. O prognóstico nestas neoplasias é reservado pela agressividade e alta letalidade apresentadas (SANDAL, 2002).

Os quimiopreventivos derivados de plantas apresentam controle sobre o ciclo celular de diferentes linhagens de células tumorais por mecanismos variados. Um mecanismo envolve a hiper regulação de proteínas inibidoras de quinases dependentes de ciclinas, as CKIs e foi apresentado pelo EGCG (HASTAK et al., 2003; GUPTA; HUSSAIN; MUKHTAR, 2003; SAH et al., 2004; KIM; MOON, 2005; NIHAL, 2005; SHANKAR; SUTHAKAR; SRIVASTAVA, 2007); curcumin (AGGARWAL et al., 2006; PARK et al., 2006; LIU et al., 2007; SRIVASTAVA et al., 2007); resveratrol (HEISS; SCHILDER; DIRSCH, 2007; WHYTE et al., 2007); isotiocianatos (KUANG; CHEN, 2004; ZHANG et al., 2006; MATSUI et al., 2007) e flavonóides (CHOI, 2007; PRASAD et al., 2007; VAUZOUR et al., 2007).

Efeitos inibidores sobre ciclinas e CDKs foram observados nos tratamentos com EGCG (DEGUCHI et al., 2002; THANGAPAZHAM et al., 2007); resveratrol (BENITEZ et al., 2007); CAPE (YANG et al., 2005; HE et al., 2006; XIANG et al., 2006); isotiocianatos (XIAO et al., 2004) e flavonóides (NGUYEN et al., 2006; UJIKI et al., 2006; HOGAN et al., 2007; SHUKLA; GUPTA, 2007; HSIAO et al., 2007). Alguns destes fitoquímicos apresentaram efeitos sobre outros alvos moleculares, como o curcumin, que parou o ciclo celular pela ativação de p53 (HOWELLS; MITRA; MANSON, 2007; WEIR et al., 2007); o EGCG aumentou a atividade da proteína pRb (LIANG et al., 1999); a inibição de c-myc foi observada em estudo com o resveratrol (ZHANG et al., 2006) e o CAPE (HE et al., 2006;

XIANG et al., 2006). O resveratrol apresentou ainda controle do ciclo celular via ativação de ATM/ATR (SHIMIZU et al., 2006; TYAGI et al., 2005).

3.3.2.5 Processo apoptótico

Quando ocorrem danos ao DNA, os mecanismos dos “*checkpoints*” são ativados e levam à parada do ciclo celular. A impossibilidade de reparo pode levar as células a diferentes processos de morte celular, sendo o mais comum o processo apoptótico. Este processo é mediado por uma família de proteases, as caspases (ALNEMRI et al., 1996). Esta família divide-se em caspases efetoras (caspase-3, 6 e 7) e iniciadoras (caspase-8, 9 e 10), que ocorrem no citoplasma em uma forma inativa (procaspase), necessitando ser ativadas para desencadear o processo apoptótico (SALVESEN; DIXIT, 1997). Existem duas vias de ativação das caspases: as vias intrínseca e extrínseca. Na via extrínseca (Figura 8), a ativação é mediada por receptores de morte na superfície celular, que fazem parte de uma superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF). Os receptores de morte são ativados pelos seus ligantes naturais como CD95, TRAIL-R1 (ligante R1 indutor de apoptose relacionado a TNF) ou TRAIL-R2. Esta ligação atrai o adaptador de proteína intracelular FADD (proteína do domínio de morte associada a Fas, ou MORTI) formando o complexo de DISC (complexo sinalizante de morte induzida). Este complexo recruta caspases inativas (caspases iniciadoras 8 e 10) e as ativa por clivagem. Este processo possibilita a ativação das principais caspases efetoras (caspase-3, 6 e 7) (IGNEY; KRAMMER, 2002).

A via intrínseca (Figura 9) é mediada pela mitocôndria e desencadeada por estresses intra e extracelulares, como hipóxia, indução oncogênica e danos ao DNA, dentre outros. A ativação da mitocôndria é mediada por membros da família BCL2, o qual se divide em membros pró-apoptóticos (subfamílias BAX e BH3) e anti-apoptóticos. As BH3 são sensores de morte presentes no citosol ou citoesqueleto, e que após receberem o estímulo interagem com membros da família BAX, que sofrem mudança conformacional e se inserem na membrana mitocondrial, oligomeriza, formando canais permeáveis às membranas, permitindo a liberação do citocromo c. Os membros anti-apoptóticos da família BCL2 podem interagir com BAX e impedir a sua mudança conformacional ou a oligomerização. O citocromo c liberado da mitocôndria no citoplasma forma complexo (apoptossomo) com APAF1 (fator 1 ativador de protease apoptótica), ATP e a caspase 9 iniciadora, a qual é ativada dentro deste

Figura 9 – Representação simplificada da via intrínseca de ativação do processo apoptótico mediada pela mitocôndria, modificada de Igney e Krammer (2002)

Morfologicamente, o processo apoptótico é caracterizado pelo encolhimento celular, bem como pela condensação da cromatina nuclear, que se dispõem às margens da membrana nuclear no início do processo. Nos estágios mais tardios, o núcleo progressivamente se condensa e rompe em um processo chamado de cariorrexia. Em seguida, a célula destaca-se do tecido ao redor, deformações no citoesqueleto formam prolongamentos que se separam e a membrana plasmática se fecha, formando membranas separadas ao redor do material celular sólido. Estes corpúsculos apoptóticos estão repletos de organelas celulares e fragmentos nucleares, onde algumas estruturas como membranas e mitocôndrias ainda estão bem preservadas. As membranas dos corpúsculos expressam fosfatidilserina, um fosfolípido que é reconhecido por receptores das células adjacentes, como macrófagos e células parenquimatosas, possibilitando a sua fagocitose (SARASTE; PULKKI, 2000). Os corpúsculos apoptóticos fagocitados podem ser reconhecidos dentro das células e ainda, podem ser visualizados pela característica de emissão de fluorescência através da eosina presente no interior destes corpúsculos em cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina e observados sob luz ultravioleta em microscópio de fluorescência (WOOD; SARMA; ARCHER, 1999).

Todos os eventos apoptóticos até a remoção dos corpúsculos transcorrem sem nenhuma associação com o processo inflamatório.

3.3.2.5.1 Regulação do processo apoptótico

O processo apoptótico é altamente controlado. As proteínas FLIPs [*FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme-like protease (FLICE/caspase-8)-inhibitory*] interferem com o processo apoptótico diretamente nos receptores ou se ligam ao complexo de DISC impedindo a sua ligação e ativação da caspase 8. Os membros da família BCL2, proteínas anti-apoptóticas (BCL2, BCL-XL, BCL-w, MCL1, A1/BFL1, BOO/DIVA, NR-13) e pró-apoptóticas (BAX, BAK, BOK/MTD, BCL-XS, BID, BAD, BIK/NBK, BLK, HRK/DP5, BIM/BOD, NIP3, NIX, NOXA, PUMA, BMF) agem sobre a permeabilidade da membrana mitocondrial. As proteínas inibidoras de apoptose (IAPs), ligam-se às caspases inibindo-as e, as vezes, podem assumir função de ubiquitina ligases e promover a sua degradação proteossomal. A família das IAPs é formada por nove membros: XIAP (hILP, MIHA, ILP-1), cIAP1 (MIHB, HIAP-2), cIAP2 (HIAP-1, MIHC, API2), NAIP, MLIAP, ILP2, livina (KIAP), apolion e survivina e são inibidas pela proteína chamada SMAD/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI*). As SMADs são liberadas das mitocôndrias juntamente com o citocromo c e durante a apoptose promove a ativação de caspases ao se ligar as IAPs, inativando-as (IGNEY; KRAMMER, 2002).

Quando ocorre dano ao DNA, a regulação da apoptose é mediada pela proteínas p53, que funciona como ativador transcricional de genes pró-apoptóticos, ativando diretamente vários genes da família Bcl-2. p53 atua também hiporegulando genes anti-apoptóticos como Map4 e survivina; e hiperregulando genes pró-apoptóticos como Bax, IGF-BP3, DR5, Fas, e Apaf-1 e outros componentes do apoptossomo. As proteínas p63 e p73 ligam-se a genes associados a p53, induzindo a apoptose (MARTIN, 2006).

Entretanto, a ativação de genes promotores de sinais de sobrevivência em células tumorais, pode manter a proliferação celular e reduzir a sensibilidade a apoptose (IGNEY; KRAMMER, 2002; MARTIN, 2006). Fatores de crescimento, citocinas, hormônios e outros estímulos, mediados geralmente via PI3K/AKT, são considerados sinais de sobrevivência e têm sido alvo de muitos quimiopreventivos. Assim como o controle da hiperativação de NF-

κ B, AP-1, da hiporegulação ou perda de genes estimuladores da apoptose, como p53 e família Bcl2 pró-apoptótica (MARTIN, 2006).

3.3.2.5.2 *Quimioprevenção e apoptose*

O balanço entre proliferação e morte celular é um fator determinante na progressão ou inibição do processo de carcinogênese. Uma grande variedade de mecanismos pode ser ativada ou inativada para induzir apoptose (STEELE; KELLOFF, 2005). Os quimiopreventivos derivados de plantas apresentam a capacidade de desencadear vários destes mecanismos em diferentes tipos de linhagens celulares de tumores humanos. Um destes mecanismos refere-se à hiperregulação de genes pró-apoptóticos aliada a hiporegulação de genes inibidores da apoptose, muitas vezes acompanhado do aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação do citocromo c, ativando a cascata de caspase. Este conjunto de mecanismos de ação foi observado nos tratamentos com o EGCG (HASTAK et al., 2005; ROY; BALIGA; KATYAR, 2005; MANNA et al., 2006; HARAKEY et al., 2007; HSUW; CHAN, 2007; SHANKAR; SUTHAKAR; SRIVASTAVA, 2007); curcumin (RAMACHANDRAN et al., 2005; SKOMMER; WLODKOWIC; PELKONEN, 2005; SONG et al., 2005; SHI et al., 2006; BHATTACHARYYA et al., 2007; SHANKAR et al., 2007; SHANKAR; SRIVASTAVA, 2007); o resveratrol (AZIZ et al., 2006; BHARDWAJ et al., 2007; SHANKAR et al., 2007; SHANKAR; SIDDIQUI; SRIVASTAVA, 2007); alguns isotiocianatos (BODO et al., 2006; XIAO; VOGEL; SINGH, 2006; PARK et al., 2007) e mais alguns flavonóides (MEERAN; KATYAR, 2007; LAH; CUI; HU, 2007; PRASAD et al., 2007; SHEN et al., 2007; SHIM et al., 2007).

Outro mecanismo seria sensibilizar as células inativando vias de sinais de sobrevivência, este muitas vezes pode estar acompanhado da hiperregulação de genes pró-apoptóticos ou redução na expressão de genes anti-apoptóticos, acarretando na liberação do citocromo c pela mitocôndria; como observado com o EGCG (SEN; CHAKRABORTY; RAHA, 2006; QIN et al., 2007; TANG et al., 2007; THANGAPAZHAM et al., 2007); o curcumin (SHISHODIA et al., 2005; AGGARWAL et al., 2006; DIVYA; PILLAI, 2006; TOMITA et al., 2006; ZHENG; TONG; WU, et al., 2006; DEEB et al., 2007; LIN et al., 2007; MARÍN et al., 2007; SHANKAR; SRIVASTAVA, 2007; WEIR et al., 2007); o resveratrol (POZO-GUISADO et al., 2005; LI et al., 2006; SEXTON, et al., 2006; SHIMIZU

et al., 2006; SUN et al., 2006); o CAPE (WATABE et al., 2005) e alguns flavonóides (ENGELBRECHT et al., 2007; JU et al., 2007; KIM et al., 2007; LAH; CUI; HU, 2007; MEERAN; KATIIYAR, 2008; JIN et al., 2007).

3.3.2.6 Controle da comunicação inter celular - junções comunicantes do tipo gap

Segundo Trosko (2006), desde o início da fertilização até um indivíduo atingir a velhice, uma simples célula prolifera e diferencia-se 100 trilhões de vezes. Um sistema delicado e integrado de mecanismos de comunicação inter e extracelular existe para controlar a proliferação celular, a diferenciação, apoptose, senescência ou a resposta adaptativa quando a célula atinge a diferenciação definitiva. A maioria das células diferenciadas que formam um tecido (exceto a musculatura esquelética adulta) (YAMASAKI; NAUS, 1996) pode responder coordenadamente a sinais do meio extracelular pela integração conferida pelas junções comunicantes do tipo *gap* (TROSKO, 2006).

A estrutura das junções *gap* em microscopia eletrônica (Figura 10) aparece como uma região onde as membranas plasmáticas de células adjacentes aproximam-se sem se tocarem, permanecendo a uma distância de 2-3 nm (SÁEZ et al., 2003).

Figura 10 – Eletromicrografia de região de aproximação entre duas células (A e B), correspondente à junção comunicante do tipo *gap* (SÁEZ et al., 2003)

Estruturalmente, estas junções são formadas por dois canais, os hemi-conexons, fornecidos por cada célula adjacente (Figura 11). Cada conexon é composto por seis

subunidades de proteínas, as conexinas, que se distribuem hexagonalmente formando o poro central com, aproximadamente, 40 Å de diâmetro (SÁEZ et al., 2003).

Figura 11 – Representação esquemática da organização das conexinas na membrana plasmática, formando o conexon, interligando duas células adjacentes. Modificado de Vine e Bertran (2002)

As conexinas dos mamíferos pertencem a uma família constituída por 21 membros, subdividida em três classes, α , β e γ , de acordo com a homologia das seqüências nucleotídicas. Dessa maneira, na classe α encontram-se as conexinas 25, 26, 30, 30.3, 31, 31.1, 32; na β as conexinas 37, 40, 43, 46, 50, 59, 62; na γ as 31.3, 31.9, 36, 40.1, 45, 47 e as conexinas 30.2 e 58 não se incluem em nenhuma das três classes. Geralmente, as conexinas são identificadas pela abreviatura Cx ou Gj seguida pelo peso molecular correspondente, sendo que última abreviatura é acompanhada pela designação da classe a qual a conexina pertence (CRUCIANI; MIKALSEN, 2006). Todas as conexinas identificadas são fosfoproteínas, exceto as Cx26 β . A fosforilação das conexinas é importante para a formação das junções gap, trânsito e abertura do canal (WEI; XU; LO, 2004).

Os membros desta família podem interagir entre si, formando conexons homoméricos (formado por 6 conexinas iguais) ou heteroméricos (formados por 6 conexinas diferentes), que por sua vez podem combinar, constituindo canais homotípicos (formado por conexons iguais) ou heterotípicos (formado por conexons diferentes) (Figura 12).

Figura 12 – Representação esquemática das possíveis organizações das conexinas para formar conexons homo e heteroméricos e de conexons para formar canais homo e heterotípicos. Modificado de WEI; XU e LO (2004)

As conexinas estão presentes em todos os tecidos animais, com exceção do músculo esquelético adulto, entretanto é difícil identificar um padrão de distribuição tecidual das conexinas. Várias conexinas apresentam expressão tecido-específica, por outro lado, muitos tecidos apresentam expressão de diferentes conexinas (Quadro 3), sendo que este padrão de variabilidade ainda pode ser influenciado por outros fatores, como fase do desenvolvimento ou tratamentos com drogas farmacológicas (YAMASAKI; NAUS, 1996).

Conexina	Tecidos
Cx 26	fígado, rim, baço, pulmão, estômago, intestino, cérebro, pâncreas, pele, glândula pineal;
Cx 30.3	pele
Cx 31	pele
Cx 31.1	epitélio escamoso estratificado, pele;
Cx 32	fígado, cérebro, rim, baço, útero, pulmão, estômago, intestino;
Cx 37	vasos, coração, cérebro, estômago, intestino, fígado, rim, baço, útero, ovário, pulmão, pele;
Cx 40	vasos, coração, rim, útero, ovário, pulmão, intestino;
Cx 43	coração, cérebro, músculo liso, rim, útero, ovário, pulmão, estômago, intestino, pele, córnea, osso, placenta, cristalino;
Cx 45	pulmão, cérebro, rim, pele, coração, intestino;
Cx46	cristalino, coração, rim, nervos periféricos;
Cx 50	cristalino, córnea, coração.

Quadro 3 – Distribuição tecidual de algumas conexinas, modificada de Yamasaki e Naus (1996)

As junções comunicantes do tipo *gap* possibilitam o livre trânsito de pequenas moléculas (1-2 kDa), metabólitos e mensageiros como sódio, potássio, cálcio, AMP cíclico, inositol 1,4,5-trifosfato (BRUZZONE; WHITE; PAUL, 1996; KING; BERTRAM, 2005) que permitem uma contribuição metabólica entre as células de um mesmo tecido (LO, 1999). Desta forma, as junções *gap* (formada por conexinas) estão envolvidas na homeostase tecidual e são associadas aos processos que envolvem proliferação celular, como a cicatrização e reparo tecidual, fibrose e cirrose hepáticas, angiogênese e carcinogênese (YAMASAKI; NAUS, 1996; CHANSON et al., 2005; ZAIDAN DAGLI; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, 2007).

3.3.2.6.1 *As junções comunicantes do tipo gap e o câncer*

A capacidade de comunicação por junções do tipo *gap* e a expressão de conexinas encontram-se reduzidas em condições onde há um aumento da proliferação celular, como por exemplo, quando células são expostas a fatores de crescimento e a promotores tumorais (BUNDUNOVA; WILLIAMS, 1994; GUAN; BONNEY RUCH, 1995). A maior parte das células neoplásicas apresenta níveis alterados de expressão de conexinas e redução da capacidade de comunicação por junções *gap* (KING; BERTRAM, 2005). Por exemplo, os hepatócitos expressam as conexinas Cx26 e Cx32, e estudos demonstraram que a deficiência da Cx32 em camundongos *knockout* acelera o processo de hepatocarcinogênese (MOENNIKES et al., 2000; EVERT et al., 2002). O mesmo foi observado em camundongos deficientes para Cx43 submetidos a modelo de carcinogênese pulmonar com uretana (AVANZO et al., 2004). Estudos em células tumorais onde a expressão da conexina é restabelecida, mostraram redução no crescimento celular, acompanhado de alterações em algumas ciclinas e CDKs e aumento da expressão dos inibidores de CDK, p27 e p21 (CHEN et al., 1995; KOFFLER et al., 2000; ZHANG et al., 2001; ZHANG; KANEDA; MORITA 2003; SÁNCHEZ-ALVAREZ et al., 2006).

As junções *gap* apresentam um papel importante em limitar a proliferação aberrante observada na carcinogênese, enquanto não é possível eliminar a formação de células iniciadas, prevenir o desenvolvimento de neoplasias pela redução da proliferação celular pode ser uma efetiva estratégia de prevenção do câncer (KING; BERTRAM, 2005).

3.3.2.6.2 *Quimioprevenção e junções comunicantes do tipo gap*

Vários estudos demonstraram que quimiopreventivos como retinóides, carotenóides e as epigallocatequinas do chá verde podem evitar a ação inibidora de agentes promotores tumorais sobre as junções *gap* ou restabelecer a comunicação intercelular em diferentes tipos de linhagens de células tumorais. Os mecanismos utilizados por estes fitoquímicos incluem a fosforilação da conexina, levando à sua estabilização na membrana e aumento das junções *gap*, como observado com células tratadas com o ácido retinóico (WATANABE et al., 1999; ARA et al., 2002); o EGCG (ALE-AGHA; STAHL; SIES, 2002); o resveratrol (NIELSEN;

RUCH; VANG, 2000); o CAPE (NA et al., 2000; LEE et al., 2004); no flavonóide caempferol (NAKAMURA et al., 2005) e no sulforano (HWANG et al., 2005). O aumento da expressão do RNAm das conexinas é outro mecanismo responsabilizado pelo aumento da formação das junções *gap* e foi identificado como resultado dos tratamentos com o ácido retinóico (WATANABE et al., 1999; CARYSTINOS et al., 2001; DAUBRAWA; SIES; STAHL, 2005); carotenóides (HIX; LOCKWOOD; BERTRAM, 2004; HIX et al., 2005); o EGCG (SIGLER; RUCH, 1993; TAKAHASHI et al., 2004) e outros flavonóides (NAKAMURA et al., 2005; CONKLIN et al., 2007).

Alguns estudos avaliaram o restabelecimento da funcionalidade dos canais das junções *gap* pelo método de transferência de corante fluorescente. Este método consiste em injetar na célula um corante fluorescente, o qual deve ter a propriedade de se difundir pelo espaço intracelular e permear entre as células adjacentes via junções *gap*. A funcionalidade das junções é fornecida pela quantificação em microscópio de fluorescência da difusão do corante e foi observado um resultado positivo do ácido retinóico (ZHANG et al., 2002); EGCG (KLAUNIG, 1992) e de alguns flavonóides (CHAUMONTET et al., 1994) na taxa de difusão do corante fluorescente dentre as células via junções *gap*.

A carcinogênese, como sumarizado até aqui, é um processo que envolve múltiplas vias de sinalização, expressão gênica, proliferação celular e desestabilização da homeostasia tecidual. Neste contexto, os fitoquímicos têm se apresentado como fonte importante de novas drogas contra o desenvolvimento de neoplasias, fortalecendo a pesquisa de drogas anticâncer baseadas no potencial de plantas. Os resultados obtidos têm fortalecido o direcionamento das pesquisas de drogas anticâncer, para o potencial das plantas. Os mecanismos de ação de algumas classes de fitoquímicos que estão presentes na dieta humana foram apresentados aqui, entretanto, muitas outras classes, não relacionadas à dieta, estão em estudo no mundo inteiro.

O Brasil é o país com a maior biodiversidade genética vegetal do mundo com mais de 55.000 espécies catalogadas, entretanto, apenas 1.100 espécies foram avaliadas quanto às propriedades medicinais e destas, apenas 590 foram registradas no Ministério da Saúde para comercialização (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2002), o correspondente a pouco mais de 1% da nossa biodiversidade. O Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo tem contribuído para aumentar este número desenvolvendo pesquisas *in vivo* e *in vitro* com plantas medicinais brasileiras como a *Pfaffia paniculata*.

3.4 PFAFFIA PANICULATA

A planta *Pfaffia paniculata* (Figura 13) pertence à família *Amaranthaceae* sendo encontrada nas regiões sudeste e sul a partir do estado de Minas Gerais. Apresenta hábito semi arbustivo, ocorrendo na beira de rios, matas semi devastadas ou clareiras onde pode receber muita luz. Descrita pela primeira vez em 1826 recebeu o nome de *Hebanthe paniculata*, sendo renomeada como *Gomphrena paniculata* em 1875 e a partir de 1934 passou a ser identificada definitivamente como *Pfaffia paniculata* (SMITH; DOWNS, 1972).

Figura 13 – *Pfaffia paniculata* planta com raiz exposta (foto gentilmente cedida pelo Profº Gokithi Akisue)

No Brasil é conhecida popularmente como “ginseng do Brasil”, “suma”, “corango” e “paratudo” (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1980). As raízes de *Pfaffia paniculata* (Figura 14) são as partes da planta que despertam interesse tanto comercial quanto científico.

Figura 14 – Destaque da raiz de *Pfaffia paniculata* (foto gentilmente cedida pelo Profº Gokithi Akisue)

Comercialmente atribuem-se às raízes dos representantes do gênero *Pfaffia* propriedades imunoestimulante, cicatrizante e anti-inflamatória, sendo recomendados no tratamento fitoterápico de alterações circulatórias, estresse, anemia, diabetes e astenia (TESKE; TRENTINI, 1994). Entretanto, poucos ou nenhum estudo científico comprova estas atribuições com relação à planta *Pfaffia paniculata*.

O interesse pelas propriedades antineoplásicas das raízes de *Pfaffia paniculata* originou-se na década de 80. Takemoto et al. (1982) isolaram um novo nortriterpenóide, denominado ácido pfáfico (Figura 15), a partir do extrato metanólico ou do produto hidrolítico das saponinas contidas nas raízes de *Pfaffia paniculata*. Segundo pesquisas do grupo este ácido apresentava alta capacidade de inibir o crescimento de células tumorais como células do melanoma B-16, Hela (S-3) e do carcinoma de Lewis do pulmão.

Os principais componentes da raiz de *P. paniculata* foram identificados por Nishimoto et al. (1984) e Nakai et al. (1984) como sendo estigmasterol, estigmasterol- β -D-glucosídeo, sitosterol, sitosterol- β -D-glucosídeo, alantoína, ácido pfáfico, pfafosídeos A, B, C, D, E e F (Figura 15). Em testes *in vitro* estas saponinas demonstraram a capacidade em inibir a proliferação tumoral de células do melanoma B-16 sendo que somente o pfafosídeo F apresentou o mais elevado efeito inibitório entre outras (Nakai et al., 1984).

Figura 15 – Estrutura química do ácido pfáico ($R_1=R_2=H$) (NAKAI et al., 1984) e dos pfafosídeos A, B, C, D, E e F (OLIVEIRA et al., 1986)

Watanabe et al. (2000) administraram por gavagem, 250mg/kg da raiz em pó de *P. paniculata* diluída em PBS, três vezes por semana, durante oito semanas, a camundongos AKR/J, que desenvolvem linfomas tímicos espontâneos. O tratamento com a raiz em pó reduziu o desenvolvimento dos linfomas. Os autores atribuíram esta ação à presença de pfafosídeos. O grupo concluiu que a utilização clínica das raízes de *P. paniculata* pode ser indicada em imunoterapia do câncer em pacientes em estágios avançados, podendo ainda ser utilizada em combinação com outras drogas ou terapias.

Os estudos com as raízes de *P. paniculata* no Laboratório de Oncologia-Departamento de Patologia-FMVZ-USP iniciaram em 2001 com a formação de um grupo de pesquisas direcionado a avaliar *in vivo* e *in vitro* as propriedades antineoplásicas presentes nestas raízes, testando-as em diferentes modelos experimentais.

O primeiro trabalho deste grupo foi publicado em 2003. Matsuzaki et al. (2003) pré trataram camundongos BALB/c, administrando por gavagem 200mg/kg da raiz em pó de *P. paniculata*, diluída em água mineral, uma vez por dia, durante 10 dias. Após este período os camundongos foram submetidos a modelo de desenvolvimento da forma ascítica do tumor de Ehrlich, pela inoculação intraperitoneal das células deste tumor. O tratamento prosseguiu após a inoculação por mais 10 dias. Os resultados mostraram que o tratamento reduziu o volume ascítico e o número de células do tumor de Ehrlich. Segundo os autores estes resultados podem ser atribuídos, respectivamente, à ação anti-inflamatória, e estimulatória sobre macrófagos ou outras células do sistema imune.

O mesmo grupo, dois anos depois, estudou os efeitos das raízes de *P. paniculata* sobre a fase de promoção da hepatocarcinogênese. Camundongos submetidos à iniciação com carcinógeno hepático aos 15 dias de vida foram tratados a partir do desmame, por 27 semanas com a raiz em pó de *P. paniculata* adicionada à ração, nas concentrações de 2 e 10%. O tratamento reduziu o número e a área de lesões preneoplásicas hepáticas, indicando um efeito inibitório destas raízes na fase de promoção da carcinogênese (Da Silva et al., 2005).

