

MARIA EMMA CONTIN OLIVEIRA DE ANTONIO

**A HIPÓTESE OXIDATIVA DA CARCINOGENESE:
POSSÍVEL RELAÇÃO DAS AÇÕES ANTIOXIDANTE E
ANTICÂNCER DOS ANTIOXIDANTES NATURAIS**

Monografia apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Especialista
em Ciências Farmacêuticas – Farmácia
Magistral do Departamento de Farmácia,
Setor de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Cid Aimbiré M. Santos

**CURITIBA
2004**

NOTA BIOGRÁFICA

A autora graduou-se em Farmácia Industrial e Bioquímica, pela Universidade Federal do Paraná em 1982. Neste mesmo ano fundou o Laboratório Farmacêutico Dermattus e a Farmácia Dermattus os quais sob sua responsabilidade profissional funcionaram com esta denominação até 1985 lançando uma extensa e diversificada linha cosmética e atuando no ramo da dispensação magistral respectivamente. Desta data em diante os mesmos passaram a ser denominados MR Laboratório Cosmético e Farmacêutico Ltda e Farmácia Campelle, e então com a marca Campelle patenteada, a linha de produção industrial teve uma maior abrangência contando com pontos de vendas locais e outros espalhados por todo o território brasileiro. Tanto a indústria quanto a farmácia de manipulação continuaram sob sua responsabilidade técnica.

Em 2002 ingressou no programa de pós-graduação da mesma universidade, no curso de Ciências Farmacêuticas-Farmácia Magistral com a finalidade de obtenção do título de Especialista, cuja apresentação final é a razão de ser desta monografia.

DEDICATÓRIA

ao meu marido Eliseu pelo apoio e compreensão
aos meus filhos Fernanda, Lucas e Ricardo
pelo amor e incentivo demonstrados

AGRADECIMENTOS

ao professor orientador desta monografia pela amizade
aos demais professores e amigos pelo incentivo
aos familiares pelo apoio e carinho

EPÍGRAFE

“A natureza oculta seus segredos por sua grandiosidade e não por sua astúcia”

Albert Einstein

SUMÁRIO

Lista de Figuras e Ilustrações	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
1 Introdução	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Aspectos fundamentais sobre as causas do câncer	2
1.3 Susceptibilidade à carcinogênese	2
1.3.1 Idade – Fator determinante no risco do câncer	3
1.4 Métodos de tratamento para o câncer	5
1.4.1 A importância das plantas	5
2 Objetivos deste trabalho	7
2.1 Justificativa	7
3 Metodologia utilizada	8
4 Resultados e discussões	10
4.1 Causas das injúrias celulares	13
4.2 Células normais	14
4.3 Controle do crescimento e o ciclo celular	16
4.3.1 Eventos moleculares no crescimento celular	19
4.4 Material genético	20
4.5 Células cancerosas	24
4.5.1 Carcinogênese	25
4.5.2 Mutações	27
4.5.3 Carcinógenos	28
4.6 Sistema reparador do DNA	34
4.7 Radicais Livres	36
4.7.1 Principais radicais derivados do oxigênio	38
4.7.1.1 Superóxido	38
4.7.1.2 Peróxido de hidrogênio	39
4.7.2 Efeitos lesivos dos principais radicais livres	39
4.8 Antioxidantes	42
4.8.1 Substâncias antioxidantes naturais	45
5 Conclusões	75
6 Referências	80

LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

GRÁFICO	1	A relação entre a incidência do câncer e a idade	4
FIGURA	1	Injúrias sofridas pelas células	11
FIGURA	2	Apoptose (1-2-3-4) e Necrose (1-5-6)	12
FIGURA	3	Ciclo celular e os tipos de células	17
FIGURA	4	Duração relativa dos períodos do ciclo celular	18
FIGURA	5	Estruturas do DNA e do RNA	22
FIGURA	6	Estrutura do RNA transportador	23
FIGURA	7	Ação carcinogênica sobre o DNA – Aflatoxina	25
FIGURA	8	Intoxicação pelo álcool na mucosa gástrica	31
FIGURA	9	Radical oxigênio	36
FIGURA	10	Radicais livres	37
FIGURA	11	<i>Artemisia douglasiana</i> Besser	46
FIGURA	12	<i>Achillea millefolium</i> L.	49
FIGURA	13	<i>Diplazium esculentum</i> Retz	51
FIGURA	14	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	53
FIGURA	15	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	54
FIGURA	16	<i>Curcuma longa</i> Linn.	55
FIGURA	17	<i>Panax pseudoginseng</i> L.	56
FIGURA	18	<i>Ginkgo biloba</i> L.	58
FIGURA	19	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	61
FIGURA	20	<i>Camellia sinensis</i> L.	68
FIGURA	21	<i>Cynara scolymus</i> L.	70

RESUMO

Câncer é um termo genérico dado a uma variedade de neoplasias, cujas prováveis causas são múltiplas e às vezes ainda desconhecidas. Possui a capacidade de se desenvolver em todas as células dos organismos multicelulares, no homem e em outros animais, causando sérios danos ao hospedeiro. Em um tecido normal, as células começam a se desenvolver anormalmente e em graus de desorientação diferentes, podendo determinar um crescimento muito agressivo resultando na invasão de outros tecidos (metástases) e culminando com a destruição da população de células normais.

Durante bilhões de anos de evolução, os organismos multicelulares têm desenvolvido sofisticados e independentes sistemas de controle sobre o crescimento e morte celular, de modo que quando o câncer surge clinicamente, é provável que muitos destes mecanismos tenham sido perdidos, especialmente o mecanismo da apoptose, que é o mais alto grau de controle onde a morte celular é programada. As células as quais conseguiram desenvolver câncer, provavelmente conseguiram inativar ou passar por estes mecanismos de controle. A hipótese oxidativa da carcinogênese prega que muitos carcinógenos em muitos variados processos como injúrias por produtos químicos e radiação, toxicidade por oxigênio e outros gases, envelhecimento celular, morte celular pela ação dos fagócitos, danos inflamatórios, ação dos macrófagos, e outros, podem gerar radicais livres que estão principalmente envolvidos em danos celulares, levando estas células a mudanças malignas, causando mutações em genes e estimulando a divisão celular. Carcinógenos oxidantes, especialmente as espécies reativas do oxigênio, interagem em locais específicos em membranas celulares, proteínas e ácidos nucleicos. Eles estão principalmente envolvidos nos danos ao DNA. Agem como iniciadores e/ou promotores da carcinogênese. Antioxidantes representam um importante papel inibindo ou capturando estes radicais livres, e desta maneira dando proteção ao organismo, contra infecções e doenças degenerativas. Recentemente é muito grande a busca por novos antioxidantes, e eles têm sido detectados em grande quantidade e variedade em plantas e ervas, e tem demonstrado propriedades antimutagênicas. Existem evidências de que o consumo de antioxidantes na dieta de maneira freqüente protege o organismo contra o câncer e outras doenças malignas em humanos.

Palavras-chave: Câncer – Anticancerígenos – Plantas antioxidantes – Radicais Livres

ABSTRACT

Cancer is a generic term for a variety of malignant neoplasms, due to unknown and probable multiple causes, arising in all tissues composed of potentially dividing cells, in man and other animals, and resulting in adverse effects on the host through invasive growth and metastases. Cancer is a disease of cell that is transferred of abnormal cells within a normal tissue, as manifested by varying degrees of morphologic disorientation, aggressive growth and invasion, with ultimate destruction of the normal cell population. During a billion years of evolution, the multicellular organism evolved many layers of sophisticated controls, so that clinical cancer results only several independent controls have been lost. Principal among the higher level controls is a mechanism by which potentially cancerous cells commit suicide by programmed cell death (apoptosis). Successful cancer cells must have developed ways of inactivating or by-passing this mechanism. The oxidative hypothesis of carcinogenesis claims that many carcinogens in such varied processes as chemical and radiation injury, oxygen and other gaseous toxicity, cellular aging, microbial killing by phagocytic cells, inflammatory damage, tumor destruction by macrophages, and others, can generate free radicals that damage cells, setting these cells to malignant changes, causing mutations and by stimulating cell division. Oxidants carcinogens interact with multiple cellular targets including membranes, proteins, and nucleic acids. They are mainly involved in DNA damage leading sometimes to mutations in tumor suppressor genes. They act as initiator and/or promotor in carcinogenesis. Antioxidants play an important role in inhibiting and scavenging radicals, thus providing protection to humans against infections and degenerative diseases. Recently a variety of that compounds that possess antioxidant activity detected on herbal and vegetable plants, has been showed with antimutagenic properties and evidence is accumulating that dietary intake decreases the risk of cancer and other malignant diseases in human.

Key words: Cancer – Anticancer – Antioxidant plants – Free radicals

1. INTRODUÇÃO

1.1 GENERALIDADES

O câncer constitui preocupação crescente de todos os povos desde a antiguidade e a oncologia tem se desenvolvido como especialidade distinta e profícua. A redução nas taxas de mortalidade dos vários tipos de câncer, na última década, é demonstração clara dos progressos desta especialidade multidisciplinar.¹

Com tenacidade e muito esforço, as doenças comuns na infância e as doenças infecciosas (principais causas de morte no passado) foram controladas, e uma melhoria nos cuidados médicos e um acelerado desenvolvimento de novas tecnologias antecipando os métodos diagnósticos, fizeram com que o tempo de sobrevida aumentasse. Nos dias atuais (dados de países mais adiantados) este tempo é de 80 a 90 anos.

Sabe-se que a maioria dos cânceres se desenvolve tardiamente na vida de um ser; assim até que a expectativa de vida começasse a aumentar (na metade do século XIX), o número de pessoas diagnosticadas com câncer, era relativamente pequeno.

Embora as doenças cardíacas e as vasculares ainda representem a maior causa de morte entre as pessoas idosas, o câncer é um problema importante, pois pelo menos uma em cada cinco pessoas, desenvolverá câncer, e por esta razão, é tão importante que se possa controlá-lo ou ainda melhor preveni-lo.^{1,2}

As estatísticas indicam aumento da incidência do câncer entre os idosos, e no Brasil especificamente, elas indicam que já no grupo etário de 5 a 14 anos o câncer aparece como as dez maiores causas de óbito. Com isso o câncer passa a ser uma preocupação de saúde pública.

Os epidemiologistas tem aqui papel fundamental, pois trazem informações para que se estabeleça uma diferenciação entre o aumento autêntico da incidência e um aumento no registro de casos, e são motivados pela maior disponibilidade de recursos diagnósticos.²

Desde que há 140 anos, o microscopista Johannes Mueller mostrou que os cânceres eram feitos de células, iniciou-se a busca por alterações que pudessem explicar as diferenças específicas entre as células normais e as cancerosas. Embora os pesquisadores venham acumulando desde então uma quantidade considerável de informações sobre a

estrutura e o comportamento das células tumorais, as questões principais permanecem ainda sem uma resposta satisfatória.

Os avanços em biotecnologia, principalmente na área da biologia celular e molecular, respondem hoje por questões que há dez anos não poderiam sequer ser postuladas, mas mesmo as mais avançadas das tecnologias, só são válidas se empregadas com o conhecimento básico das bases biológicas da doença.^{3,4}

1.2 ASPECTOS FUNDAMENTAIS SOBRE AS CAUSAS DO CÂNCER

As alterações genéticas ou mutações nas células somáticas do organismo são os principais eventos iniciais e são os responsáveis pela progressão de um tumor.

Alterações nos cromossomos, tanto numéricas quanto em sua organização, são eventos importantes.

O sistema imune desempenha um papel no combate ao câncer através do reconhecimento de alterações na superfície das células.

Alguns cânceres são provocados por vírus.

Os cânceres representam uma forma de desdiferenciação, ou mais comumente, de perturbação do estado diferenciado, que está associado à perda do controle de crescimento.³

1.3 SUSCEPTIBILIDADE A CARCINOGENÊSE

Na busca de mais conforto e poder, o homem tornou-se capaz de utilizar novas fontes de energia e as mais diversas matérias-primas, em escala crescente. Em consequência disto, passou a despejar desordenadamente no meio ambiente, quantidades crescentes de substâncias estranhas, que alteram a qualidade do ar, da água, do solo, dos alimentos, dos medicamentos e correlatos, sem a devida reflexão sobre a limitada capacidade de homeostase do meio ambiente.