O ano seguinte marcou o início de uma mudança nas pesquisas do grupo, que passou a avaliar os efeitos de extratos obtidos a partir das raízes de *P. paniculata*. Pinello et al. (2006) avaliaram os efeitos do extrato metanólico sobre a atividade macrofágica em camundongos submetidos ao modelo de desenvolvimento da forma ascítica do tumor de Ehrlich. Os animais foram tratados por gavagem com 100, 250 ou 500mg/kg do extrato metanólico, 10 dias antes e após a inoculação das células do tumor de Ehrlich. Os testes de espriamento, fagocitose e produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico realizados a partir do lavado peritoneal,

mostraram que o tratamento aumentou o índice de espraçamento dos macrófagos, apresentou tendência em aumentar o índice fagocítico e não alterou os demais parâmetros analisados.

Matsuzaki et al. (2006) avaliaram os efeitos dos extratos etanólico, butanólico e resíduo aquoso obtidos a partir das raízes de *P. paniculata* nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg administrados por gavagem a camundongos submetidos ao modelo de desenvolvimento da forma ascítica do tumor de Ehrlich. Foram analisados o número de células, o volume ascítico, a toxicidade e a sobrevivência dos camundongos. Os tratamentos não apresentaram indícios de toxicidade, os camundongos tratados com 200mg/kg do extrato butanólico mostraram aumento na sobrevivência média, os demais parâmetros não apresentaram alterações.

Carneiro et al. (2007) estudaram os efeitos do extrato butanólico sobre camundongos submetidos a modelo de neovascularização. Os camundongos foram tratados por 6 dias com 250, 500 ou 1000 mg/kg do extrato butanólico, submetidos modelo de angiogênese pela cauterização de uma pequena área da córnea, continuando o tratamento por 5 dias após a cauterização. Foram avaliadas a toxicidade dos tratamentos e a porcentagem de vasos formados na córnea. O tratamento com 1000 mg/kg do extrato butanólico reduziu a angiogênese na córnea dos camundongos e não apresentou toxicidade nos animais. Segundo os autores a propriedade de reduzir a angiogênese apresentada pelo extrato butanólico das raízes de *P. paniculata* confirma o potencial dessa planta como agente anticâncer.

3.4.1 Saponinas e o câncer

Os estudos realizados com o ginseng brasileiro, *Pfaffia paniculata*, atribuem propriedades anticarcinogênicas aos pfaosídeos, saponinas triterpenóides presentes nas raízes desta planta. As saponinas constituem um vasto grupo de glicosídeos que possuem uma parte com característica lipofílica (agliconas) e outra hidrofílica (açúcares), responsáveis pela propriedade de reduzir a tensão superficial da água e pelas ações emulsificante e detergente. As saponinas podem ser estruturalmente classificadas conforme a sua porção aglicona. Saponinas esteroidais apresentam núcleo composta de 27 átomos de carbono e as saponinas triterpenóides são formadas por núcleo de 30 átomos de carbono. As substâncias que compõem o grupo apresentam estrutura complexa, devido à presença de variado número de açúcares ou de diversas agliconas (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2002). Dentre os

inúmeros efeitos biológicos em animais pode-se destacar a inibição da proliferação de células tumorais.

As propriedades anti-neoplásicas de saponinas provenientes de diversas variedades de plantas foram estudadas *in vitro* e *in vivo* nas últimas duas décadas em diferentes tipos de tumores. Os resultados identificaram efeitos sobre a capacidade de inibir a proliferação celular, o aumento da citotoxicidade, a indução de apoptose e aumentar a comunicação celular através das junções comunicantes do tipo *gap*.

As frações saponínicas mais estudadas são os ginsenosídeos derivados da planta *Panax ginseng* (ginseng coreano). Os efeitos sobre a proliferação de células tumorais estão relacionados com o controle do ciclo celular e com a indução apoptótica. Os estudos mostram que o controle da proliferação celular em células tumorais ocorre pela inibição de proteínas responsáveis pela progressão celular como as CDKs (WAKABAYASHI et al., 1998; KIM et al., 1999; LIU; XU; CHE, 2000; MUJOO et al., 2001; TATSUKA; MAEDA; OTA, 2001; JEONG et al., 2007; WANG et al., 2007) e estímulo de proteínas inibidoras de CDKs (KIM et al., 1999; KANG et al., 2005). Segundo os autores os efeitos sobre estas proteínas poderiam induzir apoptose celular (WANG et al., 2007).

Lee et al. (2000) observaram *in vitro* o controle da proliferação de células tumorais pela indução de apoptose via liberação do citocromo c. O citocromo c está presente no interior das mitocôndrias; danos irreversíveis à membrana mitocondrial provocam a sua liberação para o citosol. No citosol o citocromo c ativa a protease caspase-3, proteína responsável por uma das vias de ativação da cascata apoptótica.

O estudo da ação antitumoral de saponinas originadas de outras plantas mostrou que o controle da proliferação celular ocorre pelo aumento da citotoxicidade (DE TOMMASI et al., 2000; MIMAKI et al., 1999); pela inibição da síntese de DNA (PLOHMANN et al., 1997) pela indução apoptótica (WANG et al., 2001; TIAN et al., 2006); pelo estímulo do sistema imunológico (WATANABE et al., 2000) e pela ação anti-inflamatória (MATSUZAKI et al., 2003). Outros estudos não identificaram o mecanismo de ação sobre o controle da proliferação de células tumorais, apenas observaram a sua inibição (TAKEMOTO et al., 1982; NAKAI et al., 1984; NISHIMOTO et al., 1984; EINBOND et al., 2006).

Kang et al. (2000) estudaram *in vitro* a ação de frações saponínicas do *Panax ginseng* em culturas de células epiteliais de rato, submetidas à ação de drogas (TPA e H₂O₂) inibidoras das junções comunicantes do tipo *gap*. Os resultados indicaram que o tratamento restabeleceu a comunicação inter celular pela inativação das drogas inibidoras.

Hasegawa et al. (1996) simularam *in vitro* a digestão de diferentes frações saponínicas do *Panax ginseng* pela incubação com uma mistura de bactérias intestinais, os metabólitos originados da digestão das bactérias foram identificados cromatograficamente. Em ensaio *in vivo* observaram que os mesmos metabólitos são absorvidos nos intestinos, identificados no sangue e excretados na urina. Wakabayashi et al. (1998) analisaram os efeitos destes metabólitos sobre células tumorais e identificaram a capacidade de induzir apoptose via inibição de quinases dependentes de ciclinas. Este resultado indica que as propriedades das saponinas observadas *in vitro* podem ser mantidas em ensaios *in vivo*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EXPERIMENTO 1 – EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA RAIZ EM PÓ DE *P. PANICULATA* ADICIONADAS À RAÇÃO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE HEPATOCARCINOGÊNESE

Parte da metodologia e todo o material biológico utilizado neste experimento foram desenvolvidos e/ou obtidos durante o transcorrer do mestrado, sendo aproveitados neste estudo com a intenção de ampliar os conhecimentos sobre o mecanismo da ação antineoplásica apresentada pelas raízes de *Pfaffia paniculata*. Abaixo serão descritos os materiais e as metodologias adotadas para avaliação dos efeitos de diferentes concentrações da raiz em pó de *P. paniculata* adicionada à ração em camundongos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese. Neste experimento foram avaliados os seguintes parâmetros: proliferação celular pela contagem dos núcleos PCNA positivos; indução de apoptose pela contagem dos corpúsculos apoptóticos fagocitados e ensaio do cometa alcalino; comunicação intercelular mediada pelas conexinas 32 e 26 pelas técnicas de transferência de corante - *Incision Loading / Dye Transfer*, imunofluorescência, *western blot* e PCR em tempo real. A metodologia referente à análise dos efeitos do tratamento sobre as lesões preneoplásicas está descrita na dissertação de mestrado e publicada em periódico indexado (DA SILVA et al., 2005).

4.1.1 Animais

Foram utilizados 70 camundongos BALB/c machos provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil. Os animais foram mantidos em caixas de policarbonato, com no mínimo 3 e no máximo 6 animais por caixa, em sala com fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 45-60%.

4.1.2 *Pfaffia paniculata* - Ração Experimental

A raiz em pó de *Pfaffia paniculata* foi gentilmente fornecida pelo Dr. Gokithi Akisue. O espécime desta planta foi comprovado pela identificação das características de suas flores e folhas, depositadas no Herbário Goro Hashimoto (São Paulo, Brasil) (37.411). A ração experimental consistiu de ração comercial (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes Ltda, Brasil) acrescida de diferentes concentrações da raiz em pó de *Pfaffia paniculata* de acordo com o tratamento a ser administrado. Esta ração foi preparada no Centro de Pesquisas em Toxicologia, CEPTOX da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, Brasil. A ração comercial foi triturada, recebeu a adição da raiz em pó de *P. paniculata* nas concentrações de 2 e 10% por peso, foi umedecida e repeletizada, secando em temperatura ambiente. A ração destinada aos grupos que não seriam tratados com a raiz recebeu o mesmo tratamento, porém, sem a adição da raiz em pó. A ração e a água foram fornecidas *ad libitum*.

4.1.3 Modelo de hepatocarcinogênese

Foi utilizado o “modelo do camundongo infantil” modificado de Vesselinovitch e Mihailovich (1983). O carcinógeno DEN (Sigma, diluído em solução salina 0,9% autoclavada) foi utilizado como agente iniciador, sendo injetado i.p. na concentração de 10 µg/g em camundongos de 15 dias de idade. A proliferação celular necessária nesta idade ao desenvolvimento normal do fígado atuou como promotor na formação de lesões preneoplásicas. Estas lesões foram observadas 27 semanas após a administração do carcinógeno.

4.1.4 Administração do carcinógeno e formação dos grupos

Os camundongos com 15 dias receberam 100 µl de solução salina (0,9%) contendo DEN na concentração de 1 µg/µl por via intraperitoneal. As aplicações foram realizadas em fluxo laminar, utilizando agulhas “ultra-fine II” (8,0 mm X 0,3 mm) em seringas de insulina U-100, seguidas de massagem local. Após cada aplicação, o carcinógeno restante e todo o material utilizado, eram neutralizados em solução saturada de NaOH (CASTEGNARO et al., 1982). Os camundongos foram desmamados aos 30 dias de vida, pesados e numerados com auxílio de marcador auricular. Depois, os animais foram gradativamente separados para formar os grupos experimentais: 1) grupo controle positivo (CT⁺), onde os animais (n = 20) não receberam a raiz adicionada à ração, sendo positivos para a ação do carcinógeno; 2) grupo 2%, onde os animais (n = 20) foram tratados com 2% da raiz em pó e 3) grupo 10%, onde os animais (n = 20) receberam 10% da raiz em pó adicionada à ração. Um grupo adicional de animais normais (n = 10) foi analisado, sendo que estes não receberam o carcinógeno DEN e nem a ração acrescida da raiz de *P. paniculata*, o qual foi considerado como controle negativo para a ação do carcinógeno (CT⁻).

4.1.5 Delineamento Experimental

Imediatamente após a formação dos grupos, os animais foram tratados com as rações experimentais correspondentes (2% e 10%) durante 27 semanas. Os grupos controle e duplo controle foram submetidos ao mesmo período experimental, recebendo a ração sem adição da raiz em pó. Transcorrido este período, os camundongos foram eutanasiados pela administração intraperitoneal de anestésico tiopental (Thiopentax-Cristalia). Após, um fragmento do lobo esquerdo do fígado foi removido para a avaliação da comunicação intercelular. Fragmentos de cada lobo hepático foram fixados em metacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético), rotineiramente processados e incluídos em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram obtidos para coloração de HE e confecção de lâminas para imuno-histoquímica e análise histopatológica. O restante do fígado foi congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C para as técnicas de *western blot*, PCR em tempo real e técnica do cometa.

4.1.6 Determinação do Índice de Atividade Histológica Hepático - Exame Histopatológico

As alterações histopatológicas do tecido hepático dos animais foram analisadas em lâminas coradas em HE segundo os critérios clássicos estabelecidos por Knodell et al. (1981) e modificados por Ishak et al. (1995), onde as lesões foram classificadas segundo sua atividade necro-inflamatória (graduação, com *scores* entre 0 e 18). Os parâmetros analisados foram infiltrado inflamatório focal e portal, necrose e necrose em saca-bocado (ou necrose de *Piecemeal*), que se caracteriza quando o infiltrado inflamatório ultrapassa a interface entre o espaço porta e os hepatócitos. Na tabela abaixo estão descritos os critérios adotados para cada classificação, assim como a pontuação relacionada a cada variável (Quadro 4). A atribuição numérica foi somada por camundongo, obtendo-se média e desvio padrão por grupo experimental.

Necrose de Piecemeal	Score
Ausente	0
Suave (focal / poucas regiões portais)	1
Suave a Moderado (focal / diversas regiões portais)	2
Moderado (contínuo ao redor de < 50% das regiões portais ou sinusoidais)	3
Severo (contínuo ao redor de > 50% das regiões portais ou sinusoidais)	4
Necrose	Score
Ausente	0
Necrose focal	1
Necrose em Zona 3 (poucas regiões)	2
Necrose em Zona 3 (diversas regiões)	3
Necrose em Zona 3 e ocasionalmente na ponte v. porta - v. terminal hepática	4
Necrose em Zona 3 e múltiplos locais na ponte v. porta - v. terminal hepática	5
Necrose multiacinar	6
Inflamação focal*	Score
Ausente	0
1 foco ou menos por campo (objetiva de 10x)	1
2 a 4 focos por campo (objetiva de 10x)	2
5 a 10 focos por campo (objetiva de 10x)	3
Mais de 10 focos por campo (objetiva de 10x)	4
Inflamação portal	Score
Ausente	0
Suave (poucas regiões portais)	1
Moderado (diversas regiões portais)	2
Acentuado (todas as regiões portais)	3
Severo (todas as regiões portais)	4

*Não inclui infiltrado sinusoidal difuso por células inflamatórias.

Quadro 4 – Índice de atividade histológica (IAH) e seus *scores* relacionados à graduação da hepatite crônica (Ishak et al., 1995)

4.1.7 Avaliação da proliferação celular - Imuno-histoquímica para PCNA

Os efeitos do tratamento sobre a proliferação celular foram avaliados por imuno-histoquímica para PCNA ($n = 7$ animais/grupo). Lâminas silanizadas (silano 3-*aminopropyl-trietoxy-silane*: Sigma Chemical Co.St.Louis Montana, USA) do tecido hepático parafinado foram desparafinados, hidratadas e submetidas à recuperação antigênica com tampão borato 0,2 M, pH 7,2, em microondas por 15 minutos. Depois, a peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação com solução de peróxido de hidrogênio 30%, em metanol, por 30 minutos. Após lavagens, as lâminas foram imersas em leite desnatado 5%, por 10 minutos e à 37°C, para bloqueio das reações inespecíficas e posteriormente, incubadas *overnight* com anticorpo anti-PCNA (DAKO A/S, Denmark), 1:800. Após, os cortes histológicos foram incubados com o kit LSAB+System-HRP (Dako, Carpinteria, Califórnia 93013, USA), revelados com diaminobenzidina (DAB+Chromogen, Dako Carpinteria, Califórnia 93013, USA) e contra-corados em hematoxilina. A avaliação consistiu na contagem dos núcleos de hepatócitos PCNA⁺ por mm² de tecido, com auxílio do sistema de análise de imagens Image Pro-Plus, versão 4.5 (Media Cybernetics Inc., Maryland, USA).

4.1.8 Avaliação da indução de apoptose - Contagem dos corpúsculos apoptóticos

Esta metodologia baseia-se na propriedade da eosina, presente nos corpúsculos apoptóticos, fluorescer quando exposta a luz ultravioleta sob microscopia de fluorescência, sendo útil para identificar as fases finais da apoptose (WOOD et al., 1999). As lâminas do tecido hepático coradas em HE ($n = 7$ animais/grupo) foram observadas em microscópio de fluorescência (Nikon E-800, Japão) para determinação do número de corpúsculos apoptóticos por mm² de fígado. Foram contados todos os corpúsculos apoptóticos e mensurada a área do corte. Esta análise foi feita com auxílio do sistema de análise de imagens Image Pro-Plus, - versão 4.5.

4.1.9 Avaliação da indução de apoptose e danos ao DNA - Técnica do cometa alcalino

O ensaio do cometa (ou técnica da eletroforese em microgel) tem por finalidade avaliar e detectar danos em fita simples do DNA, sendo um método sensível para identificar apoptose celular (WADA et al., 2003). Foi utilizado o método descrito por Singh et al. (1988) com modificações (HARTMANN et al., 2003; DE MOURA ESPÍNDOLA et al., 2005). Aproximadamente 50 µg do fígado congelado foi homogeneizado em macerador de tecido (Dounce Tissue Grinder-Wheaton Millville NJ, USA) em PBS (pH 7,4, ± 4°C). Os núcleos celulares foram diluídos em 0,8% de agarose *low melting point* (LMP—Sigma Chemical Company, St. Louis, USA). Esta mistura foi gotejada em lâminas previamente revestidas com 0,5% de agarose LMP e coberta com lamínula, permanecendo por 10 minutos a 4°C. A lamínula foi removida e as lâminas colocadas em solução de lise (2,5 M de NaCl; 100 mM de EDTA; 10 mM trizma base; 1% de n-lauril sarcosina; pH 10; 1 mL de Triton X-100) a 4°C, por 1 hora. As lâminas foram lavadas em água destilada três vezes com intervalos de 15 minutos, a 4°C e transferidas para a cuba de eletroforese, permanecendo por 20 minutos para o desenrolamento das fitas de DNA. A eletroforese foi realizada em 25V, 350 mA, por 40 minutos (voltagem para cuba Hoefer-HE 99x), no gelo e no escuro em solução tampão de eletroforese (300 mM de NaOH e 1 mM de EDTA, pH>13, ± 4°C). As lâminas foram neutralizadas em três banhos de 5 minutos em solução de Tris 0,4 M, pH 5,0 e secas verticalmente em temperatura ambiente. As lâminas foram imersas em solução fixadora (150g de ácido tricloroacético-TCA, 50g de ZnSO₄, 40 mL de glicerina, q.s.p. 1000 mL, 4°C) por 15 minutos, lavadas por 1 minuto em água destilada, a 4°C e secas verticalmente em temperatura ambiente. A coloração foi feita em uma mistura de soluções: 32 mL da solução A (50g Na₂CO₃ q.s.p. 1000 mL de água bidestilada) e 68 mL da solução B (0,2g de NH₄NO₃, 0,2g de AgNO₃, 1g de ácido silicotungstênico, 500 µL de formaldeído, q.s.p. 1000 mL de água bidestilada). Lavadas em água destilada por 1 minuto, por 5 minutos em solução finalizadora (1 mL de ácido acético q.s.p. 100 mL de água bidestilada) e por 1 minuto em água destilada, secando a temperatura ambiente.

A análise dos danos ao DNA e da apoptose foi realizada conforme determinado por Wada et al. (2003), com algumas modificações. Os autores baseiam-se na classificação de Miyamae et al. (1998), na qual os cometas são separados em 5 tipos diferentes (Figura 16) e conforme Wada et al. (2003), o cometa 5b é representante de uma célula apoptótica. Desta forma, foram analisados 500 cometas por camundongo (n = 7 animais/grupo), em objetiva de

10x, quantificados com auxílio de sistema de análise de imagens Image Pro-Plus, versão 4.5, e determinada a porcentagem correspondente a cada tipo de cometa formado.

Figura 16 – Classificação dos tipos cometas segundo Miyamae et al.(1998): A) tipo 1; B) tipo 2; C) tipo 3; D) tipo 4; E) tipo 5a e F) tipo 5b

4.1.10 Avaliação da comunicação intercelular

4.1.10.1 Método da transferência de corante fluorescente *lucifer yellow*

Nesta técnica foram utilizados dois corantes fluorescentes com propriedade migratórias antagônicas. O *lucifer yellow* foi utilizado como indicador de funcionalidade das junções comunicantes do tipo *gap* pois apresenta peso molecular de 457 kDa e migra livremente por estas junções. Em contrapartida, a rodamina com peso de 10200 kDa não passa pelas junções *gap*, penetrando apenas em células cuja membrana celular foi lesada. Desta forma, o uso concomitante destes corantes possibilitou a comprovação da real migração do *lucifer yellow*, indicando se este realmente migrou através das junções *gap* ou permeou em tecido danificado.

Foi utilizado o protocolo descrito por Sai et al. (2000). Imediatamente após a eutanásia, um fragmento do lobo esquerdo do fígado dos camundongos foi removido (n = 8

animais/grupo). Foram feitas 3 incisões no tecido, pingando-se sobre o mesmo uma mistura de corantes fluorescentes contendo 0,5% *lucifer yellow* e 0,5% rodamina em PBS. O corante permaneceu sobre o tecido por 3 min, sendo lavado em PBS após a incubação e fixado em formol tamponado 10% por 24 horas. O tecido foi rotineiramente processado, incluído em parafina e cortes de 5 µm foram desparafinados e observados em microscópio de fluorescência. A avaliação da comunicação entre os hepatócitos foi obtida pela razão entre a área de difusão do corante *lucifer yellow* e o comprimento do corte, sendo que as médias obtidas com as três incisões foram consideradas como dados de um animal. Esta análise foi feita com auxílio do programa de análise de imagens Image Pro-Plus, versão 4.5.

4.1.10.2 Imunofluorescência para conexina 32

A imunofluorescência para conexina tem a finalidade de definir a sua localização na célula e assim a sua funcionalidade, pois conexinas só estão funcionais quando localizadas na membrana citoplasmática. Cortes do tecido hepático em lâminas silanizadas (silano 3-*aminopropyl-trietoxy-silane*: Sigma Chemical Co. St. Louis Montana, USA) foram desparafinados, hidratados e submetidos ao bloqueio de reações inespecíficas pela incubação por 15 minutos em leite 5%, a 37°C. Em seguida foram incubados com anticorpo policlonal para conexina 32 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA 94080), 1:100, 4°C, *overnight*. Os cortes foram lavados (3 vezes) em PBS e incubados com anticorpo secundário feito em cabra, anti-imunoglobulinas de coelhos biotinilado (Dako, Carpinteria, Califórnia 93013, USA); novamente lavados (3x, PBS) e incubados com o complexo estreptavidina-fluoresceína-FITC (DAKO A/S, Denmark). O esgotamento da fluorescência foi evitado utilizando-se Vectashield (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, 94010, USA). O material (n = 5 animais/grupo) foi imediatamente fotografado em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência e fotomicrografia para identificação de alterações na localização e/ou quantidade de junções *gap*.

4.1.10.3 *Western blot* para conexinas 26 e 32

4.1.10.3.1 *Extração das proteínas do tecido hepático*

Para avaliar a expressão das conexinas 26 e 32 no tecido hepático, a proteína total foi extraída de, aproximadamente, 40 mg de tecido hepático congelado (n = 5 animais/grupo). Sob refrigeração, as amostras foram picotadas em 400 µL de solução de 2x *Sample Buffer* (SDS 4%; Tris-HCl 120 mM pH 6,8; Glicerol 20%; H₂O destilada autoclavada), trituradas com macerador de tecido, sendo adicionado igual volume da solução *working solution* (2x *Sample Buffer*; DTT 100 mM; PMSF 1 mM; H₂O destilada autoclavada), centrifugada a 13000 rpm, 15 minutos, 4°C. O sobrenadante foi recolhido e a concentração de proteínas foi determinada em biofotômetro (*Eppendorf, Hamburg, Germany*).

4.1.10.3.2 *Técnica de western blot*

Os extratos de proteínas (150 µg) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (Bis/Acrilamida 37,5:1,0; Tris-HCl 1,5 M pH=8,8; H₂O destilada; SDS 10%; APS-persulfato de amônia 10%, Temed-tetrametil-etilenediamina) a 100V, por 3 horas. Em seguida foram transferidas em condição semi-seca para membrana de difluoreto de polivinilideno (Bio-Rad Laboratories, Hercules, C.A.), por eletroforese em tampão de transferência (Tris Base, Glicina, Metanol, SDS 10%, água destilada), 47 mA, por 37 minutos. A saturação de sítios inespecíficos foi realizada pela incubação com leite *skimmed milk* 5% por 2 horas, em temperatura ambiente, sob agitação constante. A membrana foi incubada *overnight* com anticorpo primário policlonal anti-conexina 26 ou 32 (1:500 em 5% *skimmed milk*; *Zymed Laboratories*, San Francisco, CA). Transcorrido este tempo, a membrana sofreu nova incubação com anticorpo secundário apropriado conjugado com peroxidase (1:500 em 5% *skimmed milk*; *Zymed Laboratories*, San Francisco, CA), por 2 horas, em temperatura ambiente, sob agitação constante. A reação foi revelada em solução contendo diaminobenzidina (*Sigma Aldrich*), sulfato de níquel e peróxido de hidrogênio. A membrana revelada foi escaneada (*Epson perfection 1660 Photo, Nagano Ken, Japan*) e a

intensidade de marcação foi analisada com auxílio do programa *Image Master* (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) pela comparação entre o volume das bandas formadas com o controle endógeno beta-actina.

4.1.10.4 Avaliação da expressão gênica das conexinas 26 e 32 por PCR em tempo real

4.1.10.4.1 Extração de RNA total

A extração do RNA total foi feita com reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) de acordo com o estabelecido no protocolo do fabricante. Foram separadas 5 amostras por grupo para análise e retirados fragmentos de aproximadamente 50mg. Os fragmentos foram lavados com PBS (pH 7,4 à 4°C livre de RNase), transferidos para *eppendorfs* *Rnase free* contendo 500 µL de Trizol, homogeneizados e incubados por 5 minutos, a temperatura ambiente. A este homogenato foram acrescentados 250 µL de clorofórmio. Os *eppendorfs* foram agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados a temperatura ambiente, por 2 minutos. As amostras foram então centrifugadas por 20 minutos, 12000 rpm, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outros *eppendorfs* contendo isopropanol, homogeneizados suavemente e incubados por 15 minutos em gelo, novamente centrifugados nas mesmas condições anteriores, descartando-se o sobrenadante. O *pelet* resultante foi solubilizado com 1 mL de álcool 70% com DEPC. Esta solução foi centrifugada a 10000 rpm, 4°C por 10 minutos, o excesso de álcool retirado e o *pelet* (RNA-total) solubilizado em 100 µL de água tratada com DEPC (livre de RNase).

4.1.10.4.2 Quantificação e determinação da integridade do RNA total

Uma alíquota de 10 µL foi retirada para quantificação e verificação da integridade do RNA. O restante foi armazenado imediatamente em freezer -80°C até sua utilização. A análise qualitativa foi realizada submetendo-se as amostras a eletroforese em gel de agarose 1,5% diluída em TAE 1X (48,4g de Tris base; 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0; 11,4 mL de Ácido

Acético; H₂O MilliQ autoclavada q.s.p. 1000 mL), 60V, por 1,5 hora. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 mg/mL em H₂O destilada) para a visualização das bandas 28S e 18S em luz UV. A correta identificação destas bandas indica a qualidade do RNA. A quantificação foi realizada em biofotômetro (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) a 260/280nm. Amostras num range de 1.7 até 2.0 ng/μL indicam baixa contaminação do RNA, sendo consideradas de boa qualidade para a transcrição reversa.