Hoje um grande número cada vez maior de pessoas vive em áreas industrializadas, sendo esperados uma maior morbidade e mortalidade por câncer.¹

1.3.1 Idade – Fator determinante no risco do câncer

A elucidação das causas de aumento da incidência do câncer, relacionada com a idade, é essencial para o estabelecimento de programas preventivos de diagnóstico precoce.

Há evidências de que as mudanças metabólicas e imunológicas da senescência produzem aumento nas condições favoráveis para o desenvolvimento das neoplasias.

Carcinógenos, incluindo compostos sintetizados no próprio corpo, a partir de precursores, agindo em separado ou mais provavelmente, em combinação por longo tempo, são causas importantes do aumento das neoplasias.

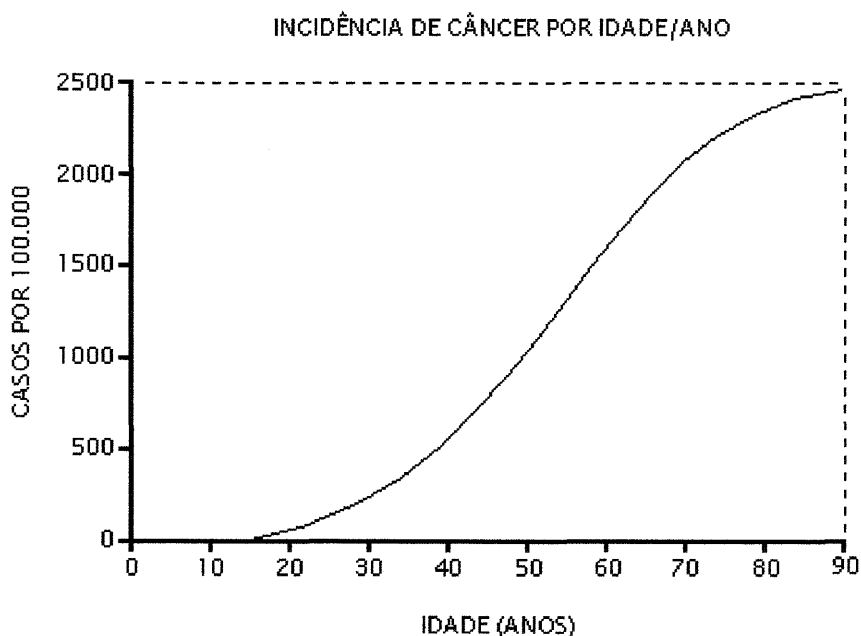
Com o avanço da idade, a sensibilidade tecidual a carcinogênese varia para mais ou para menos, ou ainda pode permanecer inalterada. Esta suposição tem por base a relação dose/tempo/efeito, fundamentada pela observação entre a incidência de câncer de pulmão e o número de cigarros fumados por ano.

Os resultado de numerosos experimentos da exposição de animais de laboratórios a vários agentes carcinógenos (químicos, virais e radiação) não mostrou resultados uniformes, mas de forma global observa-se diferenças na sensibilidade tecidual à carcinogênese, variando com a idade. Dados obtidos com ratos mostram que, com o aumento da idade, a sensibilidade a carcinogênese diminui para a glândula mamária, intestino delgado, cólon, tireóide e epitélio folicular do ovário.⁴ Outros tecidos têm sensibilidade aumentada, como o tecido subcutâneo, cérvix uterina e vagina. Finalmente há tecidos em que não se observam alterações, como pulmão e tecido hematopoiético.¹

O envolvimento das espécies reativas do oxigênio em vários processos degenerativos e no envelhecimento é já estabelecido com certeza, e neste estudo in vivo, em animais, foi feita uma análise nas mudanças relativas à idade e à atividade das enzimas antioxidantes nas diversas regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) (foram utilizados porcos de várias idades). Os resultados mostraram que a atividade da superóxido dismutase e da glutathione peroxidase, se encontraram reduzidas em todas as regiões do SNC estudadas. A atividade da catalase diminuiu significativamente somente no córtex cerebral, hipotálamo e cerebelo. A atividade da glutathione reductase, no entanto, diminuiu no córtex cerebral e hipotálamo. Foi concluído que o declínio nas atividades das enzimas é específico por região e dependente do tipo de enzimas. Nos animais mais velhos, os peróxidos lipídicos endógenos encontraram-se aumentados, significativamente, e após incubação, a análise dos tecidos, mostrou a queda da peroxidação lipídica.

Tais resultados levaram a conclusão de que o acúmulo dos peróxidos lipídicos acontece com o passar dos anos (envelhecimento), mas a suscetibilidade à lipídeo peroxidação diminui nos animais mais velhos.⁵ A regulação da expressão do gene por meio de oxidantes, antioxidantes, e estado redox, permanece como uma abordagem terapêutica promotora. Vários agentes anticarcinogênicos têm sido mostrados como inibidores dos radicais livres e dos danos ao DNA, inibindo assim a promoção do tumor.^{6,7}

GRÁFICO 1 - A RELAÇÃO ENTRE A INCIDÊNCIA DO CÂNCER COM A IDADE.⁸



Uma abordagem importante na relação idade *versus* câncer, é a relação entre as substâncias denominadas "geroprotetoras" e a ocorrência do câncer. Apesar dos inúmeros diferentes mecanismos de ação, os geroprotetores podem ser classificados em dois grupos:

- a) Substâncias que previnem lesões em macromoléculas que modificariam a estrutura gênica, e;
- b) Drogas ou fatores que inibem o envelhecimento decorrente da expressão gênica.

Do primeiro grupo os mais típicos representantes são os antioxidantes. Seus efeitos geroprotetores e antitumorais dependem da idade em que a droga é administrada e da dose utilizada. Os antioxidantes não inibem o envelhecimento por si sós, mas suprimem fatores ambientais, por exemplo, diminuindo o número de radicais livres na alimentação.^{8,9}

1.4 MÉTODOS DE TRATAMENTO PARA O CÂNCER

As principais formas de tratamento do câncer em seres humanos, são a utilização de radiação e agentes quimioterápicos. Frequentemente o paciente tem apenas um alívio nos sintomas, as vezes o prolongamento da vida e ocasionalmente a cura.

Nos últimos anos, muitos esforços têm sido feitos na descoberta de novas drogas com potencial anticancer. Uma droga para ser considerada eficiente como anticancer, deve matar ou incapacitar as células cancerosas, sem causar excessivos danos às células normais. Este ideal é difícil e talvez impossível, e é o motivo de tantos efeitos colaterais sofridos pelos pacientes submetidos a tratamento quimioterápico. A síntese de novas drogas a partir de protótipos conhecidos é sem dúvida um aspecto importante de pesquisa, especialmente para doenças como o câncer.¹⁰

1.4.1 A importância das plantas

Os estudo dos vegetais, no sentido terapêutico e alimentar, data de épocas remotas, e como atividade profissional, é dos mais antigos da história da humanidade.¹¹ O homem na busca pela cura para seus males, sempre utilizou a natureza como fonte de matérias-primas para o tratamento das enfermidades. O uso medicinal de plantas representa um importante aspecto na história da medicina, bem como, contribuição para o desenvolvimento da moderna fitoterapia.

A intensa pesquisa em plantas, microorganismos complexos e animais, para a atividade antitumor, começou em meados de 1950, especialmente com o incentivo do Instituto Nacional do Câncer (NCI). Desde então, um vasto número de extratos de várias fontes vegetais e de diferentes partes das plantas tem sido testados para atividade antitumor, tanto quanto possível e em todos os seus aspectos, inclusive quanto a sua viabilidade. E um grande número destes tem sido considerados suficientemente ativos e então considerados com grande potencial antitumor, e desta maneira são encaminhados para testes clínicos.¹⁰

Entre os investigadores há diferenciação entre os termos citotóxico, antitumor e anticancer. Um agente citotóxico é aquele que é tóxico para as células do tumor *in vitro*, e se esta toxicidade puder se transferida para as células do tumor *in vivo*, ele é considerado possuir atividade antitumor. Já o termo anticancer, é reservado para substâncias as quais são tóxicas para as células do tumor nos experimentos clínicos.¹⁰

Na busca por novas drogas para o câncer, frequentemente os pesquisadores descobrem caminhos para a melhoria ou cura de outras doenças importantes como as vasculares, cardíacas, diabetes. E as vezes uma mesma droga é descoberta como eficaz para várias doenças diferentes.

Em tempos recentes, a busca e o entendimento sobre as drogas antioxidantes de origem natural, têm sido exaustivamente explorada, por demonstrarem ser efetivas em muitas doenças degenerativas.¹² São muitas as drogas com tal efeito, e muitas as estruturas envolvidas e, portanto são muito complexas as explicações sobre seus mecanismos de ação.

Antioxidantes são substâncias muito importantes, pois agem no combate a oxidação celular, impedindo danos celulares e especialmente ao material genético.¹⁰

2. OBJETIVOS

Por ser um fenômeno biológico tão complexo, o estudo do câncer, ou de qualquer fato ligado a ele, exige que se busque conhecer aspectos importantes como sua formação, crescimento, etiologia, epidemiologia, fatores desencadeantes, terapias preventivas, participação do sistema de defesa do organismo e adjuvantes externos, ação sobre o material genético, e quaisquer outros dados complementares importantes. Este trabalho traz uma revisão sobre estes tópicos mais importantes.

Mais especificamente objetiva-se com este trabalho obter na literatura científica uma relação de diversas plantas, com efeito, comprovadamente anticancer, buscando conhecimentos sobre seus princípios ativos, seu conteúdo antioxidante, suas estruturas moleculares, mecanismos de ação, análises de resultados em trabalhos *in vitro* e *in vivo* e outros dados que possam ser considerados pertinentes, para então se tentar estabelecer uma possível relação entre estes efeitos anticancerígenos com a presença das substâncias antioxidantes, as quais estão presentes abundantemente nos vegetais.

Principal atenção foi dada à ação carcinogênica induzida pelos radicais livres, em especial às espécies reativas do oxigênio, e aos benefícios da ação dos antioxidantes naturais, no combate ao câncer.

2.1 JUSTIFICATIVA

A expectativa de poder ajudar a aliviar o sofrimento e morte de muitos pacientes torna o câncer um excitante campo de pesquisa.

A busca cada vez maior por novas terapias faz das plantas e vegetais um excelente objeto de estudo, por sua grande diversidade e disponibilidade, e pelo alto conteúdo em substâncias antioxidantes. Muitas doenças são desencadeadas por radicais livres, e o uso de antioxidantes natural ou sintético deve ser explorado ao máximo no benefício da melhoria das condições da saúde humana.

3. METODOLOGIA UTILIZADA

A pesquisa do câncer é multidisciplinar, e o profissional envolvido, deve conhecer as bases biológicas da doença, que está estudando, deve ter conhecimento dos aspectos clínicos e epidemiológicos, e estar apto a interpretar mudanças na estrutura e no comportamento de células normais e tumorais a nível biológico e molecular.

Este grupo de doenças conhecido como "câncer", tem um significado ainda mais amplo, pois ele não afeta apenas o homem, mas pode atingir praticamente todos os organismos multicelulares, vegetais e animais.

Sabe-se que a desordem celular evidenciada nos processos cancerosos é provocada por alterações no crescimento e desenvolvimento celulares, e, portanto a compreensão dos processos que levam a doença, contribui para o conhecimento dos mecanismos básicos vitais.

Quatro aspectos são fundamentais para a análise patológica do processo das doenças:¹³

- a) etiologia - existem duas classes de fatores etiológicos: intrínsecos ou genéticos, e adquiridos (ex. infecções, fatores físicos, químicos, nutricionais). O conceito de um agente etiológico para uma doença, não é suficiente o bastante. Fatores genéticos estão claramente envolvidos em muitas doenças induzidas por fatores ambientais, tais como aterosclerose e câncer, e fatores ambientais, podem também ter profundas influências em certas doenças genéticas;
- b) patogênese - a patogênese se refere à sequência de eventos ocorridos nas células ou tecidos, em resposta ao agente etiológico, desde o estímulo inicial até a expressão final;
- c) mudanças morfológicas – alterações estruturais induzidas nas células e órgãos do corpo;
- d) transtornos funcionais e significados clínicos – são consequências das mudanças morfológicas. A natureza e a distribuição destas nos diferentes órgãos ou tecidos, têm influência sobre a função normal destes órgãos ou tecidos, determinando características clínicas (sintomas e sinais), o curso e o prognóstico da doença.¹³

Para a realização deste trabalho, buscou-se na literatura clássica os dados necessários ao entendimento dos conceitos específicos e para tanto se utilizou livros tradicionais de biologia molecular, bioquímica, fisiologia, imunologia, geriatria, genética e câncer. Foram consultados também livros e manuais de farmacognosia, para a verificação das partes constituintes mais usadas e seus efeitos farmacológicos, das plantas pesquisadas. Trabalhos científicos recentes foram analisados para a comprovação da utilização crescente de um número cada vez maior de plantas no combate ao câncer, e possíveis relações com os constituintes antioxidantes. Segue então uma descrição dos relatos mais importantes encontrados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dentro de uma homeostase normal a célula possui uma função e estrutura confinada a um programa genético de metabolismo, diferenciação e especialização ainda influenciada pela ação das células vizinhas e pela disponibilidade de substratos metabólicos.

Qualquer estresse fisiológico excessivo ou algum estímulo patológico pode levar a célula a certo número de adaptações fisiológicas e morfológicas, onde sua viabilidade é mantida, mas há uma modulação em sua função em resposta a determinado estímulo.

Se os limites da resposta adaptativa aos estímulos forem excedidos, ou se a adaptação não for possível, ocorre uma seqüência de eventos ao que se denomina injúria celular. Esta injúria pode ser reversível (FIG. 1).

Se o estímulo for persistente ou se for forte o bastante desde o início, então a célula alcança um estágio onde não há mais retorno, e então ocorre uma injúria irreversível e conseqüente morte celular.¹³

Há dois caminhos morfológicos de morte celular: necrose e apoptose (FIG. 2).

- a) necrose ou coagulação é o tipo de morte celular mais comum após um estímulo exógeno, ocorrendo, por exemplo, na injúria química e na isquemia, e é manifestada por uma forte expansão celular (inchaço), ou sua ruptura, desnaturação e coagulação das proteínas citoplasmáticas e ruptura das organelas celulares;
- b) apoptose é um evento mais regulado e é designado para a eliminação da população de células não mais desejadas durante a embriogênese e em vários processos fisiológicos. Suas principais características morfológicas são a condensação e a fragmentação da cromatina.

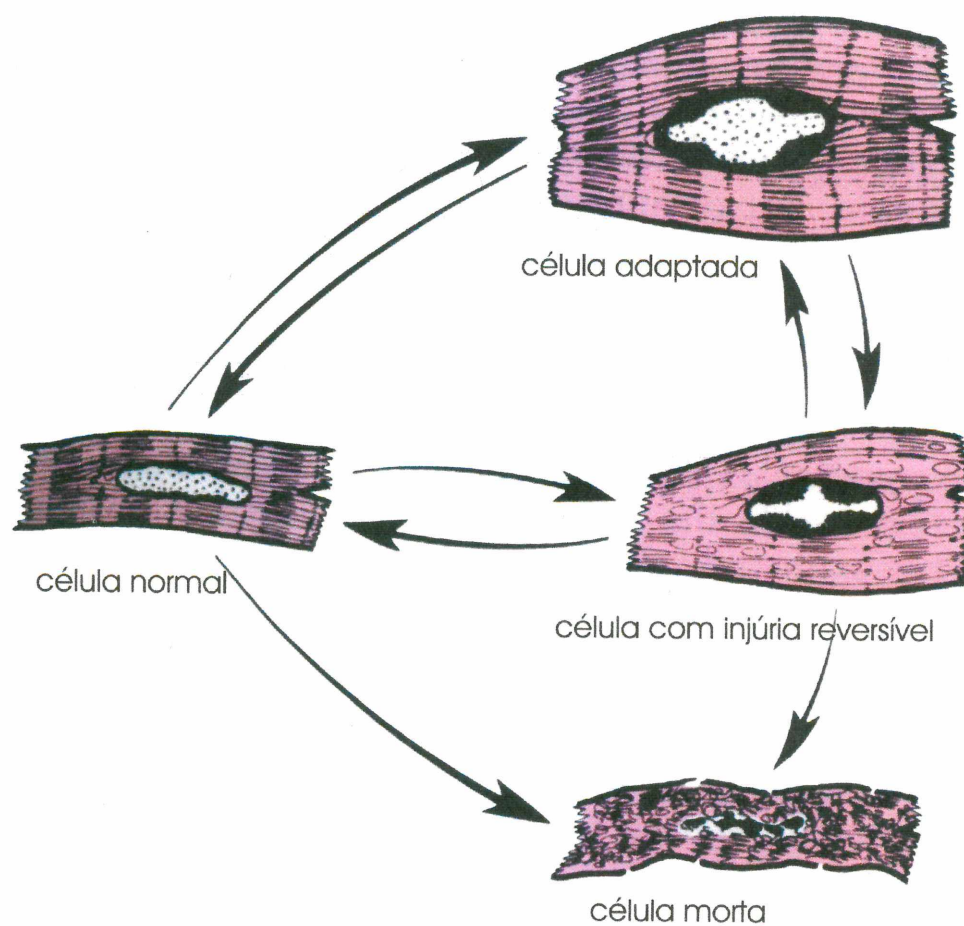


FIGURA 1 –INJÚRIAS SOFRIDAS PELAS CÉLULAS.¹³

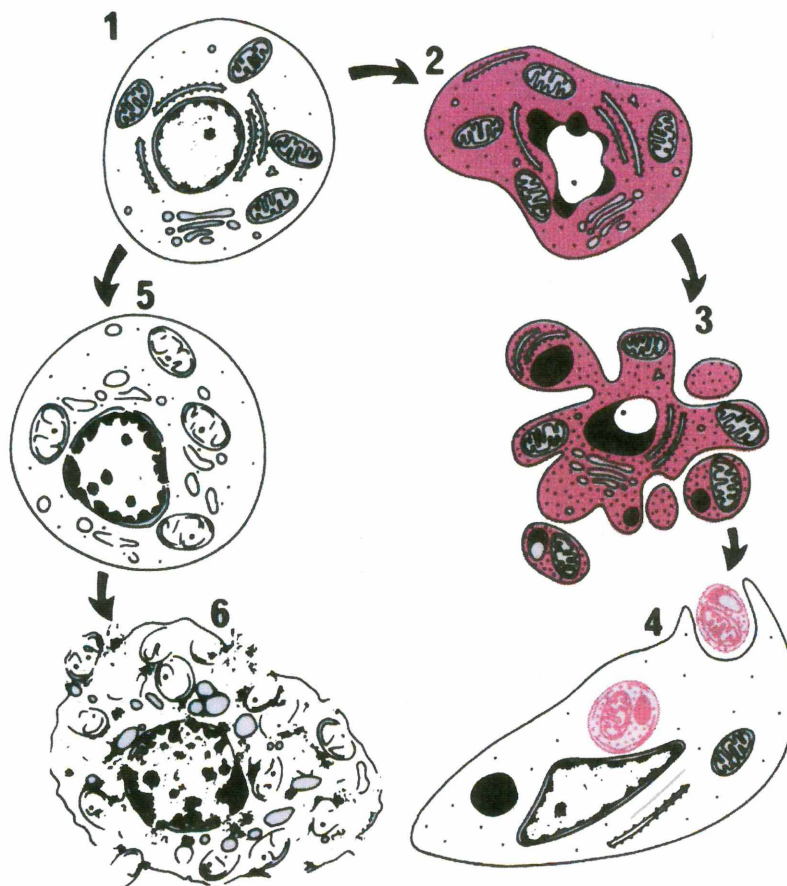


FIGURA 2 – APOPTOSE (1-2-3-4) E NECROSE (1-5-6).¹³

(1) Célula normal; (2) Compactação e segregação da cromatina; início da apoptose; (3) Formação de protuberâncias citoplasmáticas; (4) Fagocitose das protuberâncias citoplasmáticas. (5) Condensação da cromatina; (6) Ruptura de todas as organelas e membranas da célula: morte celular.

4.1 CAUSAS DAS INJÚRIAS CELULARES

As causas de injúria e morte celular vão desde uma simples agressão física, um acidente de automóvel até causas endógenas tais como carência de uma enzima vital, que prejudica então uma função metabólica normal.

A maior parte das influências adversas pode ser agrupada nas seguintes amplas categorias:

- a) hipóxia – A causa mais comum de hipóxia é a falta de suprimento sanguíneo (isquemia), a qual ocorre quando o fluxo arterial é impedido por arteriosclerose ou trombo. Outra causa é a inadequada oxigenação do sangue devido à características cardiorespiratórias. Com menos freqüência pode ocorrer a perda da capacidade do sangue em carrear o oxigênio como na anemia ou ainda nos envenenamentos com monóxido de carbono onde há a produção de um composto estável: a monoxihemoglobina, que bloqueia o caminho do oxigênio. Dependendo do estado hipóxico, as células podem se adaptar, sofrer injúria ou morrer;
- b) agentes físicos – Incluem traumas mecânicos, extremos de temperatura, súbitas mudanças na pressão atmosférica, radiação e choque elétrico;
- c) agentes químicos e drogas - É impossível organizar uma lista completa destes itens. Simples agentes químicos como glucose ou sais em concentrações hipertônicas podem causar injúrias na célula diretamente ou indiretamente, por perturbação da homeostase eletrolítica da células. O oxigênio em concentrações elevadas é severamente tóxico. Traço de substâncias dita *venenos* tais como o arsênico, amianto e sais de mercúrio, podem destruir número suficiente de células em minutos ou horas levando a morte celular;
- d) outras substâncias do meio ambiente como os poluentes do ar, os inseticidas, herbicidas, os resíduos industriais, estímulos sociais como o álcool e narcóticos e uma infinidade de outras drogas até mesmo terapêuticas;
- e) agentes infecciosos – Desde vírus e rickettsias submicroscópicos até as mais altas formas de parasitas;
- f) reações imunológicas – Embora o sistema imune sirva para a defesa contra agentes biológicos, as reações imunes podem causar injúrias, sendo exemplos destas as reações anafiláticas e as doenças autoimunes; ¹⁴

- g) desorganizações genéticas – A maioria dos erros inatos do metabolismo surgem a partir de anormalidades enzimáticas (geralmente a perda de uma enzima), são excelentes exemplos de danos celulares devido a alterações ao nível do DNA;
- h) causas nutricionais – Tanto deficiências quanto excessos, são importantes causas de injúrias.¹³

4.2 CÉLULAS NORMAIS

Durante o crescimento e desenvolvimento normais, um mecanismo preciso faz com que os diferentes órgãos atinjam um tamanho específico, o qual nunca deveria ser superado (normalmente não o é). Se um tecido é danificado, as células que sobreviveram começam a crescer e substituir as células lesadas, na maioria dos órgãos. Assim que o dano é reparado este processo pára, (o mecanismo de controle do crescimento normal persiste por toda a vida).

Embora a maioria das células no embrião tenha a capacidade de proliferar (aumentar em número), nem todas as células adultas mantêm estas características. Na maioria dos órgãos há células especiais de reserva ou células primitivas (*stem*) que são capazes de crescer em resposta a uma série de estímulos, e diferenciar-se em células específicas daquele órgão. Quanto mais diferenciada uma célula, como as células musculares ou nervosas, mais provável é que tenha perdido sua capacidade de crescer.

Do pouco que se sabe sobre o controle de crescimento, à primeira vista parece que há fatores estimulantes e inibidores que estariam normalmente em equilíbrio até que um estímulo de crescimento fosse requerido, seja para reparo ou porque trabalho adicional é exigido para um determinado órgão.³

Os tecidos do corpo podem ser divididos em quatro diferentes grupos:^{3,15,16}

- a) os de sustentação, em conjunto designados por mesênquima, as células específicas de um tecido. O mesênquima é constituído pelo tecido conjuntivo, pelos fibroblastos que produzem fibras colágenas e proteínas associadas, ossos, cartilagens, músculos, vasos sanguíneos e o sistema linfático. São células relativamente indiferenciadas, destinadas fundamentalmente a produzir outras células;
- b) as células epiteliais, que são as células específicas dos diferentes órgãos, por exemplo, a pele, o intestino, o fígado, as glândulas. São células derivadas do grupo

- c) anterior, com diferenciação funcional progressiva, capaz de se dividirem até que atinjam uma etapa terminal de seu desenvolvimento;
- d) o sistema reticuloendotelial, que consiste em um grupo amplo de células, a maioria delas derivadas de células precursoras na medula óssea, as quais dão origem a todas as células sanguíneas - glóbulos vermelhos e brancos – além disso, algumas destas células (linfócitos e macrófagos) encontram-se distribuídas por todo o organismo, tanto como células livres ou fazendo parte de certos órgãos, como fígado, ou ainda, constituindo-se em órgãos separados como o baço e os nódulos linfáticos. Estes últimos são nódulos de células linfáticas, distribuídos por todo o organismo, que atuam como filtros para células, bactérias e outros materiais estranhos. São células muito diferenciadas como as do fígado, rim e tireóide, que raramente se dividem, mas conservam o potencial para multiplicar-se em caso de necessidade;
- e) sistema nervoso, que se compõe do sistema nervoso central (encéfalo, medula espinhal e seus revestimentos) e do sistema nervoso periférico (nervos que conduzem até as estruturas centrais).