4.1.10.4.3 Transcrição reversa

Para eliminar quaisquer resquícios de DNA, o RNA total foi tratado com DNase I. Foi utilizado 1 μL de DNase I para tratar 4 μg/μL de RNAtotal. Os *eppendorfs* foram mantidos a temperatura ambiente por 15 minutos, sendo adicionado 1 μL de EDTA (25 mM) para bloquear a ação da enzima e aquecidos por 10 minutos a 65°C em banho seco seguido de resfriamento em banho de gelo. As amostras receberam 1 μL de Oligo DT; 1 μL de dNTPs (mix 10 mM-2,5 mM de cada dNTP) e posteriormente foram incubadas a 65°C por 5 minutos e resfriadas em gelo. Ainda no gelo foram adicionados a cada tudo 4 μL do buffer 5X (*superscript II*); 2 μL de DTT 1M; 1 μL de *RNAse OUT* incubando-se por 2 minutos a 42°C e resfriadas no gelo. Foi acrescido 1 μL da enzima de transcrição reversa *superscript II*, permanecendo incubado a 42°C, por 50 minutos e em seguida por 70°C por 15 minutos e resfriada no gelo. Em seguida foi acrescido 1 μL da enzima RNAse H (para eliminação de resíduos de RNA da amostra de cDNA), permanecendo por 20 minutos a 37°C. O cDNA foi armazenado a -20°C até o momento da amplificação do cDNA. Todos os reagentes foram fornecidos pela *Invitrogen Life Technologies*.

4.1.10.4.4 Primers e probes

Os TaqMan *probes* foram marcados com um corante fluorescente *reporter*, FAM (6-carboxifluoresceína), na posição 5' final e um corante fluorescente *quencher* TAMRA (6-carboxi-tetrametil-rodamina) na posição 3' final. Os *primers* e *probes* utilizados foram: *conexina 32 (Cx32)* sequência *forward* 5'GGGTGGCCTCAAGGATAGG3'; *reverse* 3'GGTGTATAGACCTGTCCAGTTCATC5'; *probe* FAM-3'CTCCCCAGGTGTGAATG5' - NFQ e *conexina 26 (Cx26)* *forward*: CAT GCA ACG TCT GGT GAA ATG; *reverse*: GGG CCT GGA AAT GAA GCA; *Probe*: 6FAM AAC GCT TGG CCC TGC CCC AAT AMGBNFQ; sendo como controle endógeno o gene da β -actina (Assay ID Hs00242273_m1), todos fornecidos pela *Applied Biosystems*.

4.1.10.4.5 Quantificação relativa por PCR em tempo real

A análise por PCR em tempo real foi realizada em sistema de detecção ABI Prism 7000 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA) o qual contém uma câmera CCD acoplada que captura a fluorescência emitida e analisa os dados utilizando um programa de detecção *Sequence Detector* versão 1.6.. Para avaliação da expressão, foram colocados em tubos apropriados (*Optical Tubes Applied Biosystems*) 5 μ l de cada produto de PCR (cerca de 10ng de RNA total), tampão A TaqMan 1X, MgCl₂ 5.5 mM, 200 μ M de dATP/dCTP/dGTP, 400 μ M dUTP, 200 nM dos *primers* (senso e antisenso), 100 nM das *probes* TaqMan, 0.01U/mL de *AmpErase* e 0.025 U/ μ L da DNA polimerase *AmpliTaQ Gold* em um volume total de 50 μ L. Após a completa mistura dos reagentes cada tubo foi fechado com tampas *MicroAmp Optical (Applied Biosystems)*. Todas as reações foram corridas em duplicata. As condições de amplificação utilizadas foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C; seguidos de 40 ciclos a 90°C por 15 segundos para desnaturação da fita de cDNA e a 60°C por 1 minuto para sua extensão. A interpretação dos resultados foi realizada conforme descrito pelo método comparativo de Livak et al. (2001) onde a expressão relativa dos genes corresponde a $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

4.2 EXPERIMENTO 2 – EFEITOS DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DO EXTRATO BUTANÓLICO DA RAIZ DE *P. PANICULATA* SOBRE O CRESCIMENTO DA LINHAGEM DE CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO HEPG2

4.2.1 A linhagem de carcinoma hepatocelular humano HepG2

As células que originaram a linhagem de carcinoma hepatocelular humano HepG2 foram isoladas em 1979 de um garoto argentino de 11 anos. Estas células apresentam morfologia semelhante às células do parênquima hepático e sintetizam e secretam muitas proteínas plasmáticas características de um fígado humano normal. A linhagem mantém várias enzimas de fase I e II ativas o que possibilita a metabolização de drogas a semelhança do fígado humano normal (KNASMÜLLER et al., 1998). Apresenta ainda expressão de genes envolvidos no controle do ciclo celular como p27, ciclinas D1, D3, e E, CDK2, CDK4 e CDK6 (VARGHESE et al., 2005), tornando possível a identificação de alterações nos níveis destas proteínas, decorrente do tratamento administrado. A linhagem foi gentilmente doada pela Prof^a Dra. Ana Paula de Melo Loureiro da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo.

4.2.2 Cultivo e manutenção da linhagem de carcinoma hepatocelular humano HepG2

As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, em estufa umidificada com 5% de CO₂, a 37°C. Esta linhagem HepG2 apresentou sensibilidade aos antibióticos penicilina e estreptomicina, os quais são convencionalmente utilizados em cultura celular. Assim, os mesmos não foram adicionados ao meio. Entre cada plaqueamento as células foram tripsinizadas, processo que neutraliza a adesão das células ao substrato (garrafa ou placas de cultura), possibilitando que se soltem para novo plaqueamento. O processo consistiu na lavagem da cultura uma vez com PBS, para remoção do meio de cultura, incubação com tripsina-EDTA 0,25% em PBS, por 15 minutos, a 37°C. Após a incubação, foi adicionado meio DMEM com 10% soro fetal bovino para inativação da tripsina, as células foram centrifugadas a 1200 rpm, por 10 minutos,

ressuspendidas em meio e homogeneizadas vigorosamente com pipetador automático para dissolver os aglomerados celulares. Para o plaqueamento, as células após serem ressuspendidas foram contadas em câmara de *Neubauer* e a viabilidade celular determinada pelo método de exclusão do corante azul de tripan (0,01% em PBS). Este método auxilia na diferenciação entre as células vivas e mortas, por utilizar a propriedade deste corante penetrar apenas em células mortas, as quais assumem coloração azul, possibilitando a determinação da concentração de células vivas. Foi considerada aceitável uma viabilidade celular superior a 90%. Foi adotada uma concentração em torno de 10^6 células para o cultivo em garrafas. E a tripsinização constante foi evitada, ou seja, a cultura só era tripsinizada para ser plaqueada para a realização de experimento ou para ser congelada. As células não permaneciam mais do que uma semana em cultura, sendo congeladas após este período.

4.2.3 Obtenção das frações a partir do extrato butanólico das raízes de *P. paniculata*

A metodologia utilizada foi previamente descrita por Haraguchi et al. (2000). As raízes de *P. paniculata*, secas e moídas, pesando 11,87 Kg foram extraídas exaustivamente com etanol 92%, em temperatura ambiente, fornecendo após filtração e evaporação do solvente, 358 g de extrato etanólico. O extrato etanólico foi solubilizado em água e extraído com butanol saturado com água para produzir, depois da evaporação dos solventes, os respectivos resíduos: resíduo butanólico (45 g) e resíduo aquoso (136g). O resíduo aquoso não foi utilizado neste experimento. O resíduo butanólico foi dissolvido em água fornecendo duas porções: resíduo solúvel em água e resíduo insolúvel em água. A porção solúvel em água foi aplicada em coluna de Diaion HP-20 (Marca Mitsubishi) eluindo consecutivamente em água, mistura de metanol/água na proporção de 20:80, 40:60, 60:40, 80:20 e finalmente metanol. Este procedimento forneceu, após evaporação do solvente, os respectivos resíduos: fração 0%, fração 20%, fração 40%, fração 60%, fração 80% e fração 100%.

4.2.3.1 Análise das frações em cromatografia de camada delgada

A fração que apresentou resultados antiproliferativos, foi aplicada em placa cromatográfica de camada delgada em sílica gel 60 g (HPTLC da marca Merck), desenvolvida com mistura de solventes constituída de clorofórmio, metanol e água na proporção de 16:9:2. As manchas formadas foram reveladas com solução de ácido sulfúrico 10% seguido de aquecimento de 100° C por 10 min. Em seguida, foi calculado o fator de retenção (R_f) das manchas medindo a distância do ponto de aplicação da amostra até final do desenvolvimento da fase móvel sobre a distância do ponto de aplicação até a posição da mancha.

4.2.4 Curva de crescimento da HepG2

Foi realizada uma curva de crescimento celular da HepG2 para determinar a melhor concentração a ser utilizada nos testes com as frações. As células em cultura sofreram processo de tripsinização, foram contadas conforme descrito acima e diluídas nas concentrações de 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 e 1×10^7 por mL. Depois foram plaqueadas (100 μ L/poço) em placas de 96 poços de fundo chato estéril (*Corning*), em sextuplicatas, e incubadas por períodos de 24, 48 e 72 horas em estufa umidificada com 5% de CO₂, a 37°C. Após cada período de incubação, foi avaliada a viabilidade celular pela coloração com cristal violeta. A concentração definida a partir desta metodologia foi utilizada em todos os experimentos que envolveram teste de frações e ou solventes e subsequente análise em leitor de ELISA.

4.2.5 Avaliação da viabilidade celular

Foi utilizada a propriedade que o corante cristal violeta possui em ser incorporado por células vivas aderidas, possibilitando a sua posterior quantificação. As células foram tripsinizadas, quantificadas e plaqueadas em sextuplicatas na concentração específica para

cada etapa deste projeto. Transcorrido o período de 24 horas pós plaqueamento, as células foram tratadas com 100 µL/poço de cada solução de fração pelos períodos de tempo previamente estabelecidos (item 4.2.4). Após, as células foram coradas adicionando-se a cada poço 10 µL de cristal violeta (0,5% de cristal violeta e 30% ácido acético) para cada 100 µL de meio, incubando por 10 minutos e a temperatura ambiente. As placas foram lavadas em água corrente para retirada da solução corante e de células não aderidas, e secas em temperatura ambiente. Depois de secas, foram adicionados 100 µL/poço de metanol e feita leitura ótica a 540 nm em leitor de ELISA (*ICN Titertek Multiscan MCC/340, Uniscience*). Uma coluna por placa (6 poços), recebeu apenas meio de cultura para ser utilizada como referencial de branco para o leitor. Os dados foram expressos em absorbância média por tempo de incubação.

4.2.6 Determinação do solvente das frações

As frações 60, 80 e 100% obtidas a partir do extrato butanólico das raízes da planta *Pfaffia paniculata*, não apresentaram total solubilidade em meio aquoso, desta forma, foram testados a eficiência de dois solventes, o DMSO (dimetilsulfóxido) e o Tween 20 (polioxietilenosorbitan monolaurato). Foi escolhida para o teste a fração 100%, por apresentar maior dificuldade de solubilização. A fração foi pesada, previamente solubilizada com 0,01% de DMSO ou Tween 20, dissolvida em PBS no volume necessário para obter a concentração final de 1 mg/mL, sendo esterilizada pela filtração em microfiltro (0,22 µg - Millipore). Esta solução (1 mg/mL da fração em PBS) foi rediluída em meio de cultura (DMEM+10% soro fetal bovino) para obter uma solução final com o dobro das concentrações a serem testadas. Foi escolhida a maior concentração dentre as propostas para este estudo, ou seja, 100 µg/mL.

4.2.6.1 Preparo das culturas

As células foram tripsinizadas, quantificadas diluídas na concentração definida pela metodologia descrita no item 4.2.4, e plaqueadas em sextuplicatas, em placas de 96 poços de fundo chato estéril (*Corning*). Transcorrido o período de 24 horas pós plaqueamento, as células foram incubadas com 100 µL/poço da fração 100%, previamente diluída com DMSO ou Tween 20, por períodos de 24, 48, 72 horas, em estufa umidificada com 5% de CO₂, a 37°C. Dois grupos controle por placa, correspondentes a cada solvente testado, composto pela mesma linhagem celular, foi tratado com DMEM+10% de soro fetal bovino acrescido de 0,01% do respectivo solvente diluído na concentração testada.

4.2.6.2 Efeito dos solventes sobre a viabilidade celular

Após cada período de incubação a viabilidade celular foi avaliada conforme descrito no item 4.2.5. Os dados obtidos foram comparados com os seus respectivos controles. Assim, os dados da fração 100% dissolvida em DMSO (100%-DMSO), foram comparados apenas com o controle tratado com DMSO (CT-DMSO) e os controles foram comparados entre si. Os resultados obtidos referentes à viabilidade celular após o tratamento foram expressos em absorbância média por tempo de incubação.

4.2.7 Tratamento com as frações - determinação das frações e das concentrações a serem testadas

Definido o melhor solvente a ser utilizado, as frações 60%, 80% e 100% obtidas a partir do extrato butanólico das raízes de *Pfaffia paniculata* foram previamente solubilizadas e dissolvidas conforme descrito no item 4.2.6, para obtenção das concentrações finais de 1 ng, 10 ng, 100 ng, 1 µg, 10 µg e 100 µg/mL.

4.2.7.1 Preparo e tratamento das culturas

As células foram tripsinizadas, quantificadas, diluídas na concentração definida pela metodologia descrita no item 4.2.4 e plaqueadas em sextuplicatas, em placas de 96 poços de fundo chato estéril (*Corning*). Transcorrido o período de 24 horas pós plaqueamento, as células foram tratadas com 100 μL /poço de cada solução de fração, no dobro das concentrações definidas acima, por períodos de 24, 48, 72 e 96 horas, em estufa umidificada com 5% de CO_2 , a 37°C. Todas as metodologias desenvolvidas apresentaram um grupo controle por placa, o qual foi tratado com DMEM+10% de soro fetal bovino acrescido de 0,01% do solvente diluído nas concentrações testadas. A incubação com o dobro das concentrações testadas considera o fato das células serem plaqueadas com 100 μL /poço de meio de cultura, evitando que a fração sofra uma segunda diluição ao ser adicionada às células.

4.2.7.2 Efeito das frações sobre a viabilidade celular

Após cada período de incubação as células foram submetidas à coloração com cristal violeta e leitura ótica conforme descrito no item 4.2.5. Os dados foram expressos em absorbância média por tempo de incubação. A fração e a concentração que apresentaram maior efeito sobre a viabilidade celular foram utilizadas nos demais experimentos.

4.2.8 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

4.2.8.1 Preparo das culturas

As células foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 6 poços com fundo chato, estéril (*Corning*), em sextuplicatas, 1 mL por poço, na concentração de $1,5 \times 10^6/\text{mL}$. A definição desta concentração baseou-se em dois fatores, o primeiro ser 10^6 células a

concentração mínima exigida pela técnica e o segundo minimizar a redução do número de células devido ao tratamento ou da metodologia pós-tratamento. As culturas celulares (n = 6 amostras/grupo) destinadas ao tratamento com 100 µL/mL da fração 100%, bem como as do grupo controle, foram incubadas por 12, 24, 36 e 48 horas, em estufa umidificada com 5% de CO₂, a 37°C com os respectivos tratamentos.

4.2.8.2 Preparo das amostras e análise no citômetro de fluxo

Os procedimentos seguem a metodologia proposta por Spector et al. (1998) com algumas modificações. Após a quantificação descrita no item anterior, as células foram novamente centrifugadas a 1200 rpm, por 10 minutos, o sobrenadante desprezado e fixadas em 1 mL de etanol 70% gelado, sendo mantidas a -20°C até o momento da análise por citometria de fluxo. As amostras foram centrifugadas a 1800 rpm por 10 minutos, desprezado o sobrenadante e lavadas três vezes em 1 mL de PBS, ressuspensas em 200 µL em solução contendo 200 µL/mL de RNase A e 20 µL/mL de solução de iodeto de propídeo (80 µL de iodeto de propídeo 5 mg/mL em PBS, contendo 0,1% de triton X-100). As células foram incubadas nesta solução por 15 minutos, ao abrigo da luz, a 37°C e a leitura da fluorescência foi realizada em citômetro de fluxo.

4.2.8.3 Análise dos dados obtidos com a citometria de fluxo

As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo (*FACScan Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA*) conectado a um computador (*Machintosh Apple, CA, USA*). Foram adquiridos e analisados 10.000 eventos por amostra, as populações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades de FSC – *Foward Scatter* e SSC – *Side Scatter* que avaliam o tamanho e a complexidade interna, respectivamente. As fluorescências foram adquiridas em escala linear e a fluorescência do iodeto de propídeo detectada pelo leitor FL2 (585 nm). Os resultados foram analisados com auxílio do programa *Flow Jo* versão 7.2.2., que forneceu as porcentagens das fases G1 e G2 observadas em cada

amostra. Os dados foram expressos em porcentagem de cada fase do ciclo por tempo de tratamento.

4.2.9 Avaliação da expressão gênica das proteínas p27, ciclinas D1, D3, e E, CDK2, CDK4 e CDK6 por PCR em tempo real

4.2.9.1 Preparo das culturas

As células foram tripsinizadas, e plaqueadas em placas de 6 poços com fundo chato, estéril (Corning), em sextuplicatas, 1 mL por poço, na concentração de $2,0 \times 10^6$ /poço. A definição desta concentração baseou-se em testes anteriores visando determinar a mínima concentração células para obter a quantidade de RNA suficiente para a realização da técnica.. As culturas celulares (n = 6 amostras/grupo) destinadas ao tratamento com 100 μ L/mL da fração 100%, bem como as do grupo controle, foram incubadas por 12, 24 e 36 horas, em estufa umidificada com 5% de CO₂, a 37°C com os respectivos tratamentos.

4.2.9.2 Extração de RNA

A extração de RNA das culturas celulares foi realizada com o kit para extração de RNA - *RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE do Brasil). Após cada tempo de tratamento, as placas foram retiradas da estufa, colocadas em gelo e as células removidas raspando-se cada poços com um rodo apropriado para cultura (*cell scraper- Costar/Corning Incorporated, NY*). As culturas foram separadamente colocadas em tubos *falcon* (*Corning-15 mL*) e centrifugadas a 4000 rpm, 10 minutos, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado ressuspensionado em 350 μ L da solução de lise RA1 do kit, transferida para *eppendorff*, permanecendo por 15 minutos a temperatura ambiente. Depois, foram adicionados 3,5 μ L de β -mercaptoetanol ao lisado celular, sendo submetido ao vortex por 5 segundo. A partir deste momento a mistura foi transferida para colunas de extração, seguindo o protocolo determinado pelo fabricante do kit de extração. O processo consiste basicamente em colocar as células em pequenas colunas de

extração (adaptáveis a um *ependorff* de 1,5 mL), estas irão reter o RNA enquanto o mesmo é lavado e purificado com uma sequência de reagentes. Na etapa final o reagente promove a liberação do RNA da coluna, o qual foi mantido em freezer -80°C até o momento do uso.

4.2.9.2.1 *Determinação da integridade e quantificação do RNA total*

A integridade e quantificação do RNA total, extraído a partir das culturas de células foram obtidos com a mesma metodologia descrita anteriormente no item 4.1.10.4.2.

4.2.9.2.2 *Transcrição reversa*

A transcrição reversa, responsável pela confecção do cDNA a partir do RNA total extraído das culturas de células, foi realizada com a mesma metodologia descrita anteriormente no item 4.1.10.4.3.

4.2.9.2.3. *Primers e probes*

Todos os reagentes foram fornecidos pela *Applied Biosystems* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA) os TaqMan *probes* foram marcados com um corante fluorescente *reporter*, FAM (6-carboxifluoresceína), na posição 5' final e um corante fluorescente *quencher* TAMRA (6-carboxi-tetrametil-rodamina) na posição 3' final. Os primers utilizados foram: CDK2 (*Assay ID* Hs00608082_m1), CDK4 (*Assay ID* Hs00262861_m1), CDK6 (*Assay ID* Hs00608037_m1), p27^{Kip1} (*Assay ID* Hs00153277_m1), ciclina D1 (*Assay ID* Hs00277039_m1), ciclina D3 (*Assay ID* Hs00426901_m1) e ciclina E (*Assay ID* Hs00233356_m1), sendo verificada a eficiência de cada *primer*. Como controle endógeno da reação foi utilizado o gene da β -actina (*Assay ID* Hs00242273_m1).

4.2.9.2.4 Quantificação relativa em PCR em tempo real

A análise do PCR em tempo real foi realizada conforme descrito no item 4.1.10.3.5, utilizando-se os *primers* correspondentes aos genes a serem avaliados.

4.2.10 Avaliação da indução de apoptose

4.2.10.1 Avaliação morfológica da presença de morte celular pela técnica de laranja de acridina/brometo de etídeo

Esta técnica permite determinar, pelas alterações morfológicas, o percentual aproximado de células em morte celular em cultura não fixada, possibilitando identificar alterações nucleares que caracterizam algumas fases da apoptose. As células foram plaqueadas e tratadas com a fração na concentração que apresentou maior efeito sobre as células tumorais, determinada pela metodologia descrita no item 4.2.7. Para tentar definir aproximadamente o tempo de incubação no qual os efeitos do tratamento sobre as células HepG2 podem ser identificados, as culturas foram incubadas em tempos intermediários aos pré-determinados nos itens anteriores. Assim, as células foram incubadas por 1, 3, 12, 18, 24, 36 horas. Um grupo controle por placa foi tratado com DMEM+10% de soro fetal bovino acrescido de 0,01% do solvente diluído nas concentrações testadas. Transcorrido cada período de incubação, as placas foram centrifugadas a 1200 rpm, por 5 minutos para sedimentação das células mortas, o meio foi removido e adicionado 25 µL de solução dos corantes fluorescentes laranja de acridina e brometo de etídeo (1 parte de 100 µg/mL de laranja de acridina em PBS; 1 parte de 100 µg/mL de brometo de etídeo em PBS). O corante laranja de acridina sob luz fluorescente cora as células vivas em verde e o brometo de etídeo as células mortas em vermelho. As placas foram analisadas em microscópio invertido (Motic AE 31) com sistema de fluorescência acoplado a sistema computadorizado de imagens (Câmera Moticam 3000 e *software Motic Images Advanced 3.2*). Além da identificação de alterações características do

processo de apoptose, as áreas das células vivas e mortas foram quantificadas e expressas em porcentagem média por área total analisada.

4.2.10.2 Avaliação da degradação do DNA – Técnica do DNA *smear*

4.2.10.2.1 Preparo das culturas

As amostras de cultura celular foram preparadas na concentração e condições estipuladas no item 4.2.10.1., sendo entretanto, analisados os tempos de 12, 24, 48, 72 e 96 horas.

4.2.10.2.2 Extração do DNA das culturas celulares

Após cada tempo de tratamento, as placas foram retiradas da estufa e colocadas em gelo. O meio de cultura foi descartado, as culturas foram lavadas com PBS e as células removidas raspando-as com um rodo apropriado para cultura (*cell scraper- Costar/Corning Incorporated, NY*). As culturas celulares (n = 6 amostras/grupo) foram separadamente colocadas em tubos *falcon* (*Corning-15mL*) e centrifugadas a 1200 rpm, 5 minutos, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuscitado em 1mL tampão de lise (NaCl 0,1 M, tris-HCl 0,05 M, EDTA 0,1 M, 0,49 mg proteinase K/mL, SDS 1%), transferido para *eppendorff*, e incubado por 2 horas, à 65°C. Após este período, as células foram centrifugadas a 13000 rpm, por 20 min, 4°C e o sobrenadante coletado. Foram adicionados etanol gelado (70%, 2 x volume do sobrenadante) e acetato de sódio (3 M, 10% do volume total). O conteúdo foi gentilmente homogeneizado até a agregação do DNA (formação semelhante à medusa), centrifugado a 6000 rpm, por 10 minutos, 4°C. O *pellet* de DNA formado foi lavado duas vezes em etanol (500 µL, 70 %, 4°C) e seco em temperatura ambiente. O DNA foi dissolvido em tampão TE (20 µL, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), por incubação a 65°C, durante 30 minutos e conservados à -20°C até análise. O DNA genômico produzido foi medido em biofotômetro a 260 nm (*Eppendorf, Hamburg, Germany*). Foi

aplicado 3 µg do DNA em cada orifício do gel de agarose, sendo a eletroforese realizada à 60V por 1,5 hora. Após este período o gel foi corado com brometo de etídeo (EtBr) e analisado sobre UV-light utilizando-se o *Image Master VDS-CL* (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK).

4.2.10.2.3 Quantificação do DNA

Uma alíquota de 5 µL do DNA obtido foi diluída (1:20) em 95 µL de TE (1 mL de Tris-HCl 1M, pH 8,0; 200 µL de EDTA 0,5 M, pH 8,0 ; H₂O MilliQ q.s.p. 100 mL) para a quantificação em biofotômetro (*Eppendorf, Hamburg, Germany*), a 260/280 nm. Amostras com razão em torno de 1,8 indicam baixa contaminação sendo consideradas de boa qualidade.

4.2.10.2.4 Avaliação da degradação do DNA – DNA smear

A análise foi realizada diluindo 10 µL do DNA com 5 µL de solução corante de azul de bromofenol (azul de bromofenol; glicerol; H₂O destilada), juntamente com um marcador de peso molecular 100 bp *DNA ladder* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% nas condições de preparo, corrida e coloração descritas no item 4.1.13.2. O gel foi analisado sob luz ultravioleta utilizando-se o programa *Image Master VDS-CL* (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK). A avaliação consistiu na identificação da presença de quebras na fita de DNA pela formação de pequenas bandas e/ou rastros de degradação.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros analisados foram submetidos ao teste de análise de variância ANOVA-*one way*, a homocedasticidade foi verificada através do teste estatístico de *Bartlett*. Os resultados indicados como não paramétricos foram submetidos ao teste de *Dunn*, e os considerados paramétricos ao teste de *Tukey-Kramer*, que comparam todos os grupos entre si. Para as comparações entre dois grupos de dados foi utilizado o teste *t-Student* para dados paramétricos e o teste *Mann Whitney* para os valores considerados não paramétricos. Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças onde $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1 – EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA RAIZ EM PÓ DE *P. PANICULATA* ADICIONADAS À RAÇÃO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE HEPATOCARCINOGÊNESE

5.1.1 Determinação do Índice de Atividade Histológica Hepático - Exame Histopatológico

O tratamento com as diferentes concentrações da raiz em pó de *P. paniculata* provocou alterações no índice de atividade histológica apenas nos grupos dos camundongos tratados com 2 e 10%. A figura 17 demonstra que os animais do grupo 10% apresentaram um aumento de neste índice em relação ao grupo 2%, apresentando diferença estatisticamente significativa. Os demais grupos não apresentaram nenhuma alteração no tecido hepático segundo os critérios aqui adotados, estabelecidos por Knodell et al. (1981) e modificados por Ishak et al. (1995).

A figura 18 representa os aspectos das alterações histológicas observadas nos camundongos do grupo 10%, como necrose em saca-bocado, infiltrado inflamatório portal e focal, e necrose.

Figura 17 – Índice de atividade histológica, segundo a classificação estabelecida por Knodell et al. (1981) e modificados por Ishak et al. (1995), do tecido hepático dos camundongos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese e tratados com as diferentes concentrações da raiz em pó de *P. paniculata* adicionada à ração (n = 10 animais/grupo). ^c diferença significativa em relação ao grupo 2% (p<0,0001)

Figura 18 - Tecido hepático de camundongo submetido ao modelo de hepatocarcinogênese e tratado com 10% da raiz de *P. paniculata* adicionada à ração por 27 semanas: A) Necrose em Saca-Bocado e infiltrado inflamatório portal; B) Necrose; C) Infiltrado inflamatório focal. HE. Barra de escala: (A-B) = 10 μm ; (C) = 20 μm

5.1.2 Avaliação da proliferação celular e indução da apoptose - Imuno-histoquímica para PCNA e contagem dos corpúsculos apoptóticos

O tratamento reduziu a proliferação celular no fígado de animais tratados com 2% da raiz de *P. paniculata*, o qual apresentou uma diminuição significativa no número de hepatócitos PCNA⁺ em relação aos demais grupos experimentais (Figura 19). Este grupo também apresentou aumento no número de corpúsculos apoptóticos por mm² de fígado quando comparado aos grupos controles (Figura 19).

Os animais do grupo 10% apresentaram uma proliferação celular estatisticamente superior ao grupo controle negativo (CT⁻), porém semelhante ao grupo positivo (CT⁺) que não recebeu o tratamento na ração. Este grupo também apresentou aumento significativo no número de corpúsculos apoptóticos comparado aos grupos controles (Figura 19). Comparando os grupos 2 e 10% em relação aos dois parâmetros, observa-se uma inversão, entre os resultados, ou seja, no grupo 2% a apoptose é maior do que a proliferação, no grupo 10% ocorre o inverso. O grupo CT⁺ apresentou número de núcleos PCNA positivos significativamente maior que os grupos CT⁻ e 2%, porém a contagem de corpúsculos apoptóticos foi inferior ao grupos tratado.

As figuras 20 e 21 mostram, respectivamente, a distribuição dos hepatócitos PCNA⁺ e corpúsculos apoptóticos no tecido hepático dos camundongos.

Figura 19 - Núcleos PCNA⁺ ou corpúsculos apoptóticos por mm² de fígado dos camundongos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese e tratados com as diferentes concentrações da raiz em pó de *P. paniculata* adicionada à ração (n = 7 animais/grupo): ^a diferença significativa em relação ao grupo CT⁻ ($p < 0,05$); ^b diferença significativa em relação ao grupo CT⁺ ($p < 0,05$); ^c diferença significativa em relação ao grupo 2% ($p < 0,05$); ^d diferença significativa em relação ao grupo 10% ($p < 0,05$)

Figura 20 - Distribuição dos núcleos PCNA⁺ no fígado dos camundongos (n = 7/grupo) submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese e tratados com as diferentes concentrações da raiz em pó de *P. paniculata* adicionada à ração: A) grupo CT⁻, B) grupo CT⁺, C) grupo 2% e D) grupo 10%. Barra de escala 20 μ m

Figura 21 - Distribuição dos corpúsculos apoptóticos no fígado dos camundongos ($n = 7/\text{grupo}$) submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese e tratados com as diferentes concentrações da raiz em pó de *P. paniculata* adicionada à ração: A) grupo CT⁻, B) grupo CT⁺, C) grupo 2% e D) grupo 10%. Barra de escala = 25 μm .

5.1.3 Avaliação da indução de apoptose e danos ao DNA - Técnica do cometa alcalino

Os grupos CT⁺ e 2% não apresentaram danos ao DNA, representados pelos 5 tipos de cometa, quando comparados aos animais normais (grupo CT⁻). O grupo 10% apresentou porcentagem inferior de cometas tipo 2 em relação aos animais dos grupos controles, em contrapartida apresentou porcentagem superior de cometas tipo 5b, considerado por Wada et al. (2003) como formados por células apoptóticas (Figura 22).

Figura 22 - Porcentagem dos cinco tipos de cometas formados pelas células do fígado dos camundongos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese e tratados com as diferentes concentrações da raiz em pó de *P. paniculata* adicionada à ração (n = 7 animais/grupo): ^a diferença significativa em relação ao grupo CT⁻ ($p < 0,05$); ^b diferença significativa em relação ao grupo 0% ($p < 0,05$)

5.1.4 Avaliação da comunicação intercelular

5.1.4.1 Método da transferência do corante fluorescente *lucifer yellow*

Nenhum dos grupos tratados com a raiz de *P. paniculata* apresentou alteração na comunicação intercelular dos hepatócitos mediada por junções do tipo *gap*. Todos os animais apresentaram difusão do corante *lucifer yellow* inferior ao grupo CT⁻ (Figura 23).

Figura 23 - Difusão do corante *lucifer yellow* no tecido hepático dos camundongos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese e tratados com as diferentes concentrações da raiz em pó de *P. paniculata* adicionada à ração (n = 8 animais/grupo): ^a diferença significativa em relação ao grupo CT⁻ ($p < 0,05$)

A figura 24 demonstra o aspecto da difusão do corante *lucifer yellow* no tecido hepático dos camundongos, evidenciando a diferença entre os grupos controles, a qual foi semelhante entre o grupo CT⁻ e os demais grupos.

Figura 24 - Aspecto da difusão do corante *lucifer yellow* no tecido hepático dos camundongos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese e tratados com as diferentes concentrações da raiz em pó de *P. paniculata* adicionada à ração (n = 8 animais/grupo): A) grupo CT e B) grupo CT⁺. Barra de escala = 25 μ m

5.1.4.2 Imunofluorescência para conexina 32

A redução na comunicação intercelular observada no tecido hepático dos camundongos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese e tratados com as diferentes concentrações da raiz em pó de *P. paniculata* não pôde ser identificada por imunofluorescência (Figura 25).

Figura 25 -Distribuição da conexina 32 no tecido hepático dos camundongos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese e tratados com as diferentes concentrações da raiz em pó de *P. paniculata* adicionada à ração (n = 5 animais/grupo): A) grupo CT⁻ e B) grupo CT⁺. Barra de escala 20 μ m.

5.1.4.3 *Western blot* e RT-PCR para conexinas 26 e 32

O tratamento também não afetou a expressão das proteínas conexina 26 e 32 analisada por *western blot* (Figura 26A e B), assim como sua expressão gênica analisada por PCR em tempo real (Figura 27).

Figura 26 - A) *Imunoblots* correspondentes as conexinas 32, 26 e β -actina. Não existe diferença significativa entre os grupos; B) Densidade das conexinas 32 e 26 em relação à β -actina, analisadas por *western blot* no fígado dos camundongos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese e tratados com as diferentes concentrações da raiz em pó de *P. paniculata* adicionada à ração (n = 5 animais/grupo)

Figura 27 - Expressão gênica das conexinas 26 e 32, analisada por PCR em tempo real no fígado dos camundongos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese e tratados com as diferentes concentrações da raiz em pó de *P. paniculata* adicionada à ração (n = 5 animais/grupo). Não existe diferença significativa entre os grupos.

5.2 EXPERIMENTO 2 – EFEITOS DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DO EXTRATO BUTANÓLICO DA RAIZ DE *P. PANICULATA* SOBRE O CRESCIMENTO DA LINHAGEM DE CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO HEPG2

5.2.1 A linhagem de carcinoma hepatocelular humano HepG2

A figura 28A mostra o aspecto geral de uma célula da linhagem HepG2 de hepatocarcinoma humano e a figura 28B demonstra a formação de ilhas de crescimento celular, sendo esta uma característica importante da linhagem. Na figura 28A a cultura de células tem apenas 2 dias de cultivo e já apresenta a formação de ilhas e a figura 28B apresenta a máxima confluência observada, com 6 dias de cultura.

Figura 28 - Cultura de células da linhagem HepG2 de hepatocarcinoma humano mostrando o aspecto geral de uma célula e a característica de crescimento em ilhas: **A)** cultura celular com 2 dias de cultivo mostrando o aspecto geral de uma célula e a formação inicial de ilhas (seta). Barra de escala = 10 μ m; e **B)** máxima confluência observada com 6 dias de cultivo, as ilhas já apresentam verdadeiros cordões com várias camadas. Barra de escala = 20 μ m

5.2.2 Curva de crescimento da HepG2

A figura 29 representa a curva de crescimento da linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2. Todas as concentrações de células avaliadas apresentaram crescimento

progressivo durante os tempos de incubação analisados, permitindo a livre escolha dentro da exigência de cada metodologia adotada.

Figura 29 – Curva de crescimento da linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2 durante a incubação apenas com meio de cultura DMEM, nos períodos de 24, 48 e 72hs

5.2.3 Determinação do solvente das frações

A figura 30 apresenta o desenvolvimento da cultura celular HepG2 após o tratamento com a fração 100%, obtida a partir do extrato butanólico das raízes de *P. paniculata* e previamente dissolvida com o solvente DMSO ou Tween-20, diluída na concentração de $100\mu\text{g}/\text{mL}$. Todos os tratamentos demonstraram diferenças significativas em relação aos respectivos grupos controle, apresentando efeito inibidor no desenvolvimento das células tumorais HepG2. As frações dissolvidas com DMSO ou Tween-20 apresentaram diferenças entre si, entretanto, a fração dissolvida com Tween-20 apresentou maior eficiência sobre o controle do desenvolvimento da cultura destas células tumorais em todos os tempos de incubação. As culturas tratadas apenas com os solventes não apresentaram diferenças significativas.

Figura 30 – Teste com a fração mais concentrada (100%), obtida a partir do extrato butanólico das raízes de *Pfaffia paniculata*, para determinação do melhor solvente a ser utilizado: ^a diferença significativa em relação ao grupo CT-DMSO ($p<0,001$); ^b diferença significativa em relação ao grupo CT-Tween-20 ($p<0,001$), ^c diferença significativa em relação ao grupo 100%-DMSO ($p<0,001$) e ^d diferença significativa em relação ao grupo 100%-Tween-20 ($p<0,001$)

5.2.4 Tratamento com as frações - determinação das frações e das concentrações a serem testadas

As figuras 31 a 36 demonstram os efeitos do tratamento com as concentrações 1 ng, 10 ng, 100 ng, 1 µg, 10 µg e 100 µg/mL das frações 60, 80 e 100% do extrato butanólico de *P. paniculata* sobre o desenvolvimento da cultura de células HepG2. As frações 0%, 20% e 40% não apresentaram efeitos sobre a viabilidade celular das culturas nas concentrações definidas acima (dados não mostrados).

As culturas tratadas com a concentração de 1 ng/mL da fração 60% apresentaram redução no crescimento celular apenas após 96 hs de tratamento em relação ao grupo controle. As tratadas com as frações 80% e 100% mostraram diferenças no crescimento a partir de 48 e 72 hs de incubação, respectivamente. Embora as diferenças em relação ao grupo controle e em relação aos demais grupos tenham se mostrado estatisticamente significativas, as reduções não foram expressivas (Figura 31).

Figura 31 – Efeito do tratamento com 1 ng/mL das frações 60, 80 e 100% obtidas a partir do extrato butanólico das raízes de *Pfaffia paniculata* sobre o desenvolvimento da cultura de células de hepatocarcinoma humano HepG2: ^a diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); ^b diferença significativa em relação ao grupo 60% ($p < 0,05$), ^c diferença significativa em relação ao grupo 80% ($p < 0,05$) e ^d diferença significativa em relação ao grupo 100% ($p < 0,05$)

A fração 60% diluída na concentração de 10 ng/mL apresentou comportamento semelhante em relação à concentração 1ng, reduzindo o crescimento das culturas apenas após 96 hs. A fração 80% antecipou os efeitos sobre o crescimento das culturas celulares, afetando-as a partir de 24 até 48 hs de incubação, porém seu efeito cessou após 48 hs. A fração 100% apresentou ação sobre as células apenas após 96hs de incubação (Figura 32).

Figura 32 - Efeito do tratamento com 10 ng/mL das frações 60, 80 e 100% obtidas a partir do extrato butanólico das raízes de *Pfaffia paniculata* sobre o desenvolvimento da cultura de células de hepatocarcinoma humano HepG2: ^a diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); ^b diferença significativa em relação ao grupo 60% ($p < 0,05$), ^c diferença significativa em relação ao grupo 80% ($p < 0,05$) e ^d diferença significativa em relação ao grupo 100% ($p < 0,05$)

A figura 33 mostra que a fração 80% diluída na concentração de 100 ng/mL reduziu o desenvolvimento das culturas celulares durante todo o período experimental, entretanto as diferenças se mostraram significativas em relação ao controle apenas até 72 hs após o início do tratamento. As demais frações não apresentaram efeitos significativos.

Figura 33 - Efeito do tratamento com 100 ng/mL das frações 60, 80 e 100% obtidas a partir do extrato butanólico das raízes de *Pfaffia paniculata* sobre o desenvolvimento da cultura de células de hepatocarcinoma humano HepG2: ^a diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); ^b diferença significativa em relação ao grupo 60% ($p < 0,05$), ^c diferença significativa em relação ao grupo 80% ($p < 0,05$) e ^d diferença significativa em relação ao grupo 100% ($p < 0,05$)

O aumento da concentração para 1 $\mu\text{g/mL}$ praticamente não apresentou efeitos sobre o desenvolvimento das culturas celulares. Foram observados efeitos nas frações 60% e 80% respectivamente, 96 e 48 hs após o início do tratamento. Entretanto, o desenvolvimento celular após o tratamento com a fração 80% retomou a normalidade. A fração 100% não mostrou nenhuma ação sobre as culturas celulares (Figura 34).

Figura 34 - Efeito do tratamento com 1 $\mu\text{g/mL}$ das frações 60, 80 e 100% obtidas a partir do extrato butanólico das raízes de *Pfaffia paniculata* sobre o desenvolvimento da cultura de células de hepatocarcinoma humano HepG2: ^a diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,01$); ^b diferença significativa em relação ao grupo 60% ($p < 0,01$), ^c diferença significativa em relação ao grupo 80% ($p < 0,01$) e ^d diferença significativa em relação ao grupo 100% ($p < 0,01$)

A figura 35 demonstra que todas as frações diluídas na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram efeitos sobre o crescimento celular em mais de um período de tratamento. As frações 60 e 10% mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle após 72 hs de incubação, por outro lado, a fração 100% iniciou os efeitos sobre a redução no crescimento celular a partir de 48 hs. A fração 80%, que na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, indicou estar perdendo a eficiência sobre o controle do crescimento celular, voltou a inibir o desenvolvimento das culturas, apresentando diferença significativa em relação ao grupo controle a partir de 24h de incubação até 96hs, com exceção do período de 72 hs.

Figura 35 - Efeito do tratamento com 10 µg/mL das frações 60, 80 e 100% obtidas a partir do extrato butanólico das raízes de *Pfaffia paniculata* sobre o desenvolvimento da cultura de células de hepatocarcinoma humano HepG2: ^a diferença significativa em relação ao grupo controle ($p<0,05$); ^b diferença significativa em relação ao grupo 60% ($p<0,05$), ^c diferença significativa em relação ao grupo 80% ($p<0,05$) e ^d diferença significativa em relação ao grupo 100% ($p<0,05$)

As frações 60 e 80% diluídas na concentração de 100 µg/mL demonstraram resultados semelhantes aos apresentados nas demais concentrações. A fração 60% apresentou redução significativa no crescimento celular em relação ao controle apenas 96 hs após o início do tratamento. A fração 80% reduziu significativamente o desenvolvimento das culturas após 48 hs de incubação, mantendo este resultado até o final do período experimental. A fração 100%, a qual não apresentou efeitos expressivos nas demais concentrações, demonstrou intensa e praticamente contínua ação inibitória sobre as células tumorais, apresentando diferença significativa em relação a todos os grupos experimentais (Figura 36).

Figura 36 - Efeito do tratamento com 100 µg/mL das frações 60, 80 e 100% obtidas a partir do extrato butanólico das raízes de *Pfaffia paniculata* sobre o desenvolvimento da cultura de células de hepatocarcinoma humano HepG2: ^a diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$); ^b diferença significativa em relação ao grupo 60% ($p < 0,001$), ^c diferença significativa em relação ao grupo 80% ($p < 0,001$) e ^d diferença significativa em relação ao grupo 100% ($p < 0,001$)

5.2.4.1 Análise em cromatografia de camada delgada

Foi analisada a fração 100%, a qual apresentou maior redução da viabilidade celular em relação as demais frações. Após revelação com solução de ácido sulfúrico 10% apresentou duas manchas principais com coloração rosa passando para cinza, com R_f de 0,28 e 0,35. Estas manchas são possivelmente indicativas da presença de saponinas. O isolamento e a identificação destas substâncias encontram-se ainda em desenvolvimento no Laboratório do Instituto Biológico.

5.2.5 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

5.2.5.1 Análise por citometria de fluxo

A figura 37 apresenta a porcentagem das células tumorais HepG2 nas fases G1 e G2 do ciclo celular após o tratamento com 100 µg/mL da fração 100%. Os dados demonstram que o tratamento reduziu significativamente a porcentagem de células na fase G2 em relação ao grupo controle (CT), no período de 24 até 48 hs.

Figura 37 - Porcentagem das células tumorais HepG2 nas fases G1 e G2 do ciclo celular após o tratamento com 100 µg/mL da fração 100% obtida a partir do extrato butanólico das raízes de *Pfaffia paniculata*: * diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

5.2.6 Avaliação da expressão gênica das proteínas p27, ciclinas D1, D3, e E, CDK2, CDK4 e CDK6 por PCR em tempo real

A figura 38 apresenta os efeitos do tratamento com 100 µg/mL da fração 100%, obtida a partir do extrato butanólico das raízes de *P. paniculata*, sobre a expressão gênica das proteínas envolvidas no ciclo celular das células da linhagem tumoral HepG2. No período de 12 hs após o tratamento, os efeitos foram antagônicos nos genes CDK6 e ciclina E em relação ao grupo controle. Estes genes apresentaram, respectivamente, redução e aumento significativo da expressão, sendo que os demais não foram afetados pelo tratamento. Nas 12 hs seguintes, estes mesmos genes apresentaram uma expressão inversa em relação ao período anterior. O gene da ciclina E apresentou uma drástica redução, assumindo valores próximos do grupo controle. Em contrapartida, o gene CDK6 aumentou sua expressão em relação ao tempo de 12 hs e ao grupo controle. Ainda neste mesmo período, a expressão do gene ciclina D1 mostrou-se aumentada em relação ao intervalo anterior. Pela primeira vez, após 36 hs de cultivo celular, os genes CDK4, ciclina D3 e p27 mostraram alguma reação ao tratamento, apresentando aumento na expressão em relação ao período anterior. Destes, apenas os genes da ciclina D3 e p27 apresentaram diferença significativa em relação ao controle. A expressão gênica da ciclina D1 e CDK6 reduziu-se após 36 hs de tratamento, entretanto, o gene da ciclina E apresentou um aumento significativo em relação ao período anterior. De modo geral, o comportamento dos genes envolvidos no ciclo celular das células tumorais tratadas com o extrato de *P. paniculata* apresentaram intervalos cíclicos de redução e aumento na expressão gênica a cada intervalo de 12 hs. Assim, a figura 38 demonstra que a cada período de aumento na expressão gênica foi acompanhado de um período de redução, e vice-versa.

Figura 38 - Expressão gênica das proteínas p27, ciclinas D1, D3, e E, CDK2, CDK4 e CDK6, analisada por PCR em tempo real, da linhagem de células tumorais HepG2 tratadas com 100 µg/mL da fração 100% obtida a partir do extrato butanólico das raízes de *P. paniculata*: * diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), ^a diferença significativa em relação ao tempo de 12 hs ($p < 0,05$), ^b diferença significativa em relação ao tempo de 24 hs ($p < 0,05$); ^c diferença significativa em relação ao tempo de 36 hs ($p < 0,05$). (n = 5 amostras/tempo de incubação)

5.2.7 Avaliação da indução de apoptose pela presença de morte celular e degradação do DNA

5.2.7.1 Avaliação morfológica da presença de morte celular pela técnica de laranja de acridina/brometo de etídeo

A característica de crescimento da HepG2, formação de ilhas de células com várias camadas sobrepostas, impossibilitou a identificação visual das alterações morfológicas características de células apoptóticas. Entretanto, a coloração com laranja de acridina/brometo de etídeo possibilitou a identificação de células vivas e mortas e a quantificação da área correspondente.

A figura 39 demonstra que as culturas tratadas com 100 $\mu\text{g/mL}$ da fração 100%, obtida do extrato butanólico das raízes de *Pfaffia paniculata*, apresentaram redução significativa na área relativa média de células vivas em relação ao controle (CT), a partir de 12 hs de incubação. O tratamento praticamente não afetou a área de células mortas, a qual apresentou aumento significativo em relação ao grupo controle (CT) apenas no período de 12 hs.

Figura 39 – Área relativa média de células vivas e mortas presentes nas culturas do grupo CT (controle) e do grupo tratado com 100 $\mu\text{g/mL}$ da fração 100%, obtida do extrato butanólico das raízes de *Pfaffia paniculata*, coradas com os corantes fluorescentes laranja de acridina e brometo de etídeo: * diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

O aspecto geral das áreas demonstradas na figura 40 pode ser observado nas figuras 33A e B. Observa-se, respectivamente, que não houve nenhuma diferença entre os grupos nos períodos de 1 e 3hs e que ocorreu redução na área de células vivas dos demais períodos experimentais (Figura 41).

Figura 40 – Aspecto geral das culturas da linhagem HepG2 tratadas com 100 $\mu\text{g/mL}$ da fração 100% obtida do extrato butanólico das raízes de *Pfaffia paniculata* e do grupo controle. A coloração com os corantes fluorescentes laranja de acridina e brometo de etídeo evidenciaram, respectivamente, as células vivas (verde) e as mortas (vermelho): A) grupo controle 1 h; B) grupo tratado com a fração 100% 1 h; C) grupo controle 3 hs e D) grupo tratado com a fração 100% 3 hs (Barra de escala = 20 μm)

Figura 41 – Culturas da linhagem HepG2 controle e tratadas com 100 µg/mL da fração 100%, e coradas com os corantes fluorescentes laranja de acridina e brometo de etídeo. Nota-se a formação de ilhas de crescimento característica desta linhagem (verde) e a distribuição das células mortas (vermelho): A, C, E e G) grupos controle; B, D, F e G) grupos tratados com a fração 100% incubados por 12, 18, 24 e 36 hs, respectivamente; (Barra de escala = 20µm)

5.2.7.2 Avaliação da degradação do DNA pela técnica do DNA *smear*

O tratamento com 100 µg/mL da fração 100%, obtida do extrato butanólico das raízes de *Pfaffia paniculata* não provocou degradação no DNA das culturas da linhagem de células tumorais HepG2, conforme demonstra a figura 42. A figura apresenta amostras de culturas controle (2 e 3) e tratadas por 96hs (4 e 5) e o marcador de peso molecular (1). Os dados dos demais períodos não foram mostrados por não apresentarem nenhum indício de quebra no DNA.

Figura 42 – Imagem obtida com a eletroforese em gel de agarose das amostras das culturas de células da linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2, tratadas com 100 µg/mL da fração 100% obtida do extrato butanólico das raízes de *Pfaffia paniculata*: 1, marcador de peso molecular; 2 e 3, grupo controle e 4 e 5 grupo 100%

6 DISCUSSÃO

As propriedades quimiopreventivas e terapêuticas de *Pfaffia paniculata* foram avaliadas em dois diferentes modelos experimentais, visando a compreensão dos principais mecanismos de ação envolvidos em sua atividade antiproliferativa e antineoplásica. Para isso, foram avaliados camundongos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese e tratados com a raiz de *P. p. paniculata* adicionada à ração. Em seguida, células da linhagem tumoral de hepatocarcinoma humano HepG2 foram tratadas com frações do extrato butanólico obtido também a partir dessas raízes.

O estudo *in vivo* representou uma complementação ao trabalho realizado por Da Silva et al. (2005), onde foi demonstrado que o tratamento com a raiz em pó de *P. paniculata* adicionada à ração reduziu a incidência, o número e a área das lesões preneoplásicas em camundongos submetidos a modelo de hepatocarcinogênese. Estes resultados iniciais indicaram efeitos deste tratamento sobre a fase de iniciação da carcinogênese (Da Silva et al., 2005). A partir destes primeiros resultados, tornou-se crucial compreender qual ou quais mecanismos foram influenciados pelo tratamento crônico com as raízes de *P. paniculata* para entender sua ação quimiopreventiva. Assim, foi utilizado o material biológico colhido no experimento anterior para avaliar alguns mecanismos alvos da quimioprevenção, como a proliferação celular, apoptose e comunicação intercelular mediada por junções do tipo *gap*. Adicionalmente, foi avaliada a presença de possíveis alterações histopatológicas decorrentes do tratamento crônico, determinando o índice de atividade histológica no tecido hepático.

A determinação deste índice procurou mensurar, semi quantitativamente, a presença de infiltrado inflamatório e outros aspectos histopatológicos no fígado dos camundongos tratados com a raiz adicionada à ração. Esta análise identificou que os animais do grupo 10% apresentaram grande quantidade de infiltrado inflamatório mononuclear difuso no parênquima hepático, caracterizando um processo de injúria tóxica. Estes resultados indicam que o tratamento dos camundongos com 10% da raiz adicionada à ração, durante 27 semanas, provocou um quadro de toxicidade hepática crônica. Em resposta à esta injúria, o fígado desencadeou uma resposta regenerativa caracterizada pela proliferação das células hepáticas na tentativa de recuperar o tecido lesado. De fato, os camundongos deste grupo apresentaram maior número de hepatócitos PCNA positivos, indicando uma maior atividade regenerativa quando comparado ao grupo de animais que recebeu 2% da raiz adicionada à ração. Aliando os resultados obtidos com o índice de atividade histológica e de proliferação celular, pode-se

considerar que o tratamento crônico com 10% da raiz em pó de *P. paniculata* apresentou elevado grau de toxicidade hepáticas nestes animais.

A análise da indução de apoptose pela contagem dos corpúsculos apoptóticos demonstrou-se superior nos animais do grupo 10%. Porém, quando os parâmetros de apoptose e proliferação celular foram comparados entre si dentro de cada grupo, observou-se comportamentos opostos. O grupo 2% mostrou menor proliferação em relação à apoptose e o grupo 10% maior apoptose em relação à proliferação. No entanto, os dois grupos apresentaram efeitos quimiopreventivos equivalentes nas lesões preneoplásicas hepáticas (Da Silva et al., 2005). Tanto a indução de apoptose quanto o controle da proliferação celular são importantes mecanismos antineoplásicos identificados em agentes quimiopreventivos (DE FLORA; FERGUSON, 2005). O fato de estarem presentes nos dois grupos tratados, porém em intensidades diferentes, pode indicar que estes mecanismos foram influenciados pelo tratamento com a raiz em pó de *P. paniculata*, compreendendo parte da resposta quimiopreventiva desencadeada. Outro fato que reforça esta hipótese é o grupo CT+, o qual não foi tratado com a raiz, ter apresentado proliferação celular muito elevada em relação ao grupo 2%, fortalecendo a idéia do tratamento com 2% da raiz de *P. paniculata* ter controlado a proliferação celular.

Estes resultados podem ser explicados pelas saponinas triterpenóides presentes nas raízes de *P. paniculata* e estão de acordo com estudos que demonstram que a indução de apoptose (WAKABAYASHI et al., 1998; HARIDAS, 2001; MUJOO, 2001; WANG et al., 2001; LI et al., 2005; LEMESHKO et al., 2006; TIAN et al., 2006) e controle da proliferação celular (TAKEMOTO et al., 1982; NAKAI et al., 1984; NISHIMOTO et al., 1984; KORATKAR et al., 1997; WATANABE et al., 2000; MUJOO, 2001; LIN et al., 2003; EINBOND et al., 2006) são alguns dos mecanismos de ação antitumoral das saponinas.