As células divisíveis parecem apresentar maior capacidade de reparar o DNA alterado. No entanto nas células cerebrais e nas fibras cardíacas, os danos são irrecuperáveis, pois elas não são substituídas. Assim cada tecido tem suas próprias células, normalmente de vários tipos diferentes, as quais mantêm a estrutura e função da cada tecido em particular.

4.3 CONTROLE DO CRESCIMENTO E O CICLO CELULAR

Injúrias, morte celular e deformações mecânicas do tecidos, podem estimular a proliferação celular; no entanto é claro, que a replicação celular é controlada largamente, por fatores químicos presentes no meio ambiente, os quais ou estimulam ou inibem a proliferação celular. Um excesso de estimuladores ou falta de inibidores leva a formação de um crescimento em rede e no caso do câncer, a um incontrolado crescimento. O crescimento pode ser executado pelo encurtamento do ciclo celular, e pela recuperação de células Go para o ciclo.

Com base na capacidade de proliferação e relação com o ciclo celular, são três os tipos de células:

- a) células que estão continuamente se dividindo, também chamadas células lábeis – células que seguem de uma mitose para outra, e continuam a proliferar por toda a vida, trocando as células que estão continuamente sendo destruídas (exemplo, células da superfície epitelial). A regeneração é derivada em sua maior parte nos tecidos a partir de células *stem*, que tem a capacidade ilimitada de proliferação e cujas células geradas podem sofrer várias correntes de diferenciação;
- b) células quiescentes ou estáveis – com baixo grau de replicação porém podendo sofrer rápida divisão em resposta a um estímulo sendo então capazes de reconstituir o tecido de origem. Elas são consideradas estar em Go podendo ser estimuladas para G1 (exemplos; células do parênquima, do mesênquima e do endotélio vascular).; células permanentes – células que deixaram o ciclo celular e não podem mais sofrer divisão (exemplo, células nervosas e do esqueleto e células do músculo cardíaco) (FIG. 3).
- c) em todas as células somáticas, o modo como as células aumentam em número, é semelhante e envolve o crescimento de todos os componentes celulares levando, eventualmente, à divisão da célula em duas novas células. Embora as mudanças estruturais que ocorrem sejam conhecidas há muitos anos, o conhecimento da base molecular de tal processo está longe de estar completo.

Quatro etapas são consideradas, em geral: (FIG.4)

- a) G_1 , é considerada uma pausa após uma estimulação onde nada parece estar acontecendo, embora haja alguma atividade bioquímica; S, é a fase de síntese, principalmente de DNA, para dobrar o seu conteúdo normal, além do aumento da quantidade de outros componentes;
- b) G_2 , corresponde a outra pausa;
- c) M, é onde ocorre a mitose, processo este no qual o núcleo rompe-se para formar cromossomos que se separam em dois grupos idênticos na célula normal, as membranas nucleares são refeitas em torno de cada grupo e a célula toda se divide, então, em duas células idênticas. As diferentes etapas do ciclo celular podem ser bloqueadas por drogas ou por agentes fisiológicos, ou ainda podem sair do ciclo de divisão, permanecendo numa fase de repouso conhecida por G_0 .^{17,18}

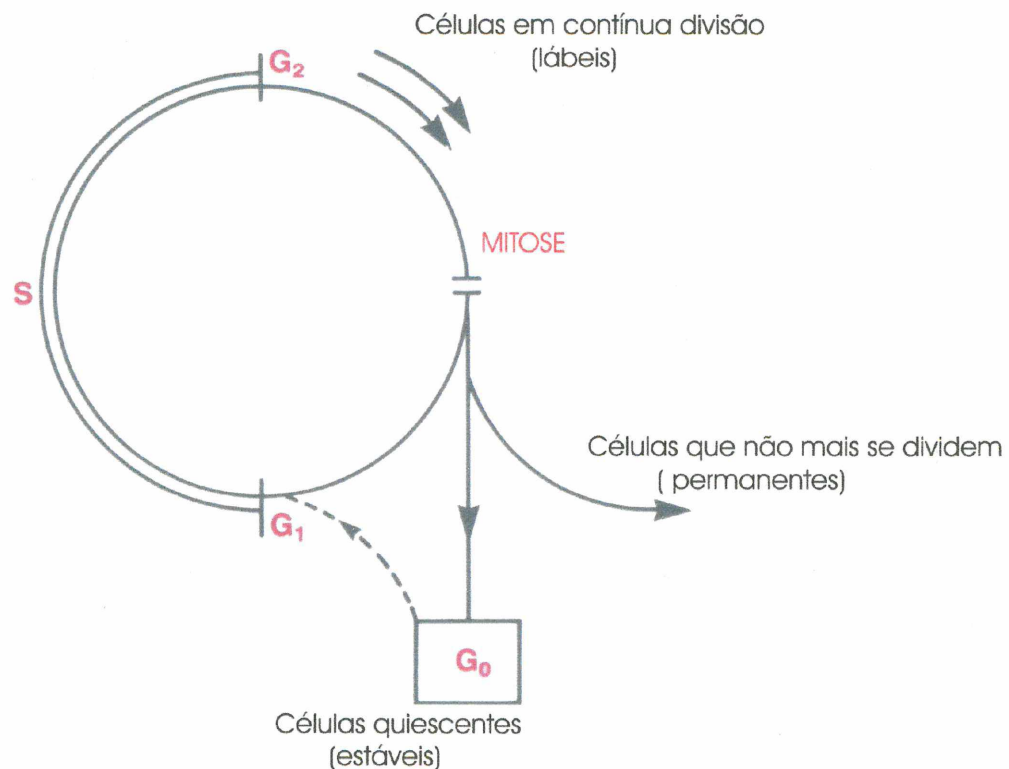


FIGURA 3- CICLO CELULAR E OS TIPOS DE CÉLULAS.¹³

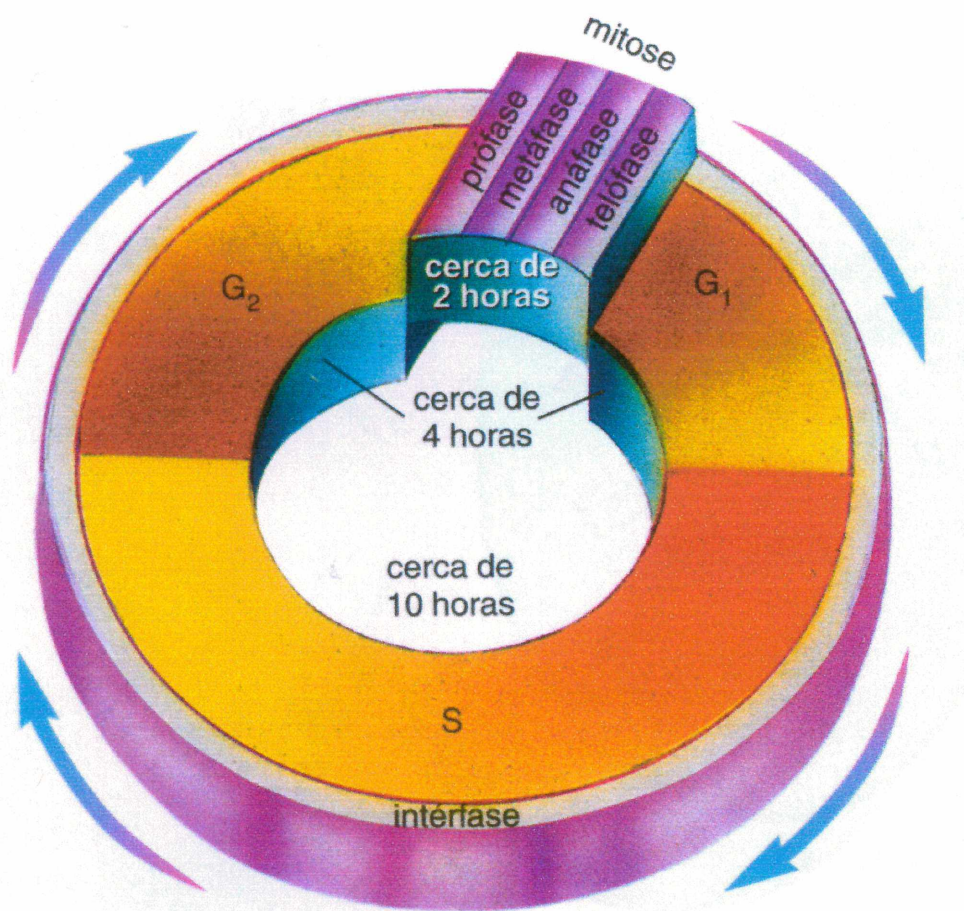


FIGURA 4 – DURAÇÃO RELATIVA DOS PERÍODOS DO CICLO CELULAR ¹⁹

4.3.1 Eventos moleculares no crescimento celular

Muitas substâncias químicas podem afetar o crescimento celular, e as mais importantes são fatores de crescimento polipeptídicos, presentes no soro ou produzidos por células e fatores de progressão.

É clara agora a evidência de que os eventos que levam a disparar uma divisão celular são mudanças na concentração e na atividade de um grupo de proteínas chamadas *ciclins*, as quais formam um complexo com a proteína quinase, chamado cdc2 ou p34^{cdc2}. Este complexo é responsável pela fosforilação de grande número de substratos protéicos envolvidos na replicação do DNA, mitose e outros eventos no ciclo celular. Níveis de ciclins G₁ estão aumentadas exatamente antes de entrar na fase S, e então o complexo ciclina-cdc2 G₁ dispara a replicação do DNA. Durante a fase G₂, genes de diferentes ciclins G₂ ou B são induzidos. O complexo ciclina-cdc2 G₂ é a quinase ativa que induz a mitose (um número de quinases e fosfatases contribuem para esta ativação). Em seguida as ciclins B ou G₂ são degradadas, e as células-filhas na presença de um estímulo reiniciam o ciclo novamente.

4.4. O MATERIAL GENÉTICO

A agressão contínua das células somáticas durante dias, meses e anos, por diferentes fatores, pode determinar mutações ou alterações ao acaso de alguns genes e como consequência, há acúmulo progressivo de alterações cromossômicas e, portanto, na síntese de várias moléculas protéicas.

As células e as substâncias intracelulares por elas secretadas constituem os elementos estruturais do corpo. A informação da célula reside em seu núcleo, na forma de um material polimérico, o ácido desoxirribonucleico ou DNA. A integridade deste DNA é essencial para o funcionamento apropriado das células, suas interações e, como consequência disto a saúde do organismo como um todo.

Em 1909, Johansen introduziu o termo *gen* para indicar as unidades de herança que se localizam nos cromossomos. Hoje se consideram os genes como unidades funcionais de herança e responsáveis pela formação de uma cadeia polipeptídica específica. A constituição química dos genes foi identificada em 1944, quando se verificou ser ele formado pelo ácido desoxirribonucleico.

Cada caráter específico de um organismo é codificado por um gene, a unidade da informação genética, que produz seu efeito ao especificar a produção de sua proteína correspondente. Os genes são longas fitas de DNA arranjados numa ordem bem determinada. O DNA está associado diretamente com um grupo de proteínas que também estão dispostas de forma ordenada e que servem como cunhas com a forma adequada para tornar helicoidais as fitas de DNA. A unidade estrutural é o nucleosoma que é constituído por um pequeno pedaço de DNA (cerca de duzentos pares de nucleotídeos) associado ao núcleo protéico das histonas. Os nucleosomas estão ligados um ao outro por pequenos pedaços de DNA (cerca de sessenta pares de bases) como contas de um rosário, que por sua vez estão organizados em estruturas enroladas ou superenroladas por associação com proteínas não histônicas. Os nucleosomas individuais são em si mesmos, pequenos demais para serem genes (acredita-se que um gene tenha, em média, cerca de mil pares de nucleotídeos) e atuam como sistemas empacotadores. Quando os genes estão ativos, isto é, sendo transcritos, o complexo proteína-DNA se abre, permitindo que o processo da expressão gênica ocorra. Alterações no comportamento celular podem ser decorrentes de transformações na estrutura do DNA - mutação - ou por perturbações nos mecanismos que controlam a expressão gênica.^{3,20,21}

O DNA é constituído por três componentes fundamentais: o açúcar, 2-desoxi-D ribose; o ácido fosfórico e bases nitrogenadas. Duas das bases são purínicas (adenina e guanina), e duas são pirimidínicas (timina e citosina).