A proteção contra danos ao DNA é uma importante propriedade quimiopreventiva evitando a iniciação da célula. A técnica do cometa alcalino possibilita identificar a presença de quebras em fitas simples do DNA e é usada para verificar a propriedade quimiopreventiva de proteger o DNA contra danos provocados, por exemplo, por radicais livres. Wada et al. (2003) considera possível utilizar esta técnica para identificar a presença de apoptose, indicando inclusive qual tipo de cometa seria considerado típico de células apoptóticas (ver item 4.1.9). Os autores que utilizam esta técnica geralmente quantificam 100 cometas por amostra (HARTMANN et al., 2003; DE MOURA ESPÍNDOLA et al., 2005), entretanto, neste trabalho foram quantificados 500 para aumentar a confiabilidade e consistência dos dados gerados. Os resultados obtidos pelo ensaio do cometa mostram que o grupo 10%

apresentou uma porcentagem maior de cometa tipo 5b que, curiosamente, é considerado por Wada et al (2003) como originado por células apoptóticas. Apesar de não ser usual identificar apoptose por este método, não se pode deixar de observar que, coincidentemente ou não, este mesmo grupo apresentou elevado número de corpúsculos apoptóticos fagocitados. Independentemente, estes resultados indicam que a indução de apoptose pode ser um dos mecanismos quimiopreventivos dos princípios ativos presentes nas raízes de *P. paniculata*.

Apesar de não avaliarmos os mecanismos moleculares responsáveis pelos resultados obtidos, estudos demonstraram que as saponinas provenientes de diferentes fontes apresentam propriedades antitumorais semelhantes às de *P. paniculata*, o que explicaria nossos resultados. Estudos mostraram que a indução de apoptose pelas saponinas presentes nas raízes de *Panax ginseng* induziriam apoptose pela fragmentação do DNA (POPOVICH; KITTS, 2002) ou pela ativação de caspases via Bcl2 (PARK ET AL., 1997).

Lemeshko et al. (2006) mostraram que as saponinas de *Acacia victoriae* induzem apoptose por aumentar a sensibilidade ao estresse oxidativo. Aliado a isto, *A. victoriae* aumenta a permeabilidade da membrana da mitocôndria liberando o citocromo c, ativando a cascata apoptótica. O aumento da permeabilidade provocado por esta planta seria decorrente da interação entre as saponinas analisadas e as membranas celulares, formando canais dependentes de colesterol (Li et al., 2005). O controle da proliferação celular em células tumorais pelas saponinas ocorre pela inibição de proteínas responsáveis pela divisão celular como as CDKs (WAKABAYASHI et al., 1998; KIM et al., 1999; LIU; XU; CHE, 2000; MUJOO et al., 2001; TATSUKA; MAEDA; OTA, 2001; JEONG et al., 2007; WANG et al., 2007). Liu et al. (2000) observaram que as saponinas de *Panax ginseng* reduzem a proliferação celular pela ativação da expressão de p21 e p27, genes inibidores da ciclinas quinases. Em contrapartida, estudos moleculares são extremamente interessantes para avaliar a influência dos princípios ativos presentes nas raízes de *P. paniculata* na proliferação e/ou apoptose das células tumorais.

O restabelecimento da comunicação intercelular pelas junções do tipo *gap* é considerado um alvo dos agentes quimiopreventivos por esta se encontrar inibida em processos proliferativos. A inibição ocorre, muitas vezes, pela redução na expressão dos genes que codificam as conexinas, as quais são responsáveis pela formação do canal. Desta forma, foi aplicada a capacidade do corante *lúcifer yellow* em se difundir pelas junções *gap* como um indicativo da funcionalidade destes canais comunicantes.

A técnica de imunofluorescência para a conexina 32 e 26 foi utilizada para identificar sua localização celular. A localização das conexinas na membrana indica que o canal está

presente na células, e se estes dados forem aliados a resultados positivos obtidos na transferência do corante *lúcifer yellow*, pode-se assegurar que este canal também está funcional. Entretanto, a localização apenas no citoplasma pressupõe que a conexina está sendo transcrita, mas não está formando canal e desenvolvendo suas funções. Portanto, estes métodos são complementares quando se deseja obter informações mais completas sobre a existência e funcionalidade dos canais.

O *western blot* e o PCR em tempo real, à semelhança dos dois métodos comentados acima, são duas técnicas complementares. O *western blot* indica se há comprometimento na concentração da proteína de interesse e o PCR em tempo real identifica alterações em sua expressão gênica. Os dois métodos correlacionam-se pelo fato de uma hiper expressão não corresponder necessariamente a uma alta concentração de proteínas, pois esta pode ser degradada no citoplasma. Conseqüentemente, a alta concentração de proteína não indica hiper expressão gênica, pois esta pode estar sendo indevidamente armazenada no citoplasma, ou ainda não degradada no citoplasma. Neste caso, a imunofluorescência pode eliminar a dúvida por fornecer a localização das proteínas nas células.

Os estudos relacionados aos efeitos das saponinas sobre a comunicação intercelular pelas junções do tipo *gap* são limitados à planta *Panax ginseng*, o que pode indicar ser uma característica particular dos princípios ativos desta planta. Kang et al. (2000) mostraram, *in vitro*, que a administração de diferentes frações saponínicas de *P. ginseng* protegeram as células da inibição da comunicação intercelular por TPA ou H₂O₂. E de acordo com Zang et al. (2001), vários mecanismos moleculares estariam envolvidos nestes efeitos. Estes estudos tornaram interessante verificar se esta propriedade também poderia ser identificada nas raízes de *Pfaffia paniculata*. Entretanto, todos os animais avaliados não apresentaram alterações significantes na comunicação celular, avaliada por métodos funcionais e moleculares. Dessa maneira, sugere-se que os princípios ativos presentes na raiz pulverizada de *P. paniculata* não exercem modulação nas junções do tipo *gap* e, conseqüentemente, este mecanismo não está envolvido em seu potencial quimiopreventivo.

No estudo *in vitro* foram testadas várias frações do extrato butanólico obtido a partir das raízes de *Pfaffia paniculata* na linhagem de células de hepatocarcinoma humano HepG2 e analisados os efeitos sobre a viabilidade celular, ciclo celular e indução de apoptose.

A linhagem tumoral HepG2 foi escolhida para este estudo por apresentar metabolização de drogas semelhante ao fígado humano normal (KNASMÜLLER et al., 1998) e assim, não compromete a metabolização normal das frações do extrato butanólico. Outro fator determinante foi que esta linhagem expressa os genes envolvidos no controle do ciclo

(VARGHESE et al, 2005) celular, o que elimina a possibilidade de avaliar genes que poderiam estar inativos por mutação ou totalmente inexistentes. A concentração de $1 \times 10^6/\text{mL}$ foi identificada como a melhor a ser utilizada nos testes com as frações por apresentar um crescimento progressivo em relação às demais concentrações testadas e submetidas à análise em leitor de ELISA. Esta escolha foi fundamentada na análise dos histogramas, uma vez que deixaram claro que as maiores concentrações apresentavam redução no crescimento, provavelmente pela competição por nutrientes. A menor concentração de células foi totalmente descartada pois esta poderia reduzir ainda mais o crescimento celular sob efeito do tratamento, o que dificultaria a análise pelo leitor de ELISA. Assim, a eliminação destes fatores fortaleceu a consistência dos resultados obtidos, garantindo que os mesmos fossem decorrentes do tratamento administrado.

Foi utilizado o DMSO, um solvente largamente empregado em cultura de células, nos primeiros testes com as frações. Entretanto, as frações 60, 80 e 100% apresentaram insolubilidade neste solvente, o que tornaria inviável o tratamento das culturas por impedir que os compostos ativos presentes nas frações penetrassem nas células. Assim, foi necessário avaliar a ação de um surfactante ou detergente em relação à solubilidade das frações e viabilidade celular. O tween-20 foi testado juntamente com o DMSO, mostrando eficiência em solubilizar as frações e nenhum comprometimento da viabilidade celular. Isto foi comprovado com os resultados obtidos nos testes iniciais, onde as culturas tratadas apenas com tween-20 não apresentaram alterações significativas de crescimento, e conjuntamente, as culturas tratadas com a fração 100%-Tween-20 mostraram menor crescimento em relação às tratadas com a fração 100%-DMSO. Desta forma, a determinação do solvente a ser utilizado, o que inicialmente pareceu ser um elemento secundário frente à metodologia proposta para o estudo, foi determinante para os resultados obtidos.

A definição da melhor fração a ser adotada neste experimento considerou o perfil de redução da viabilidade e/ou concentração celular, observando não apenas se houve redução, mas também se esse efeito foi constante ou apresentou atenuação durante o período de incubação. Os efeitos sobre a viabilidade das culturas tratadas foram determinados utilizando o corante cristal violeta, que tem a propriedade de penetrar em células vivas, sendo possível assim, determinar a viabilidade celular pela absorbância em leitor de ELISA. A fração 80% apresentou redução em praticamente todas as concentrações testadas, entretanto, esta redução foi expressiva nas primeiras 48 horas de tratamento. Depois deste período, a concentração celular aumentou bruscamente, indicando forte atenuação dos efeitos sobre a viabilidade celular. A possibilidade de aumentar a concentração desta fração foi descartada com os

resultados obtidos com 100 µg/mL da fração 100%, pois esta apresentou redução quase constante da viabilidade celular. Estes resultados inicialmente indicaram que os efeitos antiproliferativos de *Pfaffia paniculata*, observados em camundongos, também poderiam ser identificados em cultura de células da linhagem tumoral de hepatocarcinoma humano. Ainda, os resultados indicaram que nesta fração, provavelmente, estariam os princípios ativos que promoveriam os efeitos mais expressivos sobre os parâmetros analisados.

Os dados obtidos com a análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo forneceram as primeiras respostas sobre a redução na viabilidade celular observada. Os períodos de incubação foram escolhidos para tentar definir o início dos efeitos do tratamento. Os resultados indicaram que os efeitos do tratamento sobre o ciclo celular iniciaram 24 hs após o tratamento, perdurando durante o restante do tempo de incubação. A progressão do ciclo celular foi inibida entre as fases G1 e G2, o que foi indicado pela significativa redução na porcentagem de células em G2. Estes dados evidenciaram que as células da linhagem tumoral HepG2 apresentaram menor viabilidade e/ou concentração celular devido a inibição do ciclo celular promovida pelo tratamento com 100 µg/mL da fração 100%. Esta inibição no ciclo impediu que as células se dividissem, reduzindo a sua concentração, a qual foi identificada no leitor de ELISA. Os resultados comprovaram a ação antiproliferativa de *Pfaffia paniculata* sobre células tumorais humanas, tornando imprescindível identificar o mecanismo desta ação.

A técnica de PCR em tempo real foi utilizada para identificar se o tratamento afetou a expressão dos genes relacionados ao ciclo celular, sendo que os genes selecionados foram os que codificam a expressão de proteínas responsáveis pela progressão do ciclo celular. Ainda, a escolha destes genes respeitou a fase do ciclo a ser analisada. Em células normais, na fase G1 observa-se aumento na expressão dos genes das CDKs 4 e 6 e de suas ativadoras: ciclinas D1 e D3 (TESSEMA; LEHMANN; KREIPE, 2004); e para a célula progredir pela fase S, ocorre o aumento da CDK2 e ciclina E (JOHNSON et al., 2002). É necessário comentar que o ideal é comparar os resultados da expressão gênica fornecidos pelo PCR em tempo real com os dados de quantificação de proteínas fornecido pelo western. Esta comparação esclarece que o aumento ou redução na expressão de um gene, foi suficiente para alterar a expressão das proteínas. Neste estudo, muitas técnicas ainda estão em andamento, desta forma, ainda não foi possível obter informações a partir da técnica *western blot*. Entretanto, como será discutido a seguir, as alterações na expressão gênica foram refletidas no ciclo celular, o que foi identificado na citometria de fluxo. Assim, a comparação entre os dados da citometria e do

PCR indicam que as alterações na expressão gênica, foram suficientes para afetar as proteínas e o ciclo celular.

No período de 12 hs, após o início da incubação com a fração, o tratamento reduziu a expressão da CDK6 e por outro lado aumentou a expressão da ciclina E. Estes dados são consistentes com os obtidos com a citometria de fluxo. A redução de CDK6 observada provavelmente não foi suficiente para impedir a progressão do ciclo pela fase G1, e o aumento da expressão da ciclina E garantiu a progressão pela fase S. De fato, os resultados obtidos com a citometria demonstraram que o tratamento não afetou a porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo. No período de 24 hs após o início da incubação com a fração, observou-se um aumento na expressão das CDK4 e 6 e das ciclina D1, indicando que o tratamento não impediu a progressão das células pela fase G1. Entretanto, foi observada redução na expressão da ciclina E, o que impediu que as células que entraram em G1, evoluíssem para a fase S do ciclo. Estes resultados confirmam o observado na citometria de fluxo, a qual indicou que após 24 hs as culturas começaram a apresentar efeitos inibitórios de *Pfaffia paniculata* sobre a progressão do ciclo celular. Finalmente, 36 hs após o início do tratamento, observou-se aumento na expressão da ciclina D3 e CDK4 e redução da expressão da ciclina D1 e CDK6. Estes eventos, juntamente com o aumento na expressão do inibidor de CDKs (p27), contribuíram para a parada no ciclo observada pela citometria de fluxo. O aumento da ciclina E, o qual também foi observado neste período, foi depletado pelo inibidor p27 que inativa os complexos formados pela ciclina E-CDK2 (MALUMBRES; BARBACID, 2001).

Os resultados indicaram que o tratamento reduziu a viabilidade/concentração celular e inibiu a progressão do ciclo celular em G1 por alterar a expressão de proteínas importantes para a evolução do ciclo. Isto pode ser devido à presença de saponinas triterpenóides na fração 100%. De fato, os dados obtidos com a análise cromatográfica indicaram a presença de um dos pfafosídeos. Entretanto, esta análise não é suficientemente sensível para determinar se há a presença de outros compostos que poderiam também interferir na progressão do ciclo celular das culturas da linhagem HepG2. Por outro lado, estudos com saponinas triterpenóides de outras plantas mostraram a propriedade de inibir a progressão do ciclo, como comentado anteriormente.

Uma outra propriedade antiproliferativa observada nas saponinas é a indução de apoptose. A proteína inibidora de CDKs, p27, é estimulada durante o *checkpoint* G1/S quando não há estímulos mitogênicos adequados, parando o ciclo celular, o que geralmente acarreta na morte celular por apoptose (MALUMBRES; BARBACID, 2001). Os resultados do PCR e

em tempo real indicaram que o tratamento aumentou a expressão gênica de p27. Desta forma, as técnicas de coloração por laranja de acridina e brometo de etídio e de análise de indução da apoptose pela degradação de DNA (técnica de DNA *smear*) foram utilizadas na tentativa de verificar se a partir da inibição do via p27, as células entraram em processo apoptótico.

A coloração por laranja de acridina e brometo de etídio possibilita identificar em verde (laranja de acridina) as células vivas e em vermelho (brometo de etídeo) as mortas, podendo ainda identificar a presença de figuras de apoptose. Entretanto, a propriedade de crescimento formando ilhas da linhagem HepG2 inviabilizou a visualização e/ou quantificação destas figuras. Assim, optou-se pela simples quantificação das áreas correspondentes às células vivas e mortas. A quantificação indicou que, apesar da área ocupada pelas células vivas diminuir ao longo do período de incubação, a correspondente às mortas não se alteravam. Não se pode deixar de considerar que este resultado corresponde apenas à área das células aderidas na placa de cultura, desconsiderando a disposição tridimensional das mesmas. Entretanto, as figuras correspondentes a cada período de incubação mostram que as diferenças são reais. Por outro lado, uma adequação desta técnica, como dissolver as formações tridimensionais das células e só assim corá-las, poderia elucidar os reais efeitos sobre a indução de morte celular.

A técnica de DNA *smear* possibilita visualizar a fragmentação de DNA característica das células apoptóticas. Os resultados obtidos mostraram inexistência de danos ao DNA que comprovassem a indução de apoptose pelo tratamento administrado, e desta forma, confirmam o observado com a coloração por laranja de acridina e brometo de etídio. Ainda deve-se considerar que as células das culturas analisadas poderiam se encontrar em estágios iniciais da apoptose, onde as figuras apoptóticas e a fragmentação do DNA, que são característica dos estágios finais, ainda não são perceptíveis. Assim, a utilização de outras técnicas como imuno-histoquímica ou *western blot* direcionados para proteínas envolvidas em estágios iniciais da apoptose, como as caspases ou família pró-apoptótica Bcl2, poderiam ajudar a entender o que aconteceu com as células que tiveram o ciclo inibido pelo tratamento.

7 CONCLUSÃO

7.1 EXPERIMENTO 1 – EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA RAIZ EM PÓ DE *P. PANICULATA* ADICIONADAS À RAÇÃO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE HEPATOCARCINOGENÊSE

- O tratamento com 10% da raiz em pó de *Pfaffia paniculata* adicionada à ração de camundongos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese ocasionou um quadro de hepatotoxicidade crônica moderada;
- O uso da raiz em pó de *Pfaffia paniculata* em camundongos submetidos a modelo de hepatocarcinogênese apresentou dois mecanismos de ação quimiopreventiva: controle da proliferação celular e indução de apoptose;
- O controle da proliferação celular observado não foi decorrente do aumento da comunicação intercelular pelas junções do tipo *gap*;
- A concentração administrada raiz em pó de *Pfaffia paniculata* foi fator determinante nos efeitos quimiopreventivos observados.

7.2 EXPERIMENTO 2 – EFEITOS DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DO EXTRATO BUTANÓLICO DA RAIZ DE *P. PANICULATA* SOBRE O CRESCIMENTO DA LINHAGEM DE CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO HEPG2

- A fração 100%, na concentração de 100 µg/mL, comprometeu a viabilidade das culturas celulares da linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2;

- O tratamento com 100 µg/mL da fração 100% reduziu a proliferação celular na linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2 por inibir a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase G2;
- Os princípios ativos presentes na fração 100% inibiram o ciclo celular pela modulação da expressão gênica de enzimas inibção responsáveis pela progressão do ciclo celular, como as ciclinas D1 e E, CDK6 e p27.
- A indução de apoptose pode não ser um mecanismo utilizado pelos princípios ativos presentes na fração 100% para controlar proliferação celular.

REFERÊNCIAS

- ABBOUD, P. A.; HAKE, P. W.; BURROUGHS, T. J.; ODOMS, K.; O'CONNOR, M.; MANGESHKAR, P.; WONG, H. R.; ZINGARELLI, B. Therapeutic effect of epigallocatechin-3-gallate in a mouse model of colitis. **European Journal of Pharmacology**, v. 579, n. 1-3, p. 411-417, 2008.
- ABBRUZZESE, J. L.; LIPPMAN, S. M. The convergence of cancer prevention and therapy in early-phase clinical drug development. **Cancer Cell**, v. 6, n. 4, p. 321-326, 2004.
- ABRAHAM, R. T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. **Genes & Development**, v. 15, n. 17, p. 2177-2196, 2001.
- ADHAMI, V. M.; AFAQ, F.; AHMAD, N. Suppression of ultraviolet B exposure mediated activation of NF- κ B in normal human keratinocytes by resveratrol. **Neoplasia**, v. 5, n. 1, p. 74-82, 2003.
- AGGARWAL, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 9, p. 745-756, 2003.
- AGGARWAL, S.; ICHIKAWA, H.; TAKADA, Y.; SANDUR, S. K.; SHISHODIA, S.; AGGARWAL, B. B. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of IkappaBalpha kinase and Akt activation. **Molecular Pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 195-206, 2006.
- ALE-AGHA, N.; STAHL, W.; SIES, H. (-)-Epicatechin effects in rat liver epithelial cells: stimulation of gap junctional communication and counteraction of its loss due to the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, n. 12, p. 2145-2149, 2002.
- ALKHALAF, M.; JAFFAL, S. Potent antiproliferative effects of resveratrol on human osteosarcoma SJSA1 cells: Novel cellular mechanisms involving the ERKs/p53 cascade. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, n. 2, p. 318-325, 2006.
- ALNEMRI, E. S.; LIVINGSTON, D. J.; NICHOLSON, D. W.; SALVESEN, G.; THORNBERRY, N. A.; WONG, W. W.; YUAN, J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. **Cell**, v. 87, n. 2, p. 171, 1996.
- ANGEL, P.; KARIN, M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1072, n 2-3, p. 129-157, 1991.
- AOKI, Y.; SATO, H.; NISHIMURA, N.; TAKAHASHI, S.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M. Accelerated DNA adduct formation in the lung of the Nrf2 knockout mouse exposed to diesel exhaust. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 173, n. 3, p. 154-160, 2001.
- ARA, C.; MASSIMI, M.; DEVIRGILIIS CONTI, L. Retinoic acid modulates gap junctional intercellular communication in hepatocytes and hepatoma cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 10, p. 1758-1765, 2002.

ATTIGA, F. A.; FERNANDEZ, P. M.; WEERARATNA, A. T.; MANYAK, M. J.; PATIERNO, S. R. Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases. **Cancer Research**, v. 60, n. 16, p. 4629-4637, 2000.

AVANZO, J. L.; MESNIL, M.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; MACKOWIAK, I. I.; MORI, C. M.; DA SILVA, T. C.; OLORIS, S. C.; GARATE, A. P.; MASSIRONI, S. M.; YAMASAKI, H.; DAGLI, M. L. Z. Increased susceptibility to urethane-induced lung tumors in mice with decreased expression of connexin43. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 10, p. 1973-1982, 2004.

AZIZ, M. H.; NIHAL, M.; FU, V. X.; JARRARD, D. F.; AHMAD, N. Resveratrol-caused apoptosis of human prostate carcinoma LNCaP cells is mediated via modulation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 5, p. 1335-1341, 2006.

BACHMAN, K. E.; ARGANI, P.; SAMUELS, Y.; SILLIMAN, N.; PTAK, J.; SZABO, S.; KONISHI, H.; KARAKAS, B.; BLAIR, B. G.; LIN, C.; PETERS, B. A.; VELCULESCU, V. E.; PARK, B. H. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. **Cancer Biology & Therapy**, v. 3, n. 8, p. 772-775, 2004.

BADER, A. G.; KANG, S.; ZHAO, L.; VOGT, P. K. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 12, p. 921-929, 2005.

BALENDIRAN, G. K.; DABUR, R.; FRASER, D. The role of glutathione in cancer. **Cell Biochemistry and Function**, v. 22, n. 6, p. 343-352, 2004.

BALOGUN, E.; HOQUE, M.; GONG, P.; KILLEEN, E.; GREEN, C. J.; FORESTI, R.; ALAM, J.; MOTTERLINI, R. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. **Biochemical Journal**, v. 371, n. (Pt 3), p. 887-895, 2003.

BALSARA, B. R.; PEI, J.; MITSUUCHI, Y.; PAGE, R.; KLEIN-SZANTO, A.; WANG, H.; UNGER, M.; TESTA, J. R. Frequent activation of AKT in nonsmall cell lung carcinomas and preneoplastic bronchial lesions. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 11, p. 2053-2059, 2004.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

BARNES, N. L.; WARNBERG, F.; FARNIE, G.; WHITE, D.; JIANG, W.; ANDERSON, E.; BUNDRED, N. J. Cyclooxygenase-2 inhibition: effects on tumour growth, cell cycling and lymphangiogenesis in a xenograft model of breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 4, p. 575-582, 2007.

BARTHELMAN, M.; BAIR, W. B. 3rd; STICKLAND, K. K.; CHEN, W.; TIMMERMAN, B. N.; VALCIC, S.; DONG, Z.; BOWDEN, G. T. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibition of ultraviolet B-induced AP-1 activity. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 12, p. 2201-2204, 1998.

BARTSCH, H.; NAIR, J. Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. **Cancer Detection and Prevention**, v. 28, n. 6, p. 385-391, 2004.

BENITEZ, D. A.; POZO-GUISADO, E.; ALVAREZ-BARRIENTOS, A.; FERNANDEZ-SALGUERO, P. M.; CASTELLÓN, E. A. Mechanisms involved in resveratrol-induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer-derived cell lines. **Journal of Andrology**, v. 28, n. 2, p. 282-293, 2007.

BENITEZ, D. A.; POZO-GUISADO, E.; CLEMENTI, M.; CASTELLÓN, E.; FERNANDEZ-SALGUERO, P. M. Non-genomic action of resveratrol on androgen and oestrogen receptors in prostate cancer: modulation of the phosphoinositide 3-kinase pathway. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 10, p. 1595-1604, 2007.

BHARDWAJ, A.; SETHI, G.; VADHAN-RAJ, S.; BUESO-RAMOS, C.; TAKADA, Y.; GAUR, U.; NAIR, A. S.; SHISHODIA, S.; AGGARWAL, B. B. Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells. **Blood**, v. 109, n. 6, p. 2293-2302, 2007.

BHARTI, A. C.; AGGARWAL, B. B. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 5-6, p. 883-888, 2002.

BHATTACHARYYA, S.; MANDAL, D.; SAHA, B.; SEN, G. S.; DAS, T.; SA, G. Curcumin prevents tumor-induced T cell apoptosis through Stat-5a-mediated Bcl-2 induction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 22, p. 15954-15964, 2007.

BIANCO, R.; MELISI, D.; CIARDIELLO, F.; TORTORA, G. Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets. **European Journal of Cancer**, v. 42, p. 290-294, 2006.

BJORNSTI, M. A.; HOUGHTON, P. J. The TOR pathway: a target for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 5, p. 335-348, 2004.

BODE, A. M.; DONG, Z. Targeting signal transduction pathways by chemopreventive agents. **Mutation Research**, v. 555, n. 1-2, p. 33-51, 2004.

BODO, J.; DURAJ, J.; JAKUBIKOVA, J.; SEDLAK, J. Isothiocyanate E-4IB induces MAPK activation, delayed cell cycle transition and apoptosis. **Cell Proliferation**, v. 40, n. 3, p. 316-326, 2007.

BODO, J.; HUNAKOVA, L.; KVASNICKA, P.; JAKUBIKOVA, J.; DURAJ, J.; KASPARKOVA, J.; SEDLAK, J. Sensitisation for cisplatin-induced apoptosis by isothiocyanate E-4IB leads to signalling pathways alterations. **British Journal of Cancer**, v. 95, n. 10, p. 1348-1353, 2006.

BOOSANI, C. S.; MANNAM, A. P.; COSGROVE, D.; SILVA, R.; HODIVALA-DILKE, K. M.; KESHAMOUNI, V. G.; SUDHAKAR, A. Regulation of COX-2 mediated signaling by alpha3 type IV noncollagenous domain in tumor angiogenesis. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1168-1177, 2007.

BORLADO, L. R.; REDONDO, C.; ALVAREZ, B.; JIMENEZ, C.; CRIADO, L. M.; FLORES, J.; MARCOS, M. A.; MARTINEZ-A. C.; BALOMENOS, D.; CARRERA, A. C. Increased phosphoinositide 3-kinase activity induces a lymphoproliferative disorder and contributes to tumor generation in vivo. **The FASEB Journal**, v. 14, n. 4, p. 895–903, 2000.

BRUZZONE, R.; WHITE, T. W.; PAUL, D. L. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. **European Journal of Biochemistry**, v. 238, n. 1, p. 1–27, 1996.

BUDUNOVA, I.; WILLIAMS, G. M. Cell culture assays for chemicals with tumor promoting or inhibiting activity based on the modulation of intercellular communication. **Cell Biology and Toxicology**, v. 10, n. 2, p. 71–116, 1994.

BUEDING, E.; DOLAN, P.; LEROY, J. P. The antischistosomal activity of oltipraz. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 293–303, 1982.

CAMACHO-BARQUERO, L.; VILLEGAS, I.; SÁNCHEZ-CALVO, J. M.; TALERO, E.; SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; MOTILVA, V.; ALARCÓN DE LA LASTRA, C. Curcumin, a *Curcuma longa* constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 3, p. 333–342, 2007.

CAMPBELL, I. G.; RUSSELL, S. E.; CHOONG, D. Y.; MONTGOMERY, K. G.; CIAVARELLA, M. L.; HOOI, C. S.; CRISTIANO, B. E.; PEARSON, R. B.; PHILLIPS, W. A. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. **Cancer Research**, v. 64, n. 21, p. 7678–7681, 2004.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1655–1657, 2002.

CARNEIRO, C. S.; COSTA-PINTO, F. A.; DA SILVA, A. P.; PINELLO, K. C.; DA SILVA, T. C.; MATSUZAKI, P.; NAGAMINE, M. K.; GÓRNIK, S. L.; HARAGUCHI, M.; AKISUE, G.; DAGLI, M. L. *Paffia paniculata* (Brazilian ginseng) methanolic extract reduces angiogenesis in mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 58, n. 6, p. 427–431, 2007.

CARYSTINOS, G. D.; ALAOUJ-JAMALI, M. A.; PHIPPS, J.; YEN, L.; BATIST, G. Upregulation of gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression by cyclic-AMP and all-trans-retinoic acid is associated with glutathione depletion and chemosensitivity in neuroblastoma cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 47, n. 2, p. 126–132, 2001.

CASTEGNARO, M.; EISENBRAND, G.; ELLEN, G.; KEEFER, L.; KLEIN, D.; SANSONE, E. B.; SPINCER, D.; TELLING, G.; WEBB, K. **Laboratory Decontamination and Destruction of Carcinogens in Laboratory Wastes: some N-nitrosamines**. Lyon: IARC, Scientific Publications, 1982. 73 p.

CHANSON, M.; DEROUETTE, J. P.; ROTH, I.; FOGLIA, B.; SCERRI, I.; DUDEZ, T.; KWAK, B. R. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1711, n. 2, p. 197-207, 2005.

CHAUMONTET, C.; BEX, V.; GAILLARD-SANCHEZ, I.; SEILLAN-HEBERDEN, C.; SUSCHETET, M.; MARTEL, P. Apigenin and tangeretin enhance gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 10, p. 2325-2330, 1994.

CHEN, C.; YU, R.; OWUOR, E. D.; KONG, A. N. Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. **Archives of Pharmacal Research**, v. 23, n. 6, p. 605-612, 2000.

CHEN, F.; CASTRANOVA, V.; SHI, X. New insights into the role of nuclear factor- κ B in cell growth regulation. **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 2, p. 387-397, 2001.

CHEN, P. N.; HSIEH, Y. S.; CHIOU, H. L.; CHU, S. C. Silibinin inhibits cell invasion through inactivation of both PI3K-Akt and MAPK signaling pathways. **Chemico-Biological Interactions**, v. 156, n. 2-3, p. 141-150, 2005.

CHEN, S. C.; PELLETIER, D. B.; AO, P.; BOYNTON, A. L. Connexin43 reverses the phenotype of transformed cells and alters their expression of cyclin/cyclin-dependent kinases. **Cell Growth Differ.**, v. 6, n. 6, p. 681-690, 1995.

CHEN, Y. R.; WANG, X.; TEMPLETON, D.; DAVIS, R. J.; TAN, T. H. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 50, p. 31929-31936, 1996.

CHENG, J. Q.; RUGGERI, B.; KLEIN, W. M.; SONODA, G.; ALTOMARE, D. A.; WATSON, D. K.; TESTA, J. R. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 8, p. 3636-3641, 1996.

CHOI, E. J. Hesperetin induced G1-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of CDK4 and p21. **Nutrition and Cancer**, v. 59, n. 1, p. 115-119, 2007.

CHUN, K. S.; KEUM, Y. S.; HAN, S. S.; SONG, Y. S.; KIM, S. H.; SURH, Y. -J. Curcumin inhibits phorbol ester-induced expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through suppression of extracellular signal-regulated kinase activity and NF- κ B activation. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 1515-1524, 2003.

CHURCHMAN, A.; BAYDOUN, A. R.; HOFFMAN, R. Inhibition of angiogenic tubule formation and induction of apoptosis in human endothelial cells by the selective cyclooxygenase-2 inhibitor 5-bromo-2-(4-fluorophenyl)-3-(methylsulfonyl) thiophene (DuP-697). **European Journal of Pharmacology**, v. 573, n. 1-3, p. 176-183, 2007.

COBB, M. H.; GOLDSMITH, E. J. How MAP kinases are regulated. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 25, p. 14843-14846, 1995.

CONKLIN, C. M.; BECHBERGER, J. F.; MACFABE, D.; GUTHRIE, N.; KUROWSKA, E. M.; NAUS, C. C. Genistein and quercetin increase connexin43 and suppress growth of breast cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 1, p. 93-100, 2007.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n 6917, p. 860-867, 2002.

CRUCIANI, V.; MIKALSEN, S. O. The vertebrate connexin family. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 10, p. 1125-1140, 2006.

CUI, Y.; KIM, D. S.; PARK, S. H.; YOON, J. A.; KIM, S. K.; KWON, S. B.; PARK, K. C. Involvement of ERK AND p38 MAP kinase in AAPH-induced COX-2 expression in HaCaT cells. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 129, n. 1, p. 43-52, 2004.

DA SILVA, T. C.; SILVA, A. P.; AKISUE, G.; AVANZO, J. L.; NAGAMINE, M. K.; FUKUMASU, H.; MATSUZAKI, P.; RASPANTINI, P. C.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S. L.; DAGLI, M. L. Z. Inhibitory effects of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on preneoplastic and neoplastic lesions in a mouse hepatocarcinogenesis model. **Cancer Letters**, v. 226, n. 2, p. 107-113, 2005.

DAUBRAWA, F.; SIES, H.; STAHL, W. Astaxanthin diminishes gap junctional intercellular communication in primary human fibroblasts. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n .11, p. 2507-2511, 2005.

DAVE, B.; EASON, R. R.; TILL, S. R.; GENG, Y.; VELARDE, M. C.; BADGER, T. M.; SIMMEN, R. C. The soy isoflavone genistein promotes apoptosis in mammary epithelial cells by inducing the tumor suppressor PTEN. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 10, p. 1793-1803, 2005.

DAVIDSON, N. E.; EGNER, P. A.; AND KENSLER, T. W. Transcriptional control of glutathione S-transferase gene expression by the chemoprotective agent 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiole-3-thione (oltipraz) in rat liver. **Cancer Research**, v. 50, n. 8, p. 2251-2255, 1990.

DE FLORA, S.; FERGUSON, L. R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**, v. 591, n. 1-2 p. 8-15, 2005.

DE MOURA ESPÍNDOLA, R.; MAZZANTINI, R. P.; ONG, T. P.; DE CONTI, A.; HEIDOR, R.; MORENO, F. S. Geranylgeraniol and beta-ionone inhibit hepatic preneoplastic lesions, cell proliferation, total plasma cholesterol and DNA damage during the initial phases of hepatocarcinogenesis, but only the former inhibits NF-kappaB activation. **Carcinogenesis**, v. 26, p. 1091-1099, 2005.

DE TOMMASI, N.; AUTORE, G.; BELLINO, A.; PINTO, A.; PIZZA, C.; SORRENTINO, R.; VENTURELLA, P. Antiproliferative triterpene saponins from *Trevesia palmate*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 308-314, 2000.

DEEB, D.; JIANG, H.; GAO, X.; AL-HOLOU, S.; DANYLUK, A. L.; DULCHAVSKY, S. A.; GAUTAM, S. C. Curcumin [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-6-heptadine-3,5-dione; C₂₁H₂₀O₆] sensitizes human prostate cancer cells to tumor necrosis factor-related

apoptosis-inducing ligand/Apo2L-induced apoptosis by suppressing nuclear factor-kappaB via inhibition of the prosurvival Akt signaling pathway. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 321, n. 2, p. 616-625, 2007.

DEGUCHI, H.; FUJII, T.; NAKAGAWA, S.; KOGA, T.; SHIROUZU, K. Analysis of cell growth inhibitory effects of catechin through MAPK in human breast cancer cell line T47D. **International Journal of Oncology**, v. 21, n. 6, p. 1301-1305, 2002.

DEPOWSKI, P. L.; ROSENTHAL, S. I.; ROSS, J. S. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. **Modern Pathology**, v. 14, n. 7, p. 672-676, 2001.

DEROUET-HUMBERT, E.; ROEMER, K.; BUREIK, M. Adrenodoxin (Adx) and CYP11A1 (P450scc) induce apoptosis by the generation of reactive oxygen species in mitochondria. **Biological Chemistry**, v. 386, n. 5, p. 453-461, 2005.

DHANALAKSHMI, S.; SINGH, R. P.; AGARWAL, C.; AGARWAL, R. Silibinin inhibits constitutive and TNFalpha-induced activation of NF-kappaB and sensitizes human prostate carcinoma DU145 cells to TNFalpha-induced apoptosis. **Oncogene**, v. 21, n. 11, p. 1759-1767, 2002.

DHANDAPANI, K. M.; MAHESH, V. B.; BRANN, D. W. Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors. **Journal of Neurochemistry**, v. 102, n. 2, p. 522-538, 2007.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; HOLTZCLAW, W. D.; COLE, R. N.; ITOH, K.; WAKABAYASHI, N.; KATOH, Y.; YAMAMOTO, M.; TALALAY, P. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 18, p. 11908-11913, 2002.

DIVYA, C. S.; PILLAI, M. R. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis. **Molecular Carcinogenesis**, v. 45, n. 5, p. 320-332, 2006.

DONG, Z.; MA, W.; HUANG, C.; YANG, C. S. Inhibition of tumor promoter-induced activator protein 1 activation and cell transformation by tea polyphenols, (-)-epigallocatechin gallate, and theaflavins. **Cancer Research**, v. 57, n. 19, p. 4414-4419, 1997.

DOWNWARD, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 1, p. 11-22, 2003.

DUAN, R.; GINSBURG, E.; VONDERHAAR, B. K. Estrogen stimulates transcription from the human prolactin distal promoter through AP1 and estrogen responsive elements in T47D human breast cancer cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 281, n. 1-2, p. 9-18, 2008.

EINBOND, L. S.; SHIMIZU, M.; NUNTANAKORN, P.; SETER, C.; CHENG, R.; JIANG, B.; KRONENBERG, F.; KENNELLY, E. J.; WEINSTEIN, I. B. Actein and a fraction of

black cohosh potentiate antiproliferative effects of chemotherapy agents on human breast cancer cells. **Planta Medica**, v. 72, n. 13, p. 1200-1206, 2006.

ENGELBRECHT, A. M.; MATTHEYSE, M.; ELLIS, B.; LOOS, B.; THOMAS, M.; SMITH, R.; PETERS, S.; SMITH, C.; MYBURGH, K. Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line. **Cancer Letters**, v. 258, n. 1, p. 144-153, 2007.

ENOMOTO, A.; ITOH, K.; NAGAYOSHI, E.; HARUTA, J.; KIMURA, T.; O'CONNOR, T.; HARADA, T.; YAMAMOTO, M. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. **Toxicological Sciences**, v. 59, n. 1, p. 169-177, 2001.

ESTROV, Z.; SHISHODIA, S.; FADERL, S.; HARRIS, D.; VAN, Q.; KANTARJIAN, H. M.; TALPAZ, M.; AGGARWAL, B. B. Resveratrol blocks interleukin-1 β -induced activation of the nuclear transcription factor NF- κ B inhibits proliferation causes S-phase arrest and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 987-989, 2003.

EVANS, H. J. Molecular genetic aspects of human cancers: the 1993 Franck Rose Lecture. **British Journal of Cancer**, v. 68, n. 6, p. 1051-1060, 1993.

EVANS, W. E.; RELLING, M.V. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. **Science**, v. 15, n. 286 (5439), p. 487-491, 1999.

EVERT, M.; OTT, T.; TEMME, A.; WILLECKE, K.; DOMBROWSKI, F. Morphology and morphometric investigation of hepatocellular preneoplastic lesions and neoplasms in connexin32-deficient mice. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 5, p. 697-703, 2002.

FAS, S. C.; BAUMANN, S.; ZHU, J. Y.; GIAISI, M.; TREIBER, M. K.; MAHLKNECHT, U.; KRAMMER, P. H.; LI-WEBER, M. Wogonin sensitizes resistant malignant cells to TNF α - and TRAIL-induced apoptosis. **Blood**, v. 108, n. 12, p. 3700-3706, 2006.

GASTWIRT, R. F.; MCANDREW, C. W.; DONOGHUE, D. J. Speedy/RINGO regulation of CDKs in cell cycle, checkpoint activation and apoptosis. **Cell Cycle**, v. 6, n. 10, p. 1188-1193, 2007.

GOLDSTEIN, J. C.; WATERHOUSE, N. J.; JUIN, P.; EVAN, J. I.; GREEN, D. R. The coordinate release of cytochrome *c* during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 3, p. 156-162, 2000.

GUAN, X.; BONNEY, W. J.; RUCH, R. J. Changes in *gap* junction permeability, *gap* junction number, and connexin 43 expression in lindane-treated rat liver epithelial cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 130, n. 1, p. 79-86, 1995.

GUPTA, S.; HUSSAIN, T.; MUKHTAR, H. Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, n. 1, p. 177-185, 2003.

HAHM, E. R.; PARK, S.; YANG, C. H. 7,8-dihydroxyflavanone as an inhibitor for Jun-Fos-DNA complex formation and its cytotoxic effect on cultured human cancer cells. **Natural Product Research**, v. 17, n. 6, p. 431-436, v. 2003.

HARAGUCHI, M.; MIMAKI, Y.; MOTIDOME, Y.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; YOKOSUKA, A.; SASHIDA, Y. Steroidal saponin from the leaves of *Cestrum sendtnerianum*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 715-720, 2000.

HARAKEH, S.; ABU-EL-ARDAT, K.; DIAB-ASSAF, M.; NIEDZWIECKI, A.; EL-SABBAN, M.; RATH, M. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis and cell cycle arrest in HTLV-1-positive and -negative leukemia cells. **Medical Oncology**, v. 25, n. 1, p. 30-39, 2008.

HARPER, C. E.; PATEL, B. B.; WANG, J.; ELTOUM, I. A.; LAMARTINIERE, C. A. Epigallocatechin-3-Gallate suppresses early stage, but not late stage prostate cancer in TRAMP mice: mechanisms of action. **Prostate**, v. 67, n. 14, p. 1576-1589, 2007.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HASEGAWA, H.; SUNG, J. H.; MATSUMIYA, S.; UCHIYAMA, M. Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 62, p. 453-457, 1996.

HASTAK, K.; AGARWAL, M. K.; MUKHTAR, H.; AGARWAL, M. L. Ablation of either p21 or Bax prevents p53-dependent apoptosis induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 7, p. 789-791, 2005.

HASTAK, K.; GUPTA, S.; AHMAD, N.; AGARWAL, M. K.; AGARWAL, M. L.; MUKHTAR, H. Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells. **Oncogene**, v. 22, n. 31, p. 4851-4859, 2003.

HATTA, Y.; ARIMA, N.; MACHINO, T.; ITOH, T.; HASHIMOTO, S.; TAKEUCHI, J.; SAWADA, U.; HAYAKAWA, S.; YAMAMOTO, T.; HORIE, T. Mutational analysis of IkappaBalpha in hematologic malignancies. **International Journal of Molecular Medicine**, v.11, n. 2, p. 239-242, 2003.

HE, Y. J.; LIU, B. H.; XIANG, D. B.; QIAO, Z. Y.; FU, T.; HE, Y. H. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of SW480 colorectal tumor cells involves beta-catenin associated signaling pathway down-regulation. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 31, p. 4981-4985, 2006.

HEISS, E. H.; SCHILDER, Y. D.; DIRSCH, V. M. Chronic treatment with resveratrol induces redox stress- and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 37, p. 26759-26766, 2007.

HIX, L. M.; FREY, D. A.; MCLAWS, M. D.; ØSTERLIE, M.; LOCKWOOD, S. F.; BERTRAM, J. S. Inhibition of chemically-induced neoplastic transformation by a novel tetrasodium diphosphate astaxanthin derivative. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 9, p. 1634-1641, 2005.

HIX, L. M.; LOCKWOOD, S. F.; BERTRAM, J. S. Upregulation of connexin 43 protein expression and increased gap junctional communication by water soluble disodium disuccinate astaxanthin derivatives. **Cancer Letters**, v. 211, n. 1, p. 25-37, 2004.

HOGAN, F. S.; KRISHNEGOWDA, N. K.; MIKHAILOVA, M.; KAHLENBERG, M. S. Flavonoid, silibinin, inhibits proliferation and promotes cell-cycle arrest of human colon cancer. **The Journal of Surgical Research**, v. 143, n. 1, p. 58-65, 2007.

HOU, Z.; SANG, S.; YOU, H.; LEE, M. J.; HONG, J.; CHIN, K. V.; YANG, C. S. Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells. **Cancer Research**, v. 65, n. 17, p. 8049-8056, 2005.

HOWELLS, L. M.; MITRA, A.; MANSON, M. M. Comparison of oxaliplatin- and curcumin-mediated antiproliferative effects in colorectal cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 1, p. 175-183, 2007.

HSIAO, Y. C.; HSIEH, Y. S.; KUO, W. H.; CHIOU, H. L.; YANG, S. F.; CHIANG, W. L.; CHU, S. C. The tumor-growth inhibitory activity of flavanone and 2'-OH flavanone in vitro and in vivo through induction of cell cycle arrest and suppression of cyclins and CDKs. **Journal of Biomedical Science**, v. 14, n. 1, p. 107-119, 2007.

HU, G.; HAN, C.; CHEN, J. Inhibition of oncogene expression by green tea and (-)-epigallocatechin gallate in mice. **Nutrition and Cancer**, v. 24, n. 2, p. 203-209, 1995.

HUANG, S.; PETTAWAY, C. A.; UEHARA, H.; BUCANA, C. D.; FIDLER, I. J. Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. **Oncogene**, v. 20, n. 31, p. 4188-4197, 2001.

HWANG, J. W.; PARK, J. S.; JO, E. H.; KIM, S. J.; YOON, B. S.; KIM, S. H.; LEE, Y. S.; KANG, K. S. Chinese cabbage extracts and sulforaphane can protect H2O2-induced inhibition of gap junctional intercellular communication through the inactivation of ERK1/2 and p38 MAP kinases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 8205-8210, 2005.

IGNEY, F.H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 277-288, 2002.

ISHAK, K.; BAPTISTA, A.; BIANCHI, L.; CALLEA, F.; DE GROOTE, J.; GUDAT, F.; DENK, H.; DESMET, V.; KORB, G.; MACSWEEN, R. N.; PHILLIPS, M. J. Histological grading and staging of chronic hepatitis. **Journal of Hepatology**, v. 22, n. 6, p. 696-699, 1995.

JAKUBÍKOVÁ, J.; SEDLÁK, J.; BACON, J.; GOLDSOON, A.; BAO, Y. Effects of MEK1 and PI3K inhibitors on allyl-, benzyl- and phenylethyl-isothiocyanate-induced G2/M arrest and cell death in Caco-2 cells. **International Journal of Oncology**, v. 27, n. 5, p. 1449-1458, 2005.

JANSSEN, J. W.; SCHLEITHOFF, L.; BARTRAM, C. R.; SCHULZ, A. S. An oncogenic fusion product of the phosphatidylinositol 3-kinase p85 β subunit and HUMORF8, a putative deubiquitinating enzyme. **Oncogene**, v. 16, n. 13, p. 1767-1772, 1998.

JEONG, S. J.; HAN, S. H.; KIM, D. Y.; LEE, J. C.; KIM, H. S.; KIM, B. H.; LEE, J. S.; HWANG, E. H.; PARK, J. K. Effects of mRg2, a mixture of ginsenosides containing 60% Rg2, on the ultraviolet B-induced DNA repair synthesis and apoptosis in NIH3T3 cells. **International Journal of Toxicology**, v. 26, n. 2, p. 151-158, 2007.

JIANG, J. G.; CHEN, C. L.; CARD, J. W.; YANG, S.; CHEN, J. X.; FU, X. N.; NING, Y. G.; XIAO, X.; ZELDIN, D. C.; WANG, D. W. Cytochrome P450 2J2 promotes the neoplastic phenotype of carcinoma cells and is up-regulated in human tumors. **Cancer Research**, v. 65, n. 11, p. 4707-4715, 2005.

JIMENEZ-LOPEZ, J. M.; CEDERBAUM, A. I. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate protects HepG2 cells against CYP2E1-dependent toxicity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 3, p. 359-370, 2004.

JIN, Q.; FENG, L.; BEHRENS, C.; BEKELE, B. N.; WISTUBA, II.; HONG, W. K.; LEE, H. Y. Implication of AMP-activated protein kinase and Akt-regulated survivin in lung cancer chemopreventive activities of deguelin. **Cancer Research**, v. 67, n. 24, p. 11630-11639, 2007.

JOHNSON, I. T. Phytochemicals and cancer. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 66, p. 207-215, 2007.

JU, W.; WANG, X.; SHI, H.; CHEN, W.; BELINSKY, S. A.; LIN, Y. A critical role of luteolin-induced reactive oxygen species in blockage of tumor necrosis factor-activated nuclear factor-kappaB pathway and sensitization of apoptosis in lung cancer cells. **Molecular Pharmacology**, v. 71, n. 5, p. 1381-1388, 2007.

KALDIS, P.; ALEEM, E. Cell cycle sibling rivalry: Cdc2 vs. Cdk2. **Cell Cycle**, v. 4, n. 11, p. 1491-1494, 2005.

KANG, K. S.; KANG, B. C.; LEE, B. J.; CHE, J. H.; LI, G. X.; TROSKO, J. E.; LEE, Y. S. Preventive effect of epicatechin and ginsenoside Rb₂ on the inhibition of gap junctional intercellular communication by TPA and H₂O₂. **Cancer Letters**, v. 152, n. 1, p. 97-106, 2000.

KANG, K.; KIM, Y. W.; KIM, S. U.; CHAE, S.; KOH, Y. S.; KIM, H. S.; CHOO, M. K.; KIM, D. H.; HYUN, J. W. G1 phase arrest of the cell cycle by a ginseng metabolite, compound K, in U937 human monocytic leukemia cells. **Archives of Pharmacol Research**, v. 2, n. 6, p. 685-690, 2005.

KAPLOWITZ, N.; AW, T. Y.; OOKHTENS, M. The regulation of hepatic glutathione. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 25, p. 715-744, 1985.

KARIN, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 28, p. 16483–16486, 1995.

KARIN, M. How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6867–6874, 1999.

KARIN, M.; TAKAHASHI, T.; KAPAHIL, P.; DELHASE, M.; CHEN, Y.; MAKRIS, C.; ROTHWARF, D.; BAUD, V.; NATOLI, G.; GUIDO, F.; LI, N. Oxidative stress and gene expression: the AP-1 and NF-kappaB connections. **Biofactors**, v. 15, n. 2-4, p. 87-89, 2001.

KATIIYAR, S. K.; AFAQ, F.; AZIZUDDIN, K.; MUKHTAR, H. Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 176, n. 2, p. 110-117, 2001.

KAWABE, T.; SUGANUMA, M.; ANDO, T.; KIMURA, M.; HORI, H.; OKAMOTO, T. Cdc25C interacts with PCNA at G2/M transition. **Oncogene**, v. 21, n. 11, p. 1717-1726, 2002.

KIM, A. L.; ZHU, Y.; ZHU, H.; HAN, L.; KOPELOVICH, L.; BICKERS, D. R.; ATHAR, M. Resveratrol inhibits proliferation of human epidermoid carcinoma A431 cells by modulating MEK1 and AP-1 signalling pathways. **Experimental Dermatology**, v 15, n. 7, p. 538-546, 2006.

KIM, C. H.; MOON, S. K. Epigallocatechin-3-gallate causes the p21/WAF1-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and inhibits matrix metalloproteinase-9 expression in TNF-alpha-induced vascular smooth muscle cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 435, n. 2, p. 264-272, 2005.

KIM, D. W.; SOVAK, M. A.; ZANIESKI, G.; NONET, G.; ROMIEU-MOUREZ, R.; LAU, A. W.; HAFFER, L. J.; YASWEN, P.; STAMPFER, M.; ROGERS, A. E.; RUSSO, J.; SONENSHEIN, G. E. Activation of NF-kappaB/Rel occurs early during neoplastic transformation of mammary cells. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 5, p. 871–879, 2000.

KIM, H. S.; KIM, M. H.; JEONG, M.; HWANG, Y. S.; LIM, S. H.; SHIN, B. A.; AHN, B. W.; JUNG, Y. D. EGCG blocks tumor promoter-induced MMP-9 expression via suppression of MAPK and AP-1 activation in human gastric AGS cells. **Anticancer Research**, v. 24, n. 2B, p. 747-753, 2004.

KIM, J. H.; LEE, E. O.; LEE, H. J.; KU, J. S.; LEE, M. H.; YANG, D. C.; KIM, S. H. Caspase activation and extracellular signal-regulated kinase/Akt inhibition were involved in luteolin-induced apoptosis in Lewis lung carcinoma cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1095, p. 598-611, 2007.

KIM, M. S.; KANG, H. J.; MOON, A. Inhibition of invasion and induction of apoptosis by curcumin in H-ras-transformed MCF10A human breast epithelial cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 24, n. 4, p. 349-354, 2001.

KIM, S. E.; LEE, Y. H.; PARK, J. H.; LEE, S. K. Ginsenoside-Rs3, a new diol-type ginseng saponin, selectively elevates protein levels of p53 and p21WAF1 leading to induction of apoptosis in SK-HEP-1 cells. **Anticancer Research**, v. 19, n. 1A, p. 487-791, 1999.

KIM, S. O.; KUNDU, J. K.; SHIN, Y. K.; PARK, J. H.; CHO, M. H.; KIM, T. Y.; SURH, Y. J. [6]-Gingerol inhibits COX-2 expression by blocking the activation of p38 MAP kinase and NF-kappaB in phorbol ester-stimulated mouse skin. **Oncogene**, v. 24, n. 15, p. 2558-2567, 2005.

KIM, Y. A.; LIM, S. Y.; RHEE, S. H.; PARK, K. Y.; KIM, C. H.; CHOI, B. T.; LEE, S. J.; PARK, Y. M.; CHOI, Y. H. Resveratrol inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in beta-amyloid-treated C6 glioma cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 17, n. 6, p. 1069-1075, 2006.

KIM, Y. S.; AHN, Y.; HONG, M. H.; JOO, S. Y.; KIM, K. H.; SOHN, I. S.; PARK, H. W.; HONG, Y. J.; KIM, J. H.; KIM, W.; JEONG, M. H.; CHO, J. G.; PARK, J. C.; KANG, J. C. Curcumin attenuates inflammatory responses of TNF-alpha-stimulated human endothelial cells. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 41-49, 2007.

KING, K.; CIDLOWSKI, J. A. Cell cycle regulation and apoptosis. **Annual Review of Physiology**, v. 60, p. 601-617, 1998.

KING, T. J.; BERTRAM, J. S. Connexins as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1719, n. 1-2, p. 146-160, 2005.