A molécula do DNA é formada por duas cadeias espiraladas entrelaçadas formadas pela 2-desoxi-D-ribose e pelo ácido fosfórico alternadamente. Unidas ao açúcar estão as bases nitrogenadas, estando as duas espirais unidas por pontes de hidrogênio localizadas entre as bases (FIG. 5).

Os sinais da mensagem-código com instruções para a síntese protéica são dadas pelas quatro bases nitrogenadas que se encontram sempre em grupos sequenciais de três. Existe, portanto, a possibilidade de grande número de combinações, sendo que cada uma delas corresponde a uma mensagem-código para que determinado aminoácido, dos vinte que são utilizados na síntese protéica, faça parte da molécula protéica. O gene, ou seja, a molécula de DNA, apresenta a seqüência de bases que especifica a seqüência de aminoácidos que farão parte da cadeia polipeptídica de uma determinada proteína. Admite-se que a quantidade de DNA do núcleo de cada célula humana é suficiente para formar centenas de milhares de genes e, portanto, para determinar a formação de igual número de cadeias polipeptídicas.

Todas as células de um ser vivo têm DNA idêntico, subentendendo-se que toda célula é capaz de fabricar todas as proteínas do organismo. No entanto, uma determinada célula produz somente as proteínas adequadas para exercer suas funções.^{1,20}

A informação genética contida no DNA é transcrita do núcleo celular para uma molécula, sintetizada a partir do DNA por ação da enzima RNA polimerase; o ácido ribonucléico (RNA). O RNA difere do DNA por três aspectos: é formado por uma só cadeia, o açúcar é a D-ribose e a base pirimidínica uracila substitui a timina.

Este RNA, denominado mensageiro (RNAm), tem uma seqüência de bases complementar àquela do DNA do qual ele é transcrito. Assim, cada adenina do DNA vai ser substituída pela uracila no RNA, cada citosina do DNA corresponde à guanina no RNA, a timina é substituída pela adenina e cada guanina pela citosina.

O RNA passa ao citoplasma, onde se associa aos ribossomos: organelas responsáveis pela síntese protéica. Cada um dos vinte aminoácidos precursores das proteínas está no citoplasma unido a uma molécula do RNA de transporte (RNAt), que é constituído por três bases nitrogenadas complementares às de uma pequena faixa do RNAm. Esses RNAt (FIG. 6), com seus respectivos aminoácidos, alinham-se ao longo da molécula de RNAm na ordem determinada pela seqüência de bases ou códigos deste RNAm.

Esta fase ocorre nos ribossomos, onde há o RNA ribossômico (RNAr) responsável, provavelmente, pela decifração do ácido do RNAm, favorecendo acoplamento sequencial dos RNAt e, portanto, dos aminoácidos correspondentes. A seguir, sob a ação de diversas enzimas, unem-se os aminoácidos e a proteína final é liberada do ribossomo.

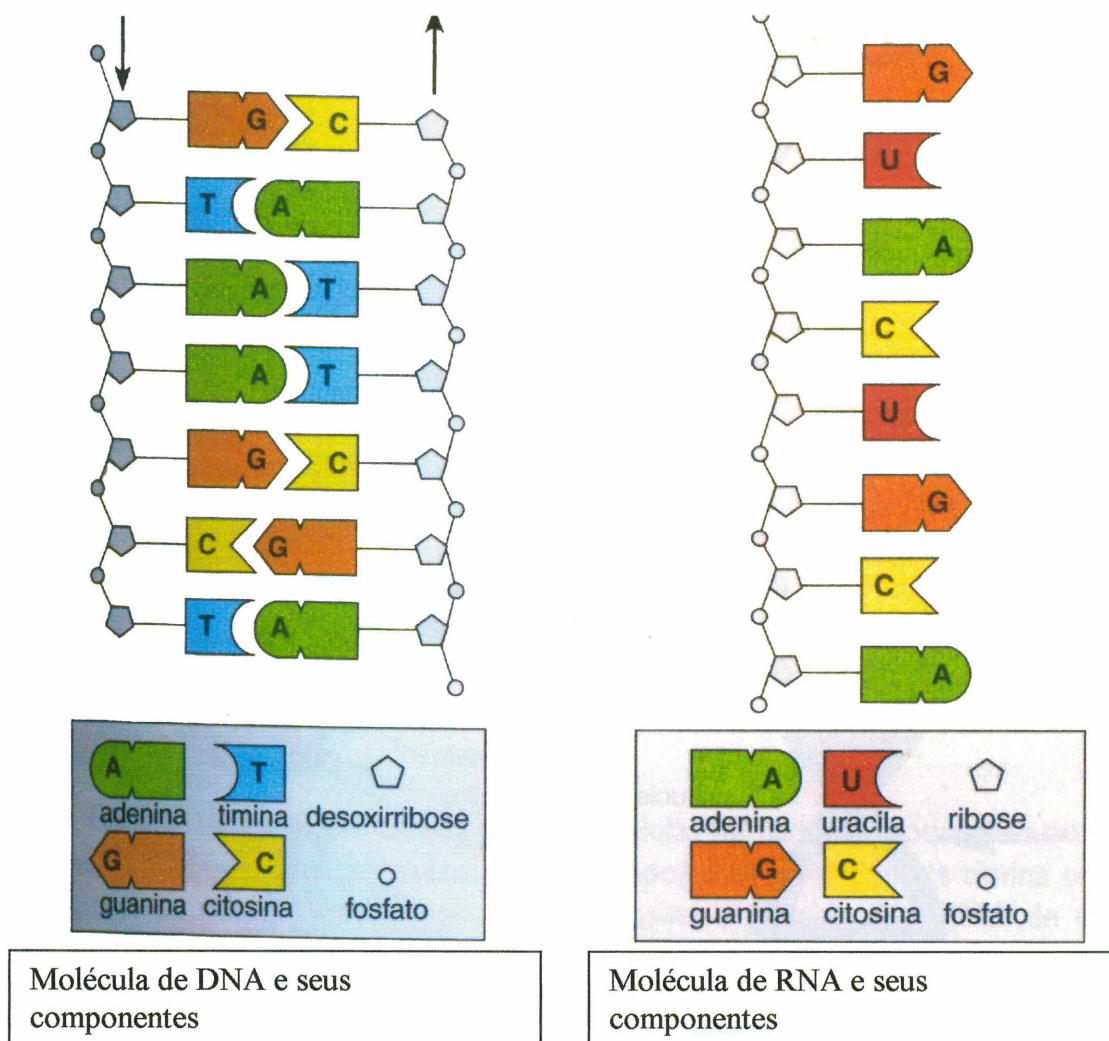


FIGURA 5 – ESTRUTURAS DO DNA E DO RNA. ¹⁹

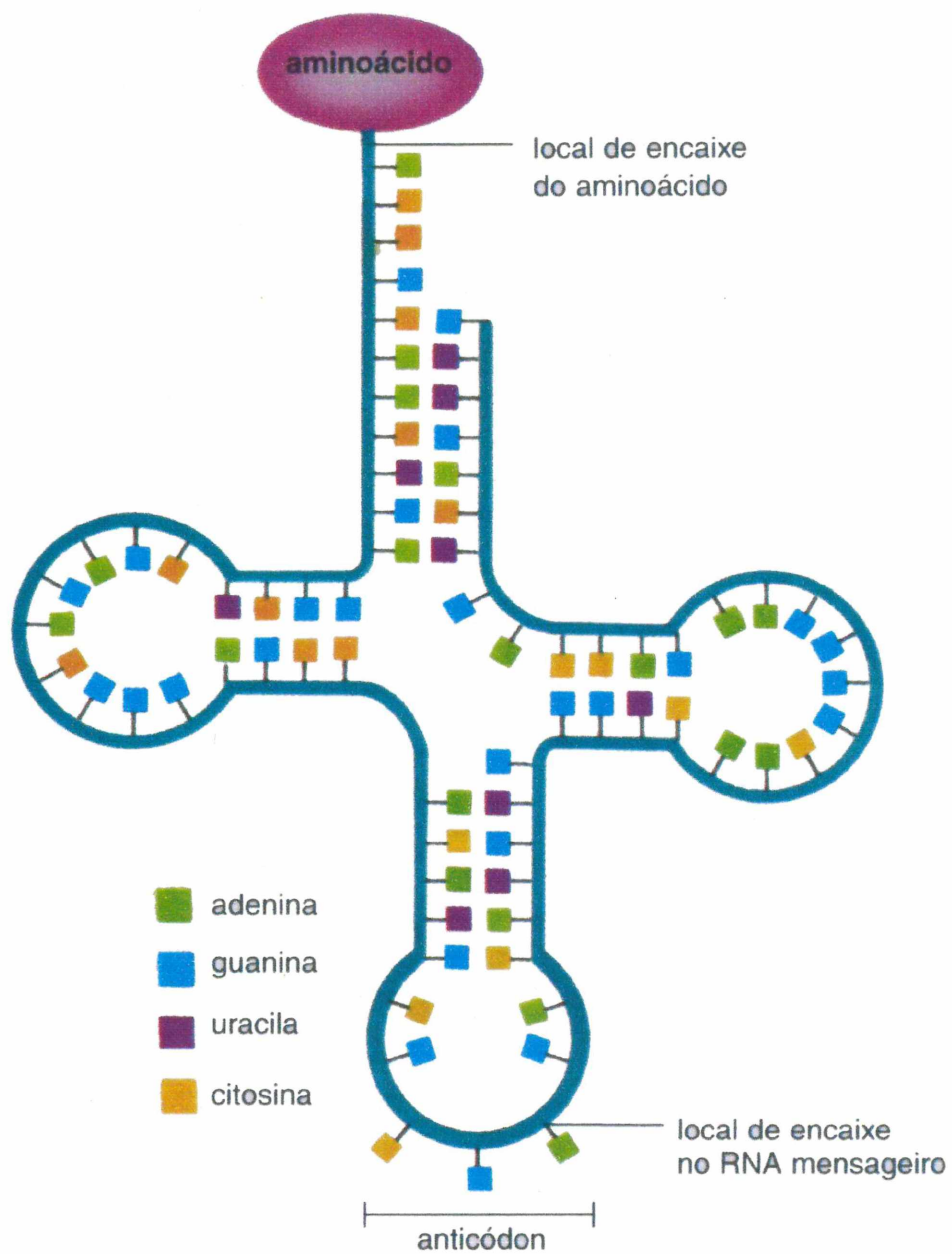


FIGURA 6 – ESTRUTURA DO RNA TRANSPORTADOR. ¹⁹

4.5 CÉLULAS CANCEROSAS

Não é possível definir uma célula cancerosa em termos absolutos. Os tumores são normalmente reconhecidos pelo fato de que as suas células apresentam crescimento anormal. Uma definição razoável é de que a célula tumoral difere da normal por não mais responder aos mecanismos de controle de crescimento normais. Uma vez que há muitos fatores envolvidos neste processo, a célula alterada poderá continuar respondendo a alguns deles, mas não a outros. Uma complicação adicional é de que algumas células tumorais, especialmente logo após terem sido transformadas, cessam o seu crescimento.³

Os tumores podem ser classificados em três categorias:

- a) tumores benignos - Podem se originar em qualquer tecido, crescer localizadamente e podem causar dano por pressão local ou por obstrução. A característica comum entre eles e não se espalhar para sítios distantes;
- b) *tumores in situ* - Normalmente se desenvolvem no epitélio e são freqüentemente, mas não invariavelmente pequenos. As células se assemelham morfológicamente as células tumorais, mas se restringem à camada epitelial. Elas não invadem a membrana basal e o mesênquima subjacente. Embora teoricamente estes tumores possam se desenvolver nos tecidos mesenquimais, reticuloendoteliais ou nervosos, ainda não se tem relatado tais fatos;
- c) cânceres - São tumores completamente desenvolvidos (malignos), que têm a capacidade especificamente de invadir e destruir o mesênquima subjacente - invasão local. As células tumorais necessitam de nutrientes que são fornecidos nos tecidos normais através da corrente sanguínea. Já se demonstrou que algumas células tumorais produzem uma substância o fator de angiogênese tumoral (TAF) que estimula o crescimento de vasos sanguíneos através do tumor, garantindo, assim, o seu crescimento contínuo. Os novos vasos não são muito bem formados e são facilmente lesados, o que permite à célula tumoral penetrá-los, assim como a vasos linfáticos. Fragmentos de tecido tumoral podem ser transportados nestes vasos para os linfonodos loco-regionais ou órgãos distantes, onde podem produzir tumores secundários (metástases). Os cânceres podem se desenvolver em qualquer tecido. Embora possa haver uma progressão de benigno para maligno, isto está longe de ser invariável. Muitos tumores benignos nunca se tornam malignos.^{3,17}

4.5.1 Carcinogênese

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas. A aplicação de um agente causador de câncer (carcinógeno) não leva ao imediato aparecimento do tumor. Existe uma série de mudanças após a etapa de iniciação induzida pelo carcinógeno. As etapas subsequentes - promoção tumoral - podem ser produzidas pelo carcinógeno ou por outras substâncias (agentes promotores) os quais, isoladamente, não causam o aparecimento de tumores. A iniciação, que é o primeiro passo essencial no processo, é muito rápida, mas uma vez que a mudança inicial teve lugar, as células iniciadas podem persistir por tempo considerável, até mesmo toda a vida de um indivíduo. O local mais provável de ocorrência do primeiro evento é o material genético (DNA), embora haja outras possibilidades. Acredita-se que o carcinógeno modifique ou destrua genes específicos provavelmente no DNA das células de linhagem primitiva (*stem*) do tecido envolvido.

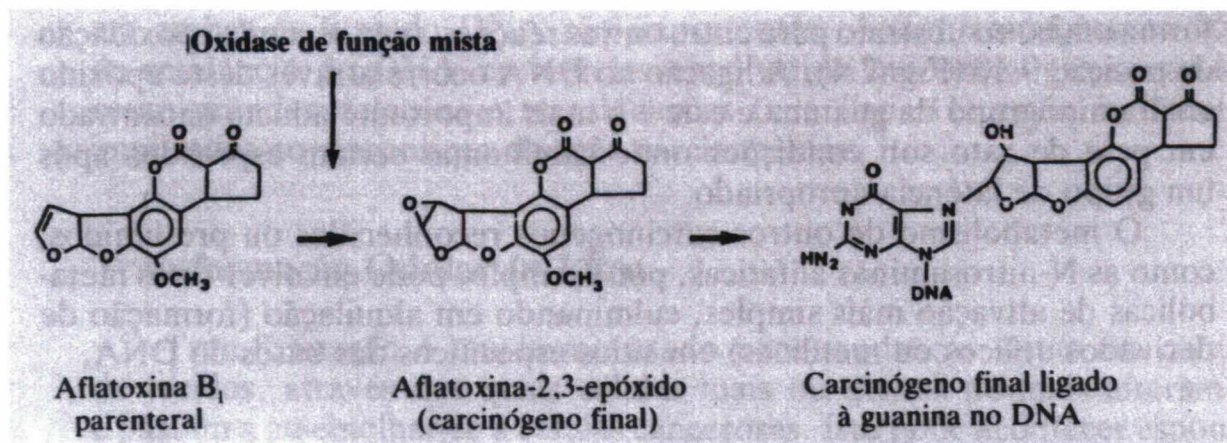


FIGURA 7 – AÇÃO CARCINOGENICA SOBRE O DNA – AFLATOXINA. ³

NOTA: diagrama mostrando a estrutura molecular da micotoxina carcinógena aflatoxina B₁, e a formação do metabólito principal que se liga ao DNA).

As células iniciadas permanecem latentes até que sobre elas atuem os agentes promotores. Muitas dessas células "transformadas" nunca crescerão ou o farão muito lentamente. Agentes promotores não são carcinogênicos e si mesmos, mas induzem a divisão celular num tecido iniciado. Muitos agentes são indutores de divisão celular, mas somente os promotores provocarão desenvolvimento tumoral, de forma que embora o crescimento celular seja necessário para o desenvolvimento do tumor, outros fatores deverão também estar envolvidos. É possível que os agentes promotores interfiram no processo de diferenciação, que normalmente ocorre quando as células passam da população das células em divisão para células funcionantes e que normalmente não mais se dividem. Embora estes estímulos promotores do crescimento estejam agindo nas células, eles ainda não são sensíveis aos fatores de inibição do crescimento no corpo, de modo que o resultado final depende do balanço entre os fatores e a extensão das mudanças ocorridas nas células diferenciadas. A seqüência completa de eventos no processo de formação tumoral é quase que certamente a consequência de mudanças gênicas, embora a expressão de genes possa ser influenciada pelo hospedeiro.³

Há muita especulação em torno da questão sobre se, a iniciação, progressão e manutenção de alguns tumores, dependem da expressão aumentada através de amplificação gênica (um aumento no número de cópias de um determinado gene), ou expressão inadequada (isto é, deslocada no tempo) de genes normais, ou ainda se mutações em regiões críticas de um gene são necessárias. Uma hipótese plausível é de que a mutação deve ser necessária para o evento de iniciação, mas que alguns ou mesmo todos os estágios posteriores devam depender da expressão gênica inadequada ou aumentada. Outra área importante, mas ainda inexplicada, diz respeito à escala de tempo da carcinogênese. O período de latência entre a iniciação e o aparecimento de tumores é um dos aspectos menos compreendidos do desenvolvimento tumoral.

4.5.2 Mutações

Mutações somáticas são inevitáveis. A chance de uma simples célula passar por várias mutações independentes é desprezível. Várias décadas atrás, estudos do câncer em relação a idade, sugeriram que uma taxa entre 6 a 7 mutações sucessivas são necessárias para converter uma célula normal em um carcinoma invasivo. O caminho para tornar esta série de sucessivas mutações mais provável talvez se explique através da combinação de dois mecanismos:

- algumas mutações aumentam a proliferação de células, criando uma grande população de células alvo para uma próxima mutação.
- algumas mutações afetam a estabilidade do genoma por inteiro, aumentando a taxa total de mutações.

Câncer pode ser o resultado de uma seleção natural entre as células somáticas.

Durante bilhões de anos de evolução os organismos multicelulares desenvolveram vários e sofisticados mecanismos de defesa e controle, e quando o câncer aparece é porque provavelmente alguns destes controles tenham se perdido.

Entre os mais altos níveis de controle, está o mecanismo pelo qual as células cancerosas potencialmente cometem suicídio, através de uma morte programada chamada apoptose. As células cancerosas sobreviventes devem ter desenvolvido caminhos para inativar ou passar por este mecanismo sem sofrer sua ação.²²

Recentes estudos têm identificado três grupos de genes os quais são freqüentemente mutados no câncer:

- a) oncogenes - estes são genes cuja ação promove a proliferação das células. A versão não mutante é chamada protooncogene, e a mutante seria uma versão excessivamente ou inapropriadamente ativada deste gene. Somente um alelo mutante pode afetar todo o fenótipo da célula;
- b) gene tumor supressor - (TS genes) - produz inibição da proliferação das células. A versão mutante em células cancerosas teria perdido esta função. Ambos os alelos deste gene devem ser inativados para haver mudança no comportamento da célula;
- c) genes com tendência a sofrer mutações - estes genes são responsáveis pela manutenção da integridade do genoma e a fidelidade da transferência da informação, se perderem sua função em ambos os alelos, promovem sérios erros na população de células.^{3,17,18}

4.5.3 Carcinógenos

Um suporte considerável às evidências obtidas com estudos epidemiológicos surgiu quando pesquisadores japoneses demonstraram pela primeira vez no início do século, que um certo número de carcinógenos potentes causa câncer quando aplicado à pele de coelhos. Subseqüentemente, muitos outros compostos químicos, presumivelmente carcinógenos, foram demonstrados como tais por técnicas similares.

Hoje em dia, a maior parte dos fármacos e aditivos alimentares tem sua toxicidade e carcinogenicidade a longo termo, testadas em animais de laboratório, em geral roedores.

Muitas substâncias foram demonstradas como produtoras de tumor em animais experimentais. Algumas produzem tumores no sítio de aplicação, ou seja, a pele.

Outras podem produzir tumores no sítio de absorção, por exemplo, o intestino se a administração for oral, ou no sítio de metabolismo, por exemplo, o fígado ou no órgão excretor como o rim e bexiga. Em alguns casos, o carcinógeno pode produzir tumores em um órgão completamente inesperado.

Há um período crítico de sensibilidade que depende do estado hormonal da célula. Fatores complexos similares podem operar em outros tecidos, de maneira que a exposição ao carcinógeno é necessária, mas não suficiente para a indução do câncer nestes casos. Administração intensiva a longo termo por várias vias é essencial desde que efeitos carcinogênicos e efeitos possivelmente tóxicos possam ser discriminados.

A água em nosso meio é muito poluída e rica em cobre, chumbo e alumínio, e estes metais tóxicos inibem a ação de enzimas destruidoras de RL e agravam o quadro de estresse oxidativo. Também aditivos e pesticidas podem agravar este último, em virtude de serem metabolizados pela citocromo P-450.

O exercício físico bem dosado tem inúmeras vantagens para o organismo: provoca aumento de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e a ceruplasmina. Isto torna o indivíduo que se exercita com maior capacidade antioxidante. {Povoa-Filho, 1995 #17

Investigações de epidemiologistas mostrando um decréscimo da morbidade com a prática de exercícios físicos regulares se comparados a uma vida sedentária são analisados neste estudo. {Poulsen, 1999 #26} Se concluiu que exercícios extenuantes de longa duração e extremos poderiam levar à oxidação celular de macromoléculas. Oxidações nas bases do DNA, especialmente a 8-hidroilação da guanina é mutagênica, e têm sido implicada numa variedade de doenças tais como envelhecimento e câncer. Durante o exercício físico, parece

haver uma mudança na dependência dos antioxidantes da dieta, com Vitamina C e Vitamina E, a partir do músculo para o plasma.

Em testes clínicos, no entanto, a suplementação com antioxidantes, não se mostrou capaz de aumentar a performance dos exercícios, entretanto uma nutrição balanceada com antioxidantes em conjunto com uma possível suplementação poderia ser importantes na prevenção de doenças a longo tempo.

A relação entre a quantidade ideal de exercício e saúde, existe, e requer mais estudos a fim de se estabelecer os níveis aceitáveis que não causem modificações oxidativas no DNA.

As partículas do ar podem também ser genotóxicas às células alveolares (danos ao DNA) e causar apoptose, por mecanismos induzidos pelos radicais livres.²³

Investigação sobre a geração de radicais livres pela fumaça do cigarro (através da reação de Fe com H_2O_2), mostra resultados capazes de causar danos às células e ao DNA, e capazes de agir como agentes fibrogênicos.

A fumaça do cigarro foi capaz de causar peroxidação lipídica, causar a ativação nuclear do fator de transição NF Kappa-B e aumentar a liberação de TNF-alfa das células (macrófagos).²⁴

O fumo e várias drogas quimioterápicas, são grandes formadoras de RL, sendo que o primeiro além disto, têm a capacidade de mobilizar polimorfonucleares, que têm alta capacidade fagocítica, formando localmente RL.

Os carcinógenos externos representam grandes fatores no desenvolvimento do câncer. Em especial, o câncer de mama, possui evidências epidemiológicas ligando a injeção de álcool ao alto risco de este câncer aparecer.

Existem trabalhos explorando a possibilidade do álcool ser ativado até a forma cancerígena- acetaldeído- e radicais livres através da ação da enzima xantina - desidrogenase, xantina - oxidase e/ou aldeído oxidase

Nestes mesmos trabalhos supõe-se que isto deva ocorrer também nos casos de consumo exagerado de alimentos ricos em purina (como a carne) e bebidas contendo cafeína. Co-substratos como xantina, cafeína, teobromina e teofilina, tornam mais acentuada a biotransformação do etanol a acetaldeído.²⁵

O álcool é pró-oxidante no sentido de que é oxidado pela aldeído oxidase (enzima formadora de RL), assim como pela citocromo P-450. Esta via microsossomial consiste em várias enzimas que atuam metabolizando produtos tóxicos como o álcool.