KLAUNIG, J. E. Chemopreventive effects of green tea components on hepatic carcinogenesis. **Preventive Medicine**, v. 21, n. 4, p. 510-519, 1992.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, v. 402, n. 1-2, p. 185-202, 1998.

KOFFLER, L.; ROSHONG, S.; KYU PARK, I.; CESEN-CUMMINGS, K.; THOMPSON, D. C.; DWYER-NIELD, L. D.; RICE, P.; MAMAY, C.; MALKINSON, A. M.; RUCH, R. J. Growth inhibition in G(1) and altered expression of cyclin D1 and p27(kip-1) after forced connexin expression in lung and liver carcinoma cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 79, n. 3, p. 347-354, 2000.

KONG, A. N.; OWUOR, E.; YU, R.; HEBBAR, V.; CHEN, C.; HU, R.; MANDLEKAR, S. Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). **Drug Metabolism Reviews**, v. 33, n. 3-4, p. 255-271, 2001.

KUANG, Y. F.; CHEN, Y. H. Induction of apoptosis in a non-small cell human lung cancer cell line by isothiocyanates is associated with P53 and P21. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 10, p. 1711-1718, 2004.

KUNDU, J. K.; NA, H. K.; CHUN, K. S.; KIM, Y. K.; LEE, S. J.; LEE, S. S.; LEE, O. S.; SIM, Y. C.; SURH, Y. J. Inhibition of phorbol ester-induced COX-2 expression by epigallocatechin gallate in mouse skin and cultured human mammary epithelial cells. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 11 (Suppl 1), p. 3805S-3810S, 2003.

KWAK, M. K.; WAKABAYASHI, N.; KENSLER, T. W. Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. **Mutation Research**, v. 555, n. 1-2, p. 133-148, 2004.

KWON, K. H.; BARVE, A.; YU, S.; HUANG, M.-T.; KONG, A.-N. T. Cancer chemoprevention by phytochemicals: potential molecular targets, biomarkers and animal models. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, n. 9, p. 1409–1421, 2007.

LAH, J. J.; CUI, W.; HU, K. Q. Effects and mechanisms of silibinin on human hepatoma cell lines. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 40, p. 5299-5305, 2007.

LASCHKE, M. W.; ELITZSCH, A.; SCHEUER, C.; VOLLMAR, B.; MENDER, M. D. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition induces regression of autologous endometrial grafts by down-regulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and stimulation of caspase-3-dependent apoptosis. **Fertility and Sterility**, v. 87, n. 1, p. 163-171, 2007.

LEE, J. S.; SURH, Y. J. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Letters*, v. 224, n. 2, p. 171-184, 2005.

LEE, J. W.; SOUNG, Y. H.; KIM, S. Y.; LEE, H. W.; PARK, W. S.; NAM, S. W.; KIM, S. H.; LEE, J. Y.; YOO, N. J.; LEE, S. H. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. **Oncogene**, v. 24, n. 8, p. 1477–1480, 2005.

LEE, K. W.; CHUN, K. S.; LEE, J. S.; KANG, K. S.; SURH, Y. J.; LEE, H. J. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and restoration of gap junction intercellular communication in H-ras-transformed rat liver epithelial cells by caffeic acid phenethyl ester. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1030, p. 501-507, 2004.

LEE, K. W.; KIM, J. H.; LEE, H. J.; SURH, Y. J. Curcumin inhibits phorbol ester-induced up-regulation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 by blocking ERK1/2 phosphorylation and NF-kappaB transcriptional activity in MCF10A human breast epithelial cells. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 11, p. 1612–1620, 2005.

LEE, M. H.; YANG, H. Y. Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 12-13, p. 1907-1922, 2001.

LEE, S. J.; KO, W. G.; KIM, J. H.; SUNG, J. H.; LEE, S. J.; MOON, C. K.; LEE, B. H. Induction of apoptosis by a novel intestinal metabolite of ginseng saponin via cytochrome c-mediated activation of caspase-3 protease. **Biochemical Pharmacology**, London, v. 60, p. 677-685, 2000.

LEE, Y. J.; KUO, H. C.; CHU, C. Y.; WANG, C. J.; LIN, W. C.; TSENG, T. H. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 12, p. 2281-2289, 2003.

LEVINE, D. A.; BOGOMOLNIY, F.; YEE, C. J.; LASH, A.; BARAKAT, R. R.; BORGES, P. I.; BOYD, J. Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 8, p. 2875–2878, 2005.

LI, J.; YEN, C.; LIAW, D.; PODSYPANINA, K.; BOSE, S.; WANG, S. I.; PUC, J.; MILIARESIS, C.; RODGERS, L.; MCCOMBIE, R.; BIGNER, S. H.; GIOVANELLA, B. C.; ITTMANN, M.; TYCKO, B.; HIBSHOOSH, H.; WIGLER, M. H.; PARSONS, R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **Science**, v. 275, n. 5308, p. 1943–1947, 1997.

LI, Y.; LIU, J.; LIU, X.; XING, K.; WANG, Y.; LI, F.; YAO, L. Resveratrol-induced cell inhibition of growth and apoptosis in MCF7 human breast cancer cells are associated with modulation of phosphorylated Akt and caspase-9. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 135, n. 3, p. 181–192, 2006.

LIANG, Y. C.; HUANG, Y. T.; TSAI, S. H.; LIN-SHIAU, S. Y.; CHEN, C. F.; LIN, J. K. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. **Carcinogenesis**, v.20, n. 10, 1945–1952, 1999.

LIANG, Y. C.; LIN-SHIAU, S. Y.; CHEN, C. F.; LIN, J. K. Inhibition of cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as induction of Cdk inhibitors p21 and p27 during growth arrest of human breast carcinoma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 1–12, 1999.

LIN, A.; KARIN, M. NF-kappaB in cancer: a marked target. **Seminars in Cancer Biology**, v. 13, n. 2, p. 107–114, 2003.

LIN, Y. G.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NAIR, A.; MERRITT, W. M.; HAN, L. Y.; ARMAIZ-PENA, G. N.; KAMAT, A. A.; SPANNUTH, W. A.; GERSHENSON, D. M.; LUTGENDORF, S. K.; AGGARWAL, B. B.; SOOD, A. K. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor-kappaB pathway. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 11, p. 3423–3430, 2007.

LIU, E.; WU, J.; CAO, W.; ZHANG, J.; LIU, W.; JIANG, X.; ZHANG, X. Curcumin induces G2/M cell cycle arrest in a p53-dependent manner and upregulates ING4 expression in human glioma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 85, n. 3, p. 263–270, 2007.

LIU, W. K.; XU, S. X.; CHE, C. T. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. **Life Sciences**, v. 67, n. 11, p. 1297–1306, 2000.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 12 Suppl, p. 3479S–3485S, 2004.

LIVAK, K. J.; FLOOD, S. J.; MARMARO, J.; GIUSTI, W.; DEETZ, K. Oligonucleotide probe with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **PCR Methods and Applications**, v. 4, n. 6, p. 357–362, 1995.

LOWY, D. R.; WILLUMSEN, B. M. Function and regulation of ras. **Annual Review of Biochemistry**, v. 62, p. 851–891, 1993.

MAEDA, T.; TAKEKAWA, M.; SAITO, H. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 554-558, 1995.

MAEDA, T.; WURGLER-MURPHY, S. M.; SAITO, H. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. **Nature**, v. 369, n. 6477, p. 242-245, 1994.

MAEDA-YAMAMOTO, M.; SUZUKI, N.; SAWAI, Y.; MIYASE, T.; SANO, M.; HASHIMOTO-OHTA, A.; ISEMURA, M. Association of suppression of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation by epigallocatechin gallate with the reduction of matrix metalloproteinase activities in human fibrosarcoma HT1080 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 1858-1863, 2003.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, n. 3, p. 222-231, 2001.

MANNA, S.; BANERJEE, S.; MUKHERJEE, S.; DAS, S.; PANDA, C. K. Epigallocatechin gallate induced apoptosis in Sarcoma180 cells in vivo: mediated by p53 pathway and inhibition in U1B, U4-U6 UsnRNAs expression. **Apoptosis**, v. 11, n. 12, p. 2267-2276, 2006.

MARÍN, Y. E.; WALL, B. A.; WANG, S.; NAMKOONG, J.; MARTINO, J. J.; SUH, J.; LEE, H. J.; RABSON, A. B.; YANG, C. S.; CHEN, S.; RYU, J. H. Curcumin downregulates the constitutive activity of NF-kappaB and induces apoptosis in novel mouse melanoma cells. **Melanoma Research**, v. 17, n. 5, p. 274-283, 2007.

MARTIN, K. R. Targeting apoptosis with dietary bioactive agents. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, v. 231, n. 2, p. 117-129, 2006.

MARTINOU, J. C.; GREEN, D. R. Breaking the mitochondrial barrier. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 1, p. 63-67, 2001.

MASUDA, M.; SUZUI, M.; LIM, J. T.; WEINSTEIN, I. B. Epigallocatechin-3-gallate inhibits activation of HER-2/neu and downstream signaling pathways in human head and neck and breast carcinoma cells. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 9, p. 3486-3491, 2003.

MATSUI, T. A.; MURATA, H.; SAKABE, T.; SOWA, Y.; HORIE, N.; NAKANISHI, R.; SAKAI, T.; KUBO, T. Sulforaphane induces cell cycle arrest and apoptosis in murine osteosarcoma cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. **Oncology Reports**, v. 18, n. 5, p. 1263-1268, 2007.

MATSUZAKI, P.; AKISUE, G.; OLORIS, S. C. S.; GÓRNIK, S. L.; DAGLI, M. L. Z. Effect of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascetic form. **Life Sciences**, v. 74, n. 5, p. 573-579, 2003.

MATSUZAKI, P.; HARAGUCHI, M.; AKISUE, G.; OLORIS, S. C. S.; NAGAMINE, M. K.; DA SILVA, T. C.; KAKAI, M.; FONSECA, E. S. M.; PALERMO-NETO, J.; GÓRNIK, S. L.; DAGLI, M. L. Z. Antineoplastic effects of butanolic residue of *Pfaffia paniculata*. **Cancer Letters**, v. 238, n. 1, p. 85-89, 2006.

MCELENY, K.; COFFEY, R.; MORRISSEY, C.; WILLIAMSON, K.; ZANGEMEISTER-WITTKE, U.; FITZPATRICK, J. M.; WATSON, R. W. An antisense oligonucleotide to cIAP-1 sensitizes prostate cancer cells to fas and TNFalpha mediated apoptosis. **Prostate**, v. 59, n. 4, p. 419-425, 2004.

MEERAN, S. M.; KATIYAR, S. K. Grape seed proanthocyanidins promote apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells through alterations in Cdk1-Cdk-cyclin cascade, and caspase-3 activation via loss of mitochondrial membrane potential. **Experimental Dermatology**, v. 16, n. 5, p. 405-415, 2007.

MIMAKI, Y.; KUROKA, M.; ASANO, T.; SASHIDA, Y. Triterpene saponins and lignans from the roots of *Pulsatilla chinensis* and their cytotoxic activity against HL-60 cells. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 62, p. 1279-1283, 1999.

MIN, Y. H.; EOM, J. I.; CHEONG, J. W.; MAENG, H. O.; KIM, J. Y.; JEUNG, H. K.; LEE, S. T.; LEE, M. H.; HAHN, J. S. Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable. **Leukemia**, v. 17, n. 5, p. 995-997, 2003.

MIYAMAE, Y.; YAMAMOTO, M.; SASAKI, Y. F.; KOBAYASHI, H.; IGARASHI-SOGA, M.; SHIMOI, K.; HAYASHI, M. Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. **Mutation Research**, v. 418, n. 2-3, p. 131-140, 1998.

MOENNIKES, O.; BUCHMANN, A.; ROMUALDI, A.; OTT, T.; WERRINGLOER, J.; WILLECKE, K.; SCHWARZ, M. Lack of phenobarbital-mediated promotion of hepatocarcinogenesis in connexin32-null mice. **Cancer Research**, v. 60, n. 18, p. 5087-5091, 2000.

MOORE, R. J.; OWENS, D. M.; STAMP, G.; ARNOTT, C.; BURKE, F.; EAST, N.; HOLDSWORTH, H.; TURNER, L.; ROLLINS, B.; PASPARAKIS, M.; KOLLIAS, G.; BALKWILL, F. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. **Nature Medicine**, v. 5, n. 7, p. 828-831, 1999.

MUJOO, K.; HARIDAS, V.; HOFFMANN, J. J.; WÄCHTER, G. A.; HUTTER, L. K.; LU, Y.; BLAKE, M. E.; JAYATILAKE, G. S.; BAILEY, D.; MILLS, G. B.; GUTTERMAN, J. U. Triterpenoid Saponins from *Acacia victoriae* (Benth) Decrease Tumor Cell Proliferation and Induce Apoptosis. **Cancer Research**, v. 61, n. 14, p. 5486-5490, 2001.

MUTHUSWAMY, S. K.; GILMAN, M.; BRUGGE, J. S. Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signalling by homo- and heterodimers. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 10, p. 6845-6857, 1999.

NA, H. K.; SURH, Y. J. Intracellular signaling network as a prime chemopreventive target of (-)-epigallocatechin gallate. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, n. 2, p. 152-159, 2006.

NA, H. K.; WILSON, M. R.; KANG, K. S.; CHANG, C. C.; GRUNBERGER, D.; TROSKO, J. E. Restoration of gap junctional intercellular communication by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in a ras-transformed rat liver epithelial cell line. **Cancer Letters**, v. 157, n. 1, p. 31-38, 2000.

NAKAI, S.; TAKAGI, N.; MIICHI, H.; HAYASHI, S.; NISHIMOTO, N.; TAKEMOTO, T.; KIZU, H. Pfaffosides, nortriterpenoid saponins, from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 8, p. 1703-1705, 1984.

NAKAJIMA, T.; ELOVAARA, E.; ANTTILA, S.; HIRVONEN, A.; CAMUS, A. M.; HAYES, J. D.; KETTERER, B.; VAINIO, H. Expression and polymorphism of glutathione S-transferase in human lungs: risk factors in smoking-related lung cancer. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 4, p. 707-711, 1995.

NAKAMURA, Y.; CHANG, C. C.; MORI, T.; SATO, K.; OHTSUKI, K.; UPHAM, B. L.; TROSKO, J. E. Augmentation of differentiation and gap junction function by kaempferol in partially differentiated colon cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 3, p. 665-671, 2005.

NELSON, D. R.; KAMATAKI, T.; WAXMAN, D. J.; GUENGERICH, F. P.; ESTABROOK, R. W.; FEYEREISEN, R.; GONZALEZ, F. J.; COON, M. J.; GUNSALUS, I. C.; GOTOH, O. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. **DNA and Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 1-51, 1993.

NELSON, K. C.; ARMSTRONG, J. S.; MORIARTY, S.; CAI, J.; WU, M. W.; STERNBERG JR., P.; JONES, D. P. Protection of retinal pigment epithelial cells from oxidative damage by oltipraz, a cancer chemopreventive agent. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 43, n. 11, p. 3550-3554, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NGUYEN, D. T.; HERNANDEZ-MONTES, E.; VAUZOUR, D.; SCHÖNTHAL, A. H.; RICE-EVANS, C.; CADENAS, E.; SPENCER, J. P. The intracellular genistein metabolite 5,7,3',4'-tetrahydroxyisoflavone mediates G2-M cell cycle arrest in cancer cells via modulation of the p38 signaling pathway. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, n. 8, p. 1225-1239, 2006.

NGUYEN, L. N.; MUNSHI, A.; HOBBS, M. L.; STORY, M. D.; MEYN, R. D. Paclitaxel restores radiation-induced apoptosis in a bcl-2-expressing, radiation-resistant lymphoma cell line. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 49, n. 4, p. 1127-1132, 2001.

NIE, D.; NEMETH, J.; QIAO, Y.; ZACHAREK, A.; LI, L.; HANNA, K.; TANG, K.; HILLMAN, G. G.; CHER, M. L.; GRIGNON, D. J.; HONN, K. V. Increased metastatic potential in human prostate carcinoma cells by overexpression of arachidonate 12-lipoxygenase. **Clinical & experimental Metastasis**, v. 20, n. 7, p. 657-663, 2003.

NIELSEN, M.; RUCH, R. J.; VANG, O. Resveratrol reverses tumor-promoter-induced inhibition of gap-junctional intercellular communication. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, n. 3, p. 804-809, 2000.

NIGG, E. A. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 1, p. 21-32, 2001.

NIHAL, M.; AHMAD, N.; MUKHTAR, H.; WOOD, G. S. Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: possible implications for the chemoprevention of melanoma. **International Journal of Cancer**, v. 114, n. 4, p. 513-521, 2005.

NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; TAKEMOTO, T.; ODASHIMA, S.; KIZU, H.; WADA, Y. Pfaffosides and nortriterpenoids saponins from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 1, p. 139-142, 1984.

NOMURA, M.; MA, W.; CHEN, N.; BODE, A. M.; DONG, Z. Inhibition of 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate-induced NF- κ B activation by tea polyphenols (-)-epigallocatechin gallate and theaflavins. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 10, p. 1885-1890, 2000.

NOMURA, M.; MA, W. Y.; HUANG, C.; YANG, C. S.; BOWDEN, G. T.; MIYAMOTO, K.; DONG, Z. Inhibition of ultraviolet B-induced AP-1 activation by theaflavins from black tea. **Molecular Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 148-155, 2000.

NORMANNO, N.; BIANCO, C.; DE LUCA, A.; MAIELLO, M. R.; SALOMON, D. S. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. **Endocrine-Related Cancer**, v. 10, n. 1, p. 1-21, 2003.

NYBERG, K. A.; MICHELSON, R. J.; PUTNAM, C. W.; WEINERT, T. A. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. **Annual Review of Genetics**, v. 36, p. 617-656, 2002.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Contribuição para o estudo farmacognóstico do “ginseng brasileiro” *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze. **Anais da Farmácia e Química de São Paulo**, v. 20, p. 261-277, 1980.

OLSSON, M.; GUSTAFSSON, O.; SKOGASTIERNA, C.; TOLF, A.; RIETZ, B. D.; MORFIN, R.; RANE, A.; EKSTRÖM, L. Regulation and expression of human CYP7B1 in prostate: overexpression of CYP7B1 during progression of prostatic adenocarcinoma. **Prostate**, v. 67, n. 13, p. 1439-1446, 2007.

PAJONK, F.; RIEDISSER, A.; HENKE, M.; MCBRIDE, W. H.; FIEBICH, B. The effects of tea extracts on proinflammatory signaling. **BMC Medicine**, v. 4, p. 28, 2006.

PAN, M. H.; LIN, C. C.; LIN, J. K.; CHEN, W. J. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate suppresses heregulin-beta1-induced fatty acid synthase expression in human breast cancer cells by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase cascade signaling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5030-5037, 2007.

PARK, C.; KIM, G. Y.; KIM, G. D.; CHOI, B. T.; PARK, Y. M.; CHOI, Y. H. Induction of G2/M arrest and inhibition of cyclooxygenase-2 activity by curcumin in human bladder cancer T24 cells. **Oncology Reports**, v. 15, n. 5, p. 1225-1231, 2006.

PARK, S. Y.; KIM, G. Y.; BAE, S. J.; YOO, Y. H.; CHOI, Y. H. Induction of apoptosis by isothiocyanate sulforaphane in human cervical carcinoma HeLa and hepatocarcinoma HepG2 cells through activation of caspase-3. **Oncology Reports**, v. 18, n. 1, p. 181-187, 2007.

PATEL, B. B.; SENGUPTA, R.; QAZI, S.; VACHHANI, H.; YU, Y.; RISHI, A. K.; MAJUMDAR, A. P. Curcumin enhances the effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in mediating growth inhibition of colon cancer cells by modulating EGFR and IGF-1R. **International Journal of Cancer**, v. 122, n. 2, p. 267-273, 2008.

PENG, G.; DIXON, D. A.; MUGA, S. J.; SMITH, T. J.; WARGOVICH, M. J. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits cyclooxygenase-2 expression in colon carcinogenesis. **Molecular Carcinogenesis**, v. 45, n. 5, p. 309-319, 2006.

PENG, G.; WARGOVICH, M. J.; DIXON, D. A. Anti-proliferative effects of green tea polyphenol EGCG on Ha-Ras-induced transformation of intestinal epithelial cells. **Cancer Letters**, v. 238, n. 2, p. 260-270, 2006.

PERRONE, G.; SANTINI, D.; VERZÌ, A.; VINCENZI, B.; BORZOMATI, D.; VECCHIO, F.; COPPOLA, R.; ANTINORI, A.; MAGISTRELLI, P.; TONINI, G.; RABITTI, C. COX-2 expression in ampullary carcinoma: correlation with angiogenesis process and clinicopathological variables. **Journal of Clinical Pathology**, v. 59, n. 5, p. 492-496, 2006.

PHILP, A. J.; CAMPBELL, I. G.; LEET, C.; VINCAN, E.; ROCKMAN, S. P.; WHITEHEAD, R. H.; THOMAS, R. J.; PHILLIPS, W. A. The phosphatidylinositol 3'-kinase p85 α gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. **Cancer Research**, v. 61, n. 20, p. 7426-7429, 2001.

PIANETTI, S.; GUO, S.; KAVANAGH, K. T.; SONENSHEIN, G. E. Green tea polyphenol epigallocatechin-3 gallate inhibits Her-2/neu signaling, proliferation, and transformed phenotype of breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 62, n. 3, p. 652-655, 2002.

PINELLO, K. C.; FONSECA, E. D.; AKISUE, G.; SILVA, A. P.; OLORIS, S. C. S.; SAKAI, M.; MATSUZAKI, P.; NAGAMINE, M. K.; PALERMO NETO, J.; DAGLI, M. L. Z. Effects of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) extract on macrophage activity. **Life Sciences**, v. 78, n. 12, p. 1287-1292, 2006.

PLOHMANN, B.; BADER, G.; HILLER, K.; FRANZ, G. Immunomodulatory and antitumoral effects of triterpenoid saponinas. **Pharmazie**, v. 52, n. 12, p. 953-957, 1997.

PLUMMER, S. M.; HOLLOWAY, K. A.; MANSON, M. M.; MUNKS, R. J.; KAPTEIN, A.; FARROW, S.; HOWELLS, L. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. **Oncogene**, v. 18, n. 44, p. 6013-6020, 1999.

POOL-ZOBEL B.; VEERIAH S.; BÖHMER, F.-D. Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens—focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 591, n. 1-2, p. 74–92, 2005.

POZO-GUISADO, E.; MERINO, J. M.; MULERO-NAVARRO, S.; LORENZO-BENAYAS, M. J.; CENTENO, F.; ALVAREZ-BARRIENTOS, A.; FERNANDEZ-SALGUERO, P. M. Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-kappaB. **International Journal of Cancer**, v. 115, n. 1, p. 74-84, 2005.

PRASAD, S.; KAUR, J.; ROY, P.; KALRA, N.; SHUKLA, Y. Theaflavins induce G2/M arrest by modulating expression of p21waf1/cip1, cdc25C and cyclin B in human prostate carcinoma PC-3 cells. **Life Sciences**, v. 81, n. 17-18, p. 1323-1331, 2007.

PROVINCIALI, M.; PAPALINI, F.; ORLANDO, F.; PIERPAOLI, S.; DONNINI, A.; MORAZZONI, P.; RIVA, A.; SMORLESI, A. Effect of the silybin-phosphatidylcholine complex (IdB 1016) on the development of mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. **Cancer Research**, v. 67, n. 5, p. 2022-2029, 2007.

QIN, J.; XIE, L. P.; ZHENG, X. Y.; WANG, Y. B.; BAI, Y.; SHEN, H. F.; LI, L. C.; DAHIYA, R. A component of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate, promotes apoptosis in T24 human bladder cancer cells via modulation of the PI3K/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 354, n. 4, p. 852-857, 2007.

RAHMAN, I.; MARWICK, J.; KIRKHAM, P. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation NF-κB and pro-inflammatory gene expression. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 6, p. 1255–1267, 2004.

RAMACHANDRAN, C.; RODRIGUEZ, S.; RAMACHANDRAN, R.; RAVEENDRAN, NAIR, P. K.; FONSECA, H.; KHATIB, Z.; ESCALON, E.; MELNICK, S. J. Expression profiles of apoptotic genes induced by curcumin in human breast cancer and mammary epithelial cell lines. **Anticancer Research**, v. 25, n. 5, p. 3293-3302, 2005.

RAMOS-GOMEZ, M.; KWAK, M. K.; DOLAN, P. M.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; TALALAY, P.; KENSLER, T. W. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in Nrf2 transcription factor-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 6, p. 3410–3415, 2001.

RIEGER, M. A.; EBNER, R.; BELL, D. R.; KIESSLING, A.; ROHAYEM, J.; SCHMITZ, M.; TEMME, A.; RIEBER, E. P.; WEIGLE, B. Identification of a novel mammary-restricted cytochrome P450, CYP4Z1, with overexpression in breast carcinoma. **Cancer Research**, v. 64, n. 7, p. 2357-2364, 2004.

ROY, A. M.; BALIGA, M. S.; KATIYAR, S. K. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells via modulation in protein expression of p53 and Bax and caspase-3 activation. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 4, n. 1, p. 81-90, 2005.

SÁEZ, J. C.; BERTHOUD, V. M.; BRANES, M. C.; MARTINEZ, A. D.; BEYER, E. C. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 4, p. 1359-1400, 2003.

SAH, J. F.; BALASUBRAMANIAN, S.; ECKERT, R. L.; RORKE, E. A. Epigallocatechin-3-gallate inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway. Evidence for direct inhibition of ERK1/2 and AKT kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 12755-12762, 2004.

SAHA, P.; BANERJEE, S.; GANGULY, C.; MANNA, S.; PANDA, C. K.; DAS, S. Black tea extract can modulate protein expression of H-ras, c-Myc, p53, and Bcl-2 genes during pulmonary hyperplasia, dysplasia, and carcinoma in situ. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 24, n. 3, p. 211-224, 2005.

SAI, K.; KANNO, J.; HASEGAWA, R.; TROSKO, J. E.; INOUE, T. Prevention of the down-regulation of gap junctional intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 9, p. 1671-1676, 2000.

SALH, B.; ASSI, K.; TEMPLEMAN, V.; PARHAR, K.; OWEN, D.; GÓMEZ-MUÑOZ, A.; JACOBSON, K. Curcumin attenuates DNB-induced murine colitis. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 285, n. 1, p. G235-243, 2003.

SALOMON, D. S.; BRANDT, R.; CIARDIELLO, F.; NORMANNO, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 19, n. 3, p. 183-232, 1995.

SALVESEN, G. S.; DIXIT, V. M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 443-446, 1997.

SAMUELS, Y.; WANG, Z.; BARDELLI, A.; SILLIMAN, N.; PTAK, J.; SZABO, S.; YAN, H.; GAZDAR, A.; POWELL, S. M.; RIGGINS, G. J.; WILLSON, J. K.; MARKOWITZ, S.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B.; VELCULESCU, V. E. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. **Science**, v. 304, n. 5670, p. 554, 2004.

SÁNCHEZ-ALVAREZ, R.; PAÍNO, T.; HERRERO-GONZÁLEZ, S.; MEDINA, J. M.; TABERNERO, A. Tolbutamide reduces glioma cell proliferation by increasing connexin43, which promotes the up-regulation of p21 and p27 and subsequent changes in retinoblastoma phosphorylation. **Glia**, v. 54, n. 2, p. 125-134, 2006.

SANDAL, T. Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. **The Oncologist**, v. 7, n. 1, p. 73-81, 2002.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45, n. 3, p. 528-537, 2000.