O organismo consegue se livrar destes produtos tóxicos, mas tem que pagar um alto preço para isto; a metabolização via citocromo P-450 forma abundantemente RL levando ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo no estômago num processo de intoxicação aguda por etanol é verificado em outro trabalho.²⁶ O etanol aumenta a produção do ânion superóxido e radical hidroxil e a lipídeo-peroxidação na mucosa gástrica.

Vários mecanismos de defesa da mucosa protegem o estômago e o duodeno de agentes nocivos, pela propriedade de varredura destes radicais livres, evitando o processo oxidativo. Num processo de intoxicação agudo, há indução do estresse oxidativo, danos ao DNA, aumento dos níveis da atividade da xantina - oxidase e malondialdeído e diminuição do conteúdo de glutathione nas células da mucosa gástrica.

Antioxidantes intracelulares tais como o glutathione e tocoferol, protegem a mucosa gástrica deste estresse oxidativo, mas quando o sistema antioxidante é insuficiente, os radicais livres são acumulados, causando danos oxidativos na membrana da célula e morte ou sucessivas injúrias.

Os antioxidantes agem como varredores de radicais, inibindo a peroxidação dos lipídeos e processos mediados por radicais livres, e então eles protegem o corpo humano de várias doenças atribuídas a reações de radicais.

Os mecanismos de defesa da mucosa gastrointestinal contra fatores agressivos consta principalmente de fatores humorais e neurais. Entre os primeiros estão a secreção de mucus alcalino, microcirculação mucosal e mobilidade. Entre os segundos; a ação da prostaglandina e do ácido nítrico.

Em anos recentes, fatores adicionais têm sido adicionados a esta tarefa de proteção a nível intracelular, cabendo às proteínas este papel.²⁶ Redução da desnaturação induzida pelo estresse e agregação de proteínas intracelulares. A ação citoprotetora das proteínas é exercida pela proteção da mitocôndria e pela interferência no programa de apoptose induzido pelo estresse.

A exposição ao etanol induz ao estresse oxidativo, o qual pode contribuir para o decréscimo da liberação de óxido nítrico devido a este ser desviado e utilizado na função de varredor de radicais livres.

Este estresse intracelular produz permeabilidade da mitocôndria e despolarização, fenômenos os quais precedem a morte das células na mucosa gástrica.²⁶ O etanol aumenta a produção dos ânions superóxido e radical hidroxila e também a peroxidação lipídica na mucosa gástrica (FIG.8).

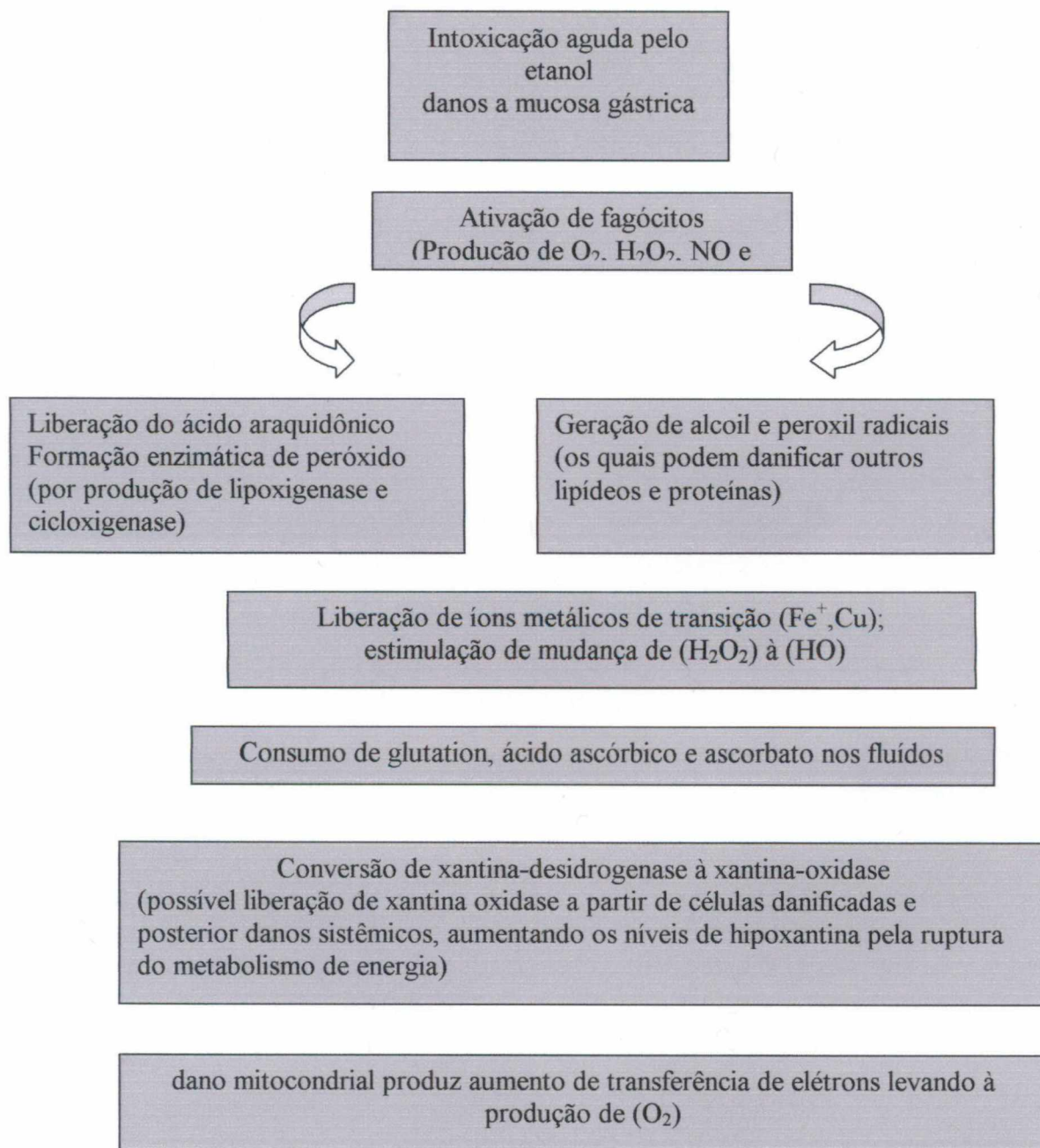


FIGURA 8– INTOXICAÇÃO PELO ÁLCOOL NA MUCOSA GÁSTRICA.²⁶

A nutrição talvez seja o fator primordial na gênese dos RL.²⁷

Enquanto uma dieta muito rica em antioxidantes (cereais integrais, verduras e legumes) é altamente benéfica, a dieta rica em gordura é altamente lesiva para o organismo, já que é muito pró-oxidante (formadora de RL). Isto ocorre na ingestão exagerada de carne gorda, que combina dois fatores de risco: a riqueza em ferro (formando HO[•] no intestino) e gordura.¹²

Se o câncer pode ser ocasionado, parcial ou totalmente por mutações no DNA induzidas por carcinógenos químicos, as poderosas técnicas da biologia molecular moderna podem ser usadas para detectar diferenças entre os DNA dos tecidos normal e tumoral pertencentes a um mesmo indivíduo com câncer.

Outros agentes não químicos podem ocasionar mutações. Irradiação pode danificar o DNA humano e alguns vírus.^{3,9,13} também podem ser mutagênicos quando integrados no DNA da célula hospedeira. Até o fim dos anos sessenta, alguns dos mais potentes carcinógenos, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, eram incapazes de mutar células em cultura. Sabemos agora que isto se dá porque muitos carcinógenos necessitam ser metabolizados por enzimas celulares até derivados reativos, antes de se tornarem efetivos, e os testes celulares usados até então eram deficientes em uma ou mais funções metabólicas e incapazes de ativar o carcinógeno.

Da mesma maneira, estes compostos além de muitos outros, precisam ser metabolizados a derivados eletrofilicos antes de se tornarem carcinogênicos.

Em animais, o metabolismo usualmente acontece na célula-alvo da qual o câncer se desenvolve; muitos metabólitos reativos têm meia-vida curta quando em solução nos fluídos corpóreos.

A capacidade de metabolismo é geneticamente determinada e pode ser específica. A maior parte dos carcinógenos humanos conhecidos e muitos compostos químicos produzirão tumores em animais experimentais sob condições apropriadas, embora algumas vezes muito artificiais.

De fato, a lei requer que qualquer novo composto químico a ser introduzido para uso humano (remédios, cosméticos, aditivos alimentares, pesticidas, fertilizantes agrícolas, produtos de limpeza doméstica), deva ser testado em animais de laboratório para verificação do seu efeito a longo termo. Isto significa um custo enorme em tempo e gasto de equipamento, portanto é vital que os testes sejam cuidadosamente planejados e informativos. Requer-se o conhecimento das vias de metabolismo dos compostos e da maneira como são

excretados em diferentes espécies e se estas características são apropriadas para situações humanas.

Admite-se que cânceres humanos levem muitos anos para se desenvolver após o evento inicial na célula-alvo suscetível. Isto pode levar de dez anos até o tempo de vida total do indivíduo. Só este fato coloca um problema muito sério para o pesquisador que deseja confirmar a ausência de risco de um composto químico potencialmente útil.⁸

Grande número de diferentes testes de varredura rápido foi lançado nos últimos anos como indicadores potencialmente úteis da atividade carcinogênica. Após uma série de testes comparativos, as autoridades de vários países concluíram quais seriam os tipos de evidência aceitáveis. É necessário que o composto seja testado em ensaios medindo mutação (tanto em bactérias como em células de mamíferos em cultura) e em sua capacidade de ocasionar quebras cromossômicas, tanto *in vivo* (no animal) como *in vitro* (em cultura celular). Os resultados de uma bateria de aproximadamente quatro testes de seleção rápidos escolhidos dentre estas categorias deveriam, se os resultados forem inequívocos, fornecer informações sobre a carcinogenicidade potencial de um composto químico as quais seriam aceitas pelas autoridades de vigilância sanitária em substituição aos dados de longo termo em animais. Dos testes rápidos para carcinógenos químicos, o mais conhecido e com amplas publicações tem o nome do seu criador, Bruce Ames.¹⁷

Transformação é um termo usado para mudanças vistas em cultura de tecidos, através das quais células mais ou menos normais alteram-se e passam a assemelhar-se a células cancerosas. Isto pode acontecer espontaneamente, embora seja este um evento raro e cuja frequência depende de uma certa variedade de fatores e da espécie.^{2,8,17}

4.6 SISTEMA REPARADOR DO DNA

Após haver lesão no DNA, os mecanismos pelos quais a célula detecta e repara tal lesão de forma que a sequência de bases do DNA seja restaurada fielmente, existem com certeza em bactérias, e muito se conhece das enzimas envolvidas no reconhecimento, remoção e reparo da danificação induzida pelo carcinógeno.

Conhece-se muito menos nas células de mamíferos, mas sabe-se que reparo do DNA ineficiente ou incompleto (com tendência a erro) é importante em alguns tipos de câncer.²⁸

A habilidade do corpo para substituir células injuriadas ou mortas é crítica para a sobrevivência. Na verdade uma variedade de agentes injuriantes ao mesmo tempo em que provocam danos dentro da célula, coloca em movimento uma série de eventos não somente para conter os danos mas também para preparar para a replicação das células injuriadas, a fim de repor as células mortas.

A resposta ao agente injuriante pode ser de proteção às proteínas intracelulares, ou de iniciação da apoptose, podendo deletar células que levam a danos do DNA. O estímulo do agente injuriante, também dispara a ativação de genes como *c-fos*, *c-jun* e *c-myc* que estão envolvidos na replicação.

A resposta dos tecidos envolve dois processos:

- a) regeneração - troca das células injuriadas por outras do mesmo tipo, muitas vezes sem deixar nenhum traço residual da injúria prévia;
- b) substituição por tecido conectivo ou fibroplasia – deixa uma cicatriz permanente;

Na maioria dos casos, ambos os processos contribuem para a reparação. Além disto, os dois processos são determinados essencialmente por mecanismos similares que envolvem, migração celular, proliferação e diferenciação, assim como interações com a matriz celular.¹³

A maior parte dos carcinógenos necessita de ativação metabólica para ser convertido ao carcinógeno final que se liga ao DNA, modificando bases acessíveis de uma maneira específica, através do genoma em um nível que depende da dose e da quantidade de ativação metabólica. Parece que tanto pequenos erros no reparo das injúrias ou, em uma maior escala, quebras cromossômicas completas, talvez devido às lesões próximas em ambas as fitas de DNA, são importantes. Assim, mutações ao nível de sequenciais do DNA ou aquelas envolvendo mudanças grosseiras tais como grandes deleções e translocações, estão fortemente implicadas no mecanismo da ação carcinogênica.^{16,18,21,29}

Um número de mutações intrínsecas e extrínsecas induzem a danos estruturais no DNA celular e acredita-se ser isto a origem da letalidade da célula, da degeneração dos tecidos, do envelhecimento e do câncer.⁶

Em reação a estes efeitos deletérios que levam a instabilidade do genoma (e para neutralizá-los), as células vivas possuem mecanismos de reparação.

Um estudo sobre o sistema de reparo foi realizado em células lesionadas por radiações ionizantes (via radicais livres), e o caminho foi a remoção das bases oxidadas, iniciando-se pela ação da enzima DNA-glucosilase, a qual retira a base modificada por hidrólise da ligação glicosídica entre a base e a desoxiribose do DNA, gerando uma base livre e um sítio em base, o qual por sua vez será reparado.³⁰

4.7 RADICAIS LIVRES

Entende-se por radical livre, qualquer espécie química com número ímpar de elétrons na sua camada externa. Quando dois elétrons ocupam o mesmo orbital, dizemos que eles estão "pareados" e, quando o elétron está sozinho, dizemos que ele está "não pareado". Assim, esta estrutura com elétron, "não pareado" recebe o nome de radical livre (RL). Quando ocorre este "não pareamento", há uma instabilidade molecular, fazendo com que esta estrutura procure "roubar" um elétron, se estabilizando, mas criando um novo radical livre numa verdadeira reação em cascata. Esta necessidade de estabilização torna o radical "não pareado" extremamente reativo, entrando em reação com substâncias químicas orgânicas e inorgânicas em locais específicos das proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos. Combina-se com moléculas próximas principalmente aminoácidos contendo grupo sulfidril e ácidos graxos insaturados, formando uma esteira de radicais livres. Os RL iniciam uma reação autocatalítica, dando como consequência uma propagação de danos, em cadeia.¹² As reações continuam até que dois radicais livres se unam com os elétrons ímpares, formando pares, ou até encontrarem uma substância que possa absorver o elétron livre, sem se tornar radical livre. A duração do radical livre é efêmera, alguns microsegundos, e as evidências de sua existência até agora são indiretas.

O oxigênio constitui-se a principal fonte de radicais livres. Apesar de a molécula de oxigênio ter número par de elétrons, ela funciona como dois radicais livres aderidos, ou seja, um "bi-radical", e seria atraída pelos locais das moléculas onde a insaturação e outras forças, tendem a separar os pares de elétrons.^{1,31}



FIGURA 9 – RADICAL OXIGÊNIO

Normalmente uma fração de cerca de 95% do oxigênio é metabolizado até água, via cadeia eletrônica (NAD ou DADP, flavoproteínas, citocromos e citocromo oxidase). A atmosfera de oxigênio intracelular permite que haja uma inadvertida formação de espécies parcialmente reduzidas do oxigênio, as quais são tóxicas. As três mais importantes espécies deste tipo são peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-) e íons hidroxil ($OH^\cdot$). Estes podem ser produzidos pela atividade de uma série de enzimas oxidativas, em diferentes locais da célula como o citosol, a mitocôndria, os lisossomos, os peroxissomos e membrana plasmática.

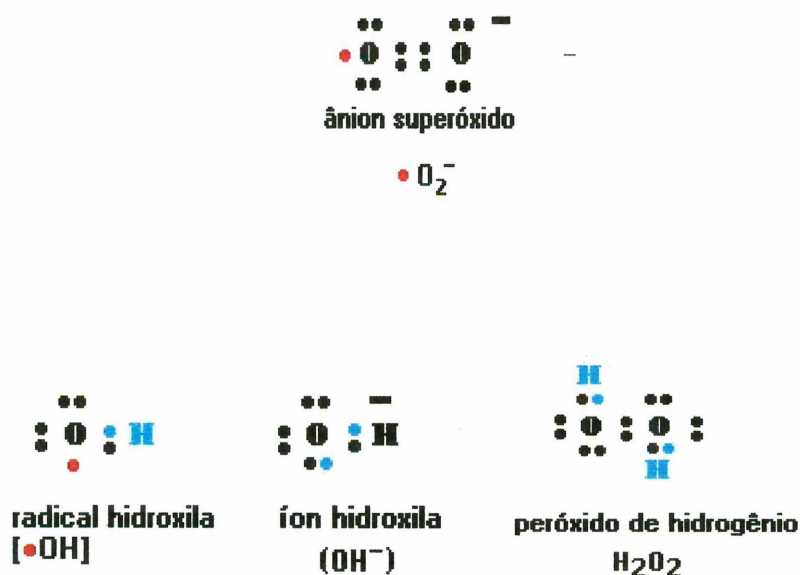


FIGURA 10 – RADICAIS LIVRES

Os radicais livres surgem no organismo em reações e exógenas.

- endógenas (normalmente reações oxidativas) que ocorrem durante os processos metabólicos normais e, nas mitocôndrias é onde ocorre este transporte de elétrons, em que há formação de RL, mas mantendo-se a integridade da organela, existe pequena probabilidade de extravasamento destes -apenas 1%-contudo numa isquemia ou destruição da mesma haverá extenso extravasamento, levando a um aumento dos RL -estresse oxidativo-

- exógenas como drogas químicas, absorção de energia radiante (ultravioleta, raios-X), ambiente saturado de oxigênio e outros gases, envelhecimento celular, células fagocíticas, processos inflamatórios, ação dos macrófagos sobre os tumores.

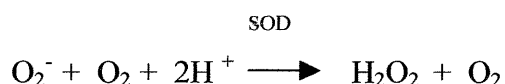
4.7.1 Principais radicais derivados do oxigênio

4.7.1.1 Superóxido:

O ânion superóxido é gerado ou diretamente durante a auto-oxidação na mitocôndria, ou pela ação de enzimas citoplasmáticas, tais como a xantina oxidase, citocromo P-450, e outras oxidases:



Uma vez produzido, o radical superóxido pode ser inativado espontaneamente (dismutado), pela enzima superóxido-dismutase (SOD), formando H_2O_2 :



Há duas SODs principais no organismo; a CuZnSOD (contendo cobre e zinco na mesma molécula - citoplasmática) e a MnSOD (contendo manganês - mitocondrial).

A SOD é a enzima mais abundante no organismo humano.

4.7.1.2 Peróxido de Hidrogênio:

É produzido por dismutação do O_2^- , ou diretamente por ação de oxidases presentes nos peroxissomos: a catalase (CAT) e a glutathion peroxidase (GSPHPx) (enzima selênio-dependente). Radicais hidroxil $OH^\cdot$ são gerados pela hidrólise da água, pela ação da radiação ionizante:



ou pela interação com metais de transição como ferro e cobre: *Reação de Fenton*.¹³



ou através da Reação de Haber - Weiss.¹³



O $OH^\cdot$ é o mais deletério dos radicais livres. Como não há enzimas que o metabolizem, provoca extensa destruição tissular. Assim quando do uso da quimioterapia ou radioterapia para destruir tecidos, nada mais é feito senão formar $OH^\cdot$.

4.7.2 Efeitos lesivos principais dos radicais livres

Os efeitos lesivos destas espécies são muito amplos, mas quatro são especialmente importantes:

- a) peroxidação dos lipídeos (lipoperoxidação) das membranas - Os ácidos graxos insaturados da membrana lipídica possuem duplas ligações entre alguns dos átomos de carbono. Tais ligações são vulneráveis ao ataque pelos radicais livres, particularmente pelo $OH^\cdot$.

- b) Esta interação lipídeo-radical gera peróxidos, os quais são por si só, espécies reativas, iniciando a subsequente redução de outro ácido graxo. Uma reação autocatalítica se desencadeia (propagação), resultando em extensivos danos celulares, organelares e de membrana;
- c) oxidação das proteínas -Os radicais livres promovem uma modificação na estrutura das cadeias (grupo sulfídrico) dos aminoácidos; metionina, histidina, lisina e cistina, causando também a quebra da cadeia polipeptídica. Esta modificação oxidativa aumenta a degradação de enzimas citosólicas, por proteases, o que aumenta a destruição por toda a célula;
- d) lesões no ácido desoxirribonucléico (DNA) - Reações com a timina do DNA produzem quebras na cadeia, e estas têm sido implicadas em morte celular e eventuais transformações malignas das células.¹³

Segundo as pesquisas,³² os metabólitos reativos do oxigênio tais como: ânions superóxido (O_2^-) peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($OH^\cdot$), malondialdeído (MDA) e óxido nítrico (NO), estão indiretamente envolvidos em multiestágios no processo da carcinogênese. Muitas evidências sugerem importante papel das espécies reativas do oxigênio na expansão dos tumores e na aquisição de propriedades de malignidade. De acordo com estes fatos os ROS (espécies reativas do oxigênio) podem ser considerados uma importante classe de carcinógenos.³³ Eles estão principalmente envolvidos nos danos ao DNA, causando mudança na sequência desta molécula, na forma de mutações, deleções, amplificações, e rearranjammentos do gene.

Estas alterações podem resultar na iniciação da inativação de alguns genes supressores de tumor.

Estes metabólitos do O_2 são capazes de agir em vários grupos de substâncias inativando enzimas, formando peróxidos lipídicos pela ação nos ácidos graxos poliinsaturados e quebra na cadeia da molécula do DNA, além de mutações.³⁴

Os eventos químicos que ocorrem por ocasião da ação dos radicais livres sobre o DNA, são relatados em outro trabalho; onde os radicais $OH^\cdot$ difusíveis, são capazes de reagir ou com unidades de açúcar por abstração do hidrogênio, ou com as bases por adição, e então nos nucleosídeos ou oligonucleotídeos, seletivamente será gerado radicais de carbonos centrais na posição C_1 , C_4 e C_5 .

A cinética das reações foi aqui observada, concluindo que muitos danos ao DNA ocorrem em maior grau, e alguns deles são muito pobremente reparados, levando a mudanças deletérias genéticas com o tempo.²⁸

Superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxil são relatados como radicais envolvidos em alta frequência e alterações nos cromossomos e permutações.³⁵

Malondialdeído, um bi-produto da peroxidação lipídica (LPO), está envolvido em formações irregulares no DNA.

Óxido nítrico, por outro lado submete-se a um duelo frente ao câncer. Em altas concentrações ele mata as células do tumor, mas em baixas concentrações ele ao contrário promove crescimento e metástases.

Ele causa quebras na molécula do DNA (numa cadeia simples ou na dupla cadeia). Os metabólitos do óxido nítrico (NO) tais como peroxinitrito ($\text{OONO}^\cdot$) são potentes agentes mutagênicos e podem induzir mutações transversais.^{32,34}

4.8 ANTIOXIDANTES

Existem substâncias que destroem ou inativam os radicais livres. São chamadas de antioxidantes, e são extremamente importantes na defesa do nosso organismo, impedindo o stress oxidativo e consequentemente a destruição tissular. São sistemas enzimáticos (endógenos) e não enzimáticos (exógenos) que contribuem para o término ou inativação das reações dos radicais livres.

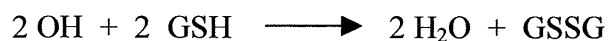
Como exemplos temos a vitamina E, compostos contendo grupo sulfidril tais como a cisteína e glutathione, e proteínas séricas tais como albumina, ceruplasmina e transferrina.¹³

Como sistemas enzimáticos temos:

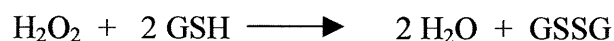
- a) superóxido-dismutase, que converte superóxido a H_2O_2 ;
- b) Catalase, presente nos peroxissomos, que decompõe H_2O_2



- c) glutathione peroxidase, que cataliza a habilidade do glutathione reduzido (GSH) para doar um hidrogênio do grupo SH para o radical hidroxil ou para o H_2O_2



ou



O perfeito equilíbrio entre os efeitos do stress oxidativo de um lado da balança, e o sistema antioxidante endógeno/exógeno, se faz necessário, do contrário teremos inúmeros processos patológicos como conseqüências. Atuam a favor dos antioxidantes, o