SARKAR, F. H.; LI, Y. Cell signaling pathways altered by natural chemopreventive agents. **Mutation Research**, v. 555, n. 1-2, p. 53-64, 2004.

SARTOR, L.; PEZZATO, E.; DONÀ, M.; DELL'AICA, I.; CALABRESE, F.; MORINI, M.; ALBINI, A.; GARBISA, S. Prostate carcinoma and green tea: (-)epigallocatechin-3-gallate inhibits inflammation-triggered MMP-2 activation and invasion in murine TRAMP model. **International Journal of Cancer**, v. 112, n. 5, p. 823-889, 2004.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 4. ed. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2002. p. 607-632.

SCHOLEY, J. M.; BRUST-MASCHER, I.; MOGILNER, A. Cell division. **Nature**, v. 422, n. 6933, p. 746-752, 2003.

SEELIGER, H.; GUBA, M.; KLEESPIES, A.; JAUCH, K. W.; BRUNS, C. J. Role of mTOR in solid tumor systems: a therapeutical target against primary tumor growth, metastases, and angiogenesis. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 26, n. 3-4, p. 611-621, 2007.

SEN, P.; CHAKRABORTY, P. K.; RAHA, S. Tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate impedes the anti-apoptotic effects of low-grade repetitive stress through inhibition of Akt and NFkappaB survival pathways. **FEBS Letters**, v. 580, n. 1, p. 278-284, 2006.

SEXTON, E.; VAN THEMSCHÉ, C.; LEBLANC, K.; PARENT, S.; LEMOINE, P.; ASSELIN, E. Resveratrol interferes with AKT activity and triggers apoptosis in human uterine cancer cells. **Molecular Cancer**, v. 5, p. 45, 2006.

SHAKIBAEI, M.; JOHN, T.; SCHULZE-TANZIL, G.; LEHMANN, I.; MOBASHERI, A. Suppression of NF-kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 9, p. 1434-1445, 2007.

SHANKAR, S.; CHEN, Q.; SARVA, K.; SIDDIQUI, I.; SRIVASTAVA, R. K. Curcumin enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in prostate cancer cells: molecular mechanisms of apoptosis, migration and angiogenesis. **Journal of Molecular Signaling**, v. 2, p. 10, 2007.

SHANKAR, S.; CHEN, Q.; SIDDIQUI, I.; SARVA, K.; SRIVASTAVA, R. K. Sensitization of TRAIL-resistant LNCaP cells by resveratrol (3, 4', 5 tri-hydroxystilbene): molecular mechanisms and therapeutic potential. **Journal of Molecular Signaling**, v. 2, p. 7, 2007.

SHANKAR, S.; SIDDIQUI, I.; SRIVASTAVA, R. K. Molecular mechanisms of resveratrol (3,4,5-trihydroxy-trans-stilbene) and its interaction with TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in androgen-insensitive prostate cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 304, n. 1-2, p. 273-285, 2007.

SHANKAR, S.; SRIVASTAVA, R. K. Involvement of Bcl-2 family members, phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT and mitochondrial p53 in curcumin (diferulolylmethane)-induced apoptosis in prostate cancer. **International Journal of Oncology**, v. 30, n. 4, p. 905-918, 2007.

SHANKAR, S.; SUTHAKAR, G.; SRIVASTAVA, R. K. Epigallocatechin-3-gallate inhibits cell cycle and induces apoptosis in pancreatic cancer. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 5039-5051, 2007.

SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 in cell proliferation and survival. **Oncogene**, v. 20, n. 19, p. 2390-2400, 2001.

SHEN, K. H.; CHANG, J. K.; HSU, Y. L.; KUO, P. L. Chalcone arrests cell cycle progression and induces apoptosis through induction of mitochondrial pathway and inhibition of nuclear factor kappa B signalling in human bladder cancer cells. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.;101, n. 4, p. 254-261, 2007.

SHI, M.; CAI, Q.; YAO, L.; MAO, Y.; MING, Y.; OUYANG, G. Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells. **Cell Biology International**, v. 30, n. 3, p. 221-226, 2006.

SHIM, H. Y.; PARK, J. H.; PAIK, H. D.; NAH, S. Y.; KIM, D. S.; HAN, Y. S. Acacetin-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells involves caspase cascade, mitochondria-mediated death signaling and SAPK/JNK1/2-c-Jun activation. **Molecules and Cells**, v. 24, n. 1, p. 95-104, 2007.

SHIMIZU, T.; NAKAZATO, T.; XIAN, M. J.; SAGAWA, M.; IKEDA, Y.; KIZAKI, M. Resveratrol induces apoptosis of human malignant B cells by activation of caspase-3 and p38 MAP kinase pathways. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 6, p. 742-750, 2006.

SHISHODIA, S.; AMIN, H. M.; LAI, R.; AGGARWAL, B. B. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, n. 5, p. 700-713, 2005.

SHUKLA, S.; GUPTA, S. Apigenin-induced cell cycle arrest is mediated by modulation of MAPK, PI3K-Akt, and loss of cyclin D1 associated retinoblastoma dephosphorylation in human prostate cancer cells. **Cell Cycle**, v. 6, n. 9, p. 1102-1114, 2007.

SIDDIQUI, I. A.; ADHAMI, V. M.; AFAQ, F.; AHMAD, N.; MUKHTAR, H. Modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B- and mitogen-activated protein kinase-pathways by tea polyphenols in human prostate cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 91, n. 2, p. 232-242, 2004.

SIGLER, K.; RUCH, R. J. Enhancement of gap junctional intercellular communication in tumor promoter-treated cells by components of green tea. **Cancer Letters**, v. 69, n. 1, p. 15-19, 1993.

SIMEONIDIS, S.; STAUBER, D.; CHEN, G. Y.; HENDRICKSON, W. A.; THANOS, D. Mechanisms by which Ikb proteins control NF-kB activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 1, p. 49-54, 1999.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDE, R. E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SKOMMER, J.; WLODKOWIC, D.; PELKONEN, J. Cellular foundation of curcumin-induced apoptosis in follicular lymphoma cell lines. **Experimental Hematology**, v. 34, n. 4, p. 463-474, 2006.

SMITH, L. B.; DOWS, R. J. **Flora Ilustrada Catarinense**. 1. parte. Itajaí: Conselho Nacional de Pesquisa do Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Herbário Barbosa Rodrigues, 1972, 112p.

SONG, G.; MAO, Y. B.; CAI, Q. F.; YAO, L. M.; OUYANG, G. L.; BAO, S. D. Curcumin induces human HT-29 colon adenocarcinoma cell apoptosis by activating p53 and regulating apoptosis-related protein expression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 12, p. 1791-1798, 2005.

SORIA, J. C.; LEE, H. Y.; LEE, J. I.; WANG, L.; ISSA, J. P.; KEMP, B. L.; LIU, D. D.; KURIE, J. M.; MAO, L.; KHURI, F. R. Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 5, p. 1178-1184, 2002.

SPECTOR, D. L.; GOLDMAN, R. D.; LEINWAND, L. A. Apoptosis assays. In: **Cells, a laboratory manual culture and biochemical analysis of cells**. Ed. Cold Spring, , v. 1, chapter 15, 1988. p. 24.

SQUIRES, M. S.; HUDSON, E. A.; HOWELLS, L.; SALE, S.; HOUGHTON, C. E.; JONES, J. L.; FOX, L. H.; DICKENS, M.; PRIGENT, S. A.; MANSON, M. M. Relevance of mitogen activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/PKB) pathways to induction of apoptosis by curcumin in breast cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 3, p. 361-376, 2003.

SRIVASTAVA, R. K.; CHEN, Q.; SIDDIQUI, I.; SARVA, K.; SHANKAR, S. Linkage of curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis by cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1). **Cell Cycle**, v. 6, n. 23, p. 2953-2961, 2007.

SRIVASTAVA, S. K.; SINGH, S. V. Cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of nuclear factor kappa B activation in anti-proliferative activity of benzyl isothiocyanate against human pancreatic cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 9, p. 1701-1709, 2004.

STAHL, J. M.; SHARMA, A.; CHEUNG, M.; ZIMMERMAN, M.; CHENG, J. Q.; BOSENBERG, M. W.; KESTER, M.; LAKSHMAN, S.; ROBERTSON, G. P. Deregulated Akt3 Activity Promotes Development of Malignant Melanoma. **Cancer Research**, v. 64, n. 19, p. 7002-7010, 2004.

STEELE, V. E.; KELLOFF, G. J. Development of cancer chemopreventive drugs based on mechanistic approaches. **Mutation Research**, v. 591, n. 1-2, p. 16-23, 2005.

STEELE, V. E.; KELLOFF, G. J.; BALENTINE, D.; BOONE, C. W.; MEHTA, R.; BAGHERI, D.; SIGMAN, C. C.; ZHU, S.; SHARMA, S. Comparative chemopreventive mechanisms of green tea, black tea, and selected polyphenol extracts measured by in vitro bioassays. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 1, p. 63-67, 2000.

SU, C. C.; CHEN, G. W.; LIN, J. G.; WU, L. T.; CHUNG, J. G. Curcumin inhibits cell migration of human colon cancer colo 205 cells through the inhibition of nuclear factor kappa B /p65 and down-regulates cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expressions. **Anticancer Research**, v. 26, n. 2A, p. 1281-1288, 2006.

SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, A. J. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 2, p. 96–102, 2003.

SUN, C.; HU, Y.; LIU, X.; WU, T.; WANG, Y.; HE, W.; WEI, W. Resveratrol downregulates the constitutional activation of nuclear factor-kappaB in multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and invasion, arrest of cell cycle, and induction of apoptosis. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 165, n. 1, p. 9-19, 2006.

SURH, Y. J.; KUNDU, J. K.; NA, H.-K.; LEE, J.-S. Redox-Sensitive Transcription Factors as Prime Targets for Chemoprevention with Anti-Inflammatory and Antioxidative Phytochemicals. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 12 (suppl), p. 2993S–3001S, 2005.

SUZEN, H. S.; GUVENC, G.; TURANLI, M.; COMERT, E.; DUYDU, Y.; ELHAN, A. The role of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in head and neck cancer risk. **Oncology Research**, v. 16, n. 9, p. 423-429, 2007.

SUZUKI, T.; NISHIO, K.; TANABE, S. The MRP family and anticancer drug metabolism. **Current Drug Metabolism**, v. 2, n. 4, p. 367–377, 2001.

SYED, D. N.; AFAQ, F.; KWEON, M. H.; HADI, N.; BHATIA, N.; SPIEGELMAN, V. S.; MUKHTAR, H. Green tea polyphenol EGCG suppresses cigarette smoke condensate-induced NF-kappaB activation in normal human bronchial epithelial cells. **Oncogene**, v. 26, n. 5, p. 673-682, 2007.

SYMONS, A. M.; KING, L. J. Inflammation, reactive oxygen species and cytochrome P450. **Inflammopharmacology**, v. 11, n. 1, p. 75-86, 2003.

TAKAHASHI, H.; NOMATA, K.; MORI, K.; MATSUO, M.; MIYAGUCHI, T.; NOGUCHI, M.; KANETAKE, H. The preventive effect of green tea on the gap junction intercellular communication in renal epithelial cells treated with a renal carcinogen. **Anticancer Research**, v. 24, n. 6, p. 3757-3762, 2004.

TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; ODASHIMA, S.; WADA, Y. Pfaffic acid, a novel nortriterpene from *Pfaffia paniculata* Kuntze. **Tetrahedron Letters**, v. 24, p. 1057-1060, 1982.

TAKEUCHI, K.; MOTODA, Y.; ITO, F. Role of transcription factor activator protein 1 (AP1) in epidermal growth factor-mediated protection against apoptosis induced by a DNA-damaging agent. **The FEBS Journal**, v. 273, n. 16, p. 3743-3755, 2006.

TANG, Y.; ZHAO, D. Y.; ELLIOTT, S.; ZHAO, W.; CURIEL, T. J.; BECKMAN, B. S.; BUROW, M. E. Epigallocatechin-3 gallate induces growth inhibition and apoptosis in human breast cancer cells through survivin suppression. **International Journal of Oncology**, v. 31, n. 4, p. 705-711, 2007.

TATSUKA, M.; MAEDA, M.; OTA, T. Anticarcinogenic effect and enhancement of metastatic potential of BALB/c 3T3 cells by ginsenoside Rh₂. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 92 p. 1184-1189, 2001.

TESKE, M.; TRENTINI, A M. **Herbarium**: compêndio de fitoterapia. São Paulo: Herbarium Laboratório Botânico Ltda, 1994. 268 p.

TESSEMA, M.; LEHMANN, U.; KREIPE H. Cell cycle and no end. **Virchows Archiv**, v. 444, n. 4, p. 313-323, 2004.

THANGAPAZHAM, R. L.; PASSI, N.; MAHESHWARI, R. K. Green Tea Polyphenol and Epigallocatechin Gallate Induce Apoptosis and Inhibit Invasion in Human Breast Cancer Cells. **Cancer Biology & Therapy**, v. 6, n. 12, 2007.

THANGAPAZHAM, R. L.; SINGH, A. K.; SHARMA, A.; WARREN, J.; GADDIPATI, J. P.; MAHESHWARI, R. K. Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Letters**, v. 245, n. 1-2, p. 232-241, 2007.

TIAN, Z.; LIU, Y. M.; CHEN, S. B.; YANG, J. S.; XIAO, P. G.; WANG, L.; WU, E. Cytotoxicity of two triterpenoids from *Nigella glandulifera*. **Molecules**, v. 11, n. 9, p. 693-699, 2006.

TIMÁR, J.; RÁSÓ, E.; DÖME, B.; LI, L.; GRIGNON, D.; NIE, D.; HONN, K. V.; HAGMANN, W. Expression, subcellular localization and putative function of platelet-type 12-lipoxygenase in human prostate cancer cell lines of different metastatic potential. **International Journal of Cancer**, v. 87, n. 1, p. 37-43, 2000.

TOMITA, M.; KAWAKAMI, H.; UCHIHARA, J. N.; OKUDAIRA, T.; MASUDA, M.; TAKASU, N.; MATSUDA, T.; OHTA, T.; TANAKA, Y.; MORI, N. Curcumin suppresses constitutive activation of AP-1 by downregulation of JunD protein in HTLV-1-infected T-cell lines. **Leukemia Research**, v. 30, n. 3, p. 313-321, 2006.

TOMITA, M.; MATSUDA, T.; KAWAKAMI, H.; UCHIHARA, J. N.; OKUDAIRA, T.; MASUDA, M.; OHSHIRO, K.; MORI N. Curcumin targets Akt cell survival signaling pathway in HTLV-I-infected T-cell lines. **Cancer Science**, v. 97, n. 4, p. 322-327, 2006.

TROSKO, J. E. Dietary modulation of the multistage, multimechanisms of human carcinogenesis: effects on initiated stem cells and cell-cell communication. **Nutrition and Cancer**, v. 54, n. 1, p. 102-110, 2006.

UJIKI, M. B.; DING, X. Z.; SALABAT, M. R.; BENTREM, D. J.; GOLKAR, L.; MILAM, B.; TALAMONTI, M. S.; BELL, R. H. Jr.; IWAMURA, T.; ADRIAN, T. E. Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G2/M cell cycle arrest. **Molecular Cancer**, v. 5, p 76, 2006.

VAN DEN HEUVEL, S. Cell-cycle regulation. **WormBook**. sept 21, p 1-16, 2005.

VARGHESE, L.; AGARWAL, C.; TYAGI, A.; SINGH, R. P.; AGARWAL, R. Silibinin efficacy against Human Hepatocellular Carcinoma. **Cancer Therapy: Preclinical**, v. 11, n. 23, p. 8441-8448, 2005.

VAUZOUR, D.; VAFEIADOU, K.; RICE-EVANS, C.; CADENAS, E.; SPENCER, J. P. Inhibition of cellular proliferation by the genistein metabolite 5,7,3',4'-tetrahydroxyisoflavone is mediated by DNA damage and activation of the ATR signalling pathway. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 468, n. 2, p. 159-166, 2007.

VESSELINOVITCH, S. D.; MIHAILOVICH, N. Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse. **Cancer Research**, v. 43, n. 9, p. 4253-4259, 1983.

VINE, A. L.; BERTRAM, J. S. Cancer chemoprevention by connexins. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 21, n. 3-4, p. 199-216, 2002.

VIVANCO, I.; SAWYERS, C. L. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. **Nature Reviews Cancer**, n. 2, n. 7, p. 489-501, 2002.

VUKOVIC, V.; NICKLEE, T.; HEDLEY, D. W. Differential effects of buthionine sulphoximine in hypoxic and non-hypoxic regions of human cervical carcinoma xenografts. **Radiotherapy and Oncology**, v. 60, n. 1, p. 69-73, 2001.

WADA, S.; KHOA, T. V.; KOBAYASHI, Y.; FUNAYAMA, T.; YAMAMOTO, K.; NATSUHORI, M.; ITO, N. Detection of radiation-induced apoptosis using the comet assay. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, p. 1161-1166, 2003.

WAITE, K. A.; SINDEN, M. R.; ENG, C. Phytoestrogen exposure elevates PTEN levels. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 11, p. 1457-1463, 2005.

WAKABAYASHI, C.; MURAKAMI, K.; HASEGAWA, H.; MURATA, J.; SAIKI, I. An intestinal bacterial metabolite of ginseng protopanaxadiol saponins has the ability to induce apoptosis in tumor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 246, n. 3, p. 725-730, 1998.

WANG, C. Z.; XIE, J. T.; ZHANG, B.; NI, M.; FISHBEIN, A.; AUNG, H. H.; MEHENDALE, S. R.; DU, W.; HE, T. C.; YUAN, C. S. Chemopreventive effects of Panax notoginseng and its major constituents on SW480 human colorectal cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 31, n. 5, p. 1149-1156, 2007.

WANG, S.; GAO, J.; LEI, Q.; ROZENGURT, N.; PRITCHARD, C.; JIAO, J.; THOMAS, G. V.; LI, G.; ROY-BURMAN, P.; NELSON, P. S.; LIU, X.; WU, H. Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. **Cancer Cell**, v. 4, n. 3, p. 209-221, 2003.

WANG, Y.; HELLAND, A.; HOLM, R.; KRISTENSEN, G. B.; BORRESEN-DALE, A. L. PIK3CA mutations in advanced ovarian carcinomas. **Human Mutation**, v. 25, n. 3, p. 322, 2005.

WANG, Z.; ZHOU, J.; JU, Y.; ZHANG, H.; LIU, M.; LI, X. Effects of two saponins extracted from the *Polygonatum zanlanscianense* pamp on the human leukemia (HL-60) cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 24, n. 2, p. 159-162, 2001.

WATABE, M.; HISHIKAWA, K.; TAKAYANAGI, A.; SHIMIZU, N.; NAKAKI, T. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NFkappaB and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 7, p. 6017-6026, 2004.

WATANABE, J.; NOMATA, K.; NOGUCHI, M.; SATOH, H.; KANDA, S.; KANETAKE, H.; SAITO, Y. All-trans retinoic acid enhances gap junctional intercellular communication among renal epithelial cells in vitro treated with renal carcinogens. **European Journal of Cancer**, v. 35, n. 6, p. 1003-1008, 1999.

WATANABE, T.; WATANABE, M.; WATANABE, Y.; HOTTA, C. Effects of oral administration of *Pfaffia paniculata* (brazilian ginseng) on incidence of spontaneous leukemia in AKR/J mice. **Cancer Detection and Prevention**, v. 24, n. 2, p. 173-178, 2000.

WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of cancer. **Cancer Research**, v. 45, n. 1, p. 1-8, 1985.

WEI, C. J.; XU, X.; LO, C. W. Connexins and Cell Signaling in Development and Disease. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 20, p. 811-838, 2004.

WEIR, N. M.; SELVENDIRAN, K.; KUTALA, V. K.; TONG, L.; VISHWANATH, S.; RAJARAM, M.; TRIDANDAPANI, S.; ANANT, S.; KUPPUSAMY, P. Curcumin induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by modulating Akt and p38 MAPK. **Cancer Biology & Therapy**, v. 6, n. 2, p. 178-184, 2007.

WHYTE, L.; HUANG, Y. Y.; TORRES, K.; MEHTA, R. G. Molecular mechanisms of resveratrol action in lung cancer cells using dual protein and microarray analyses. **Cancer Research**, v. 67, n. 24, p. 12007-12017, 2007.

WILLIAMS, R. T. The metabolism of certain drugs and food chemicals in man. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 6, n. 179, p.141-154, 1971.

WOO, J. H.; LIM, J. H.; KIM, Y. H.; SUH, S. I.; MIN, D. S.; CHANG, J. S.; LEE, Y. H.; PARK, J. W.; KWON, T. K. Resveratrol inhibits phorbol myristate acetate-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting JNK and PKC delta signal transduction. **Oncogene**, v. 23, n. 10, p. 1845-1853, 2004.

WOO, M. S.; JUNG, S. H.; KIM, S. Y.; HYUN, J. W.; KO, K. H.; KIM, W. K.; KIM, H. S. Curcumin suppresses phorbol ester-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting the PKC to MAPK signaling pathways in human astrogloma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 335, n. 4, p. 1017-1025, 2005.

WOOD, G. A.; SARMA, D. S. R.; ARCHER, M. C. Resistance to the promotion of glutathione *S*-transferase 7-7-positive liver lesions in Copenhagen rats. **Carcinogenesis**, London, v. 20, n. 7, p. 1169-1175, 1999.

WU, B. T.; HUNG, P. F.; CHEN, H. C.; HUANG, R. N.; CHANG, H. H.; KAO, Y. H. The apoptotic effect of green tea (-)-epigallocatechin gallate on 3T3-L1 preadipocytes depends on the Cdk2 pathway. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 53, n. 14, p. 5695-6701, 2005.

WU, W.; SLOMOVITZ, B. M.; SOLIMAN, P. T.; SCHMELER, K. M.; CELESTINO, J.; MILAM, M. R.; LU, K. H. Correlation of cyclin D1 and cyclin D3 overexpression with the loss of PTEN expression in endometrial carcinoma. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 16, n. 4, p. 1668-1672, 2006.

XIA, J.; SONG, X.; BI, Z.; CHU, W.; WAN, Y. UV-induced NF-kappaB activation and expression of IL-6 is attenuated by (-)-epigallocatechin-3-gallate in cultured human keratinocytes in vitro. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 16, n. 5, p. 943-950, 2005.

XIANG, D.; WANG, D.; HE, Y.; XIE, J.; ZHONG, Z.; LI, Z.; XIE, J. Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the beta-catenin/T-cell factor signaling. **Anticancer Drugs**, v. 17, n. 7, p. 753-762, 2006.

XIAO, D.; CHOI, S.; LEE, Y. J.; SINGH, S. V. Role of mitogen-activated protein kinases in phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis in human prostate cancer cells. **Molecular Carcinogenesis**, v. 43, n. 3, p. 130-140, 2005.

XIAO, D.; JOHNSON, C. S.; TRUMP, D. L.; SINGH, S. V. Proteasome-mediated degradation of cell division cycle 25C and cyclin-dependent kinase 1 in phenethyl isothiocyanate-induced G2-M-phase cell cycle arrest in PC-3 human prostate cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 3, n. 5, p. 567-575, 2004.

XIAO, D.; VOGEL, V.; SINGH, S.V. Benzyl isothiocyanate-induced apoptosis in human breast cancer cells is initiated by reactive oxygen species and regulated by Bax and Bak. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 11, p. 2931-2945, 2006.

XU, C.; HUANG, M. T.; SHEN, G.; YUAN, X.; LIN, W.; KHOR, T. O.; CONNEY, A. H.; KONG, A. N. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2. **Cancer Research**, v. 66, n. 16, p. 8293-8296, 2006.

XU, C.; SHEN, G.; CHEN, C.; GÉLINAS, C.; KONG, A. N. Suppression of NF-kappaB and NF-kappaB-regulated gene expression by sulforaphane and PEITC through IkappaBalpha, IKK pathway in human prostate cancer PC-3 cells. **Oncogene**, v. 24, n. 28, p. 4486-4495, 2005.

XU, C.; SHEN, G.; YUAN, X.; KIM, J. H.; GOPALKRISHNAN, A.; KEUM, Y. S.; NAIR, S.; KONG, A. N. ERK and JNK signaling pathways are involved in the regulation of activator protein 1 and cell death elicited by three isothiocyanates in human prostate cancer PC-3 cells. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 3, p. 437-445, 2006.

YAMASAKI, H.; NAUS, C. Role of connexin genes in growth control. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1199-1213, 1996.

YAMASHITA, T.; KOBAYASHI, Y.; MIZOGUCHI, T.; YAMAKI, M.; MIURA, T.; TANAKA, S.; UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N. MKK6-p38 MAPK signaling pathway enhances survival but not bone-resorbing activity of osteoclasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 365, n. 2, p. 252-257, 2008.

YANG, C.; WU, J.; ZHANG, R.; ZHANG, P.; ECKARD, J.; YUSUF, R.; HUANG, X.; ROSSMAN, T. G.; FRENKEL, K. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents transformation of human cells by arsenite (As) and suppresses growth of As-transformed cells. **Toxicology**, v. 213, n. 1-2, p. 81-96, 2005.

YANG, F.; DE VILLIERS, W. J.; MCCLAIN, C. J.; VARILEK, G. W. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 12, p. 2334-2340, 1998.

YARDEN, Y.; SLIWKOWSKI, M. X. Untangling the ErbB signaling network. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 2, p. 127-137, 2001.

YOSHIMOTO, M.; CUNHA, I. W.; COUDRY, R. A.; FONSECA, F. P.; TORRES, C. H.; SOARES, F. A.; SQUIRE, J. A. FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome. **British Journal of Cancer**, v. 97, n. 5, p. 678-685, 2007.

ZAIDAN DAGLI, M. L.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Roles of Gap Junctions and Connexins in Non-Neoplastic Pathological Processes in which Cell Proliferation Is Involved. **The Journal of Membrane Biology**, v. 218, n. 1-3, p. 79-91, 2007.

ZHANG, P.; LI, H.; WU, M. L.; CHEN, X. Y.; KONG, Q. Y.; WANG, X. W.; SUN, Y.; WEN, S.; LIU, J. c-Myc downregulation: a critical molecular event in resveratrol-induced cell cycle arrest and apoptosis of human medulloblastoma cells. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 80, n. 2, p. 123-131, 2006.

ZHANG, R.; LOGANATHAN, S.; HUMPHREYS, I.; SRIVASTAVA, S. K. Benzyl isothiocyanate-induced DNA damage causes G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 11, p. 2728-2734, 2006.

ZHANG, Y. W.; KANEDA, M.; MORITA, I. The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 45, p. 44852-44856, 2003.

ZHANG, Y. W.; MORITA, I.; IKEDA, M.; MA, K. W.; MUROTA, S. Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. **Oncogene**, v. 20, n. 31, p. 4138-4149, 2001.

ZHANG, X.; REN, Z.; ZUO, J.; SU, C.; WANG, R.; CHANG, Y.; FANG, F. The effect of all-trans retinoic acid on gap junctional intercellular communication and connexin 43 gene expression in glioma cells. **Chinese Medical Sciences Journal**, v. 17, n. 1, p. 22-26, 2002.

ZHENG, L. D.; TONG, Q. S.; WU, C. H. Growth inhibition and apoptosis inducing mechanisms of curcumin on human ovarian cancer cell line A2780. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 12, n. 2, p. 126-131, 2006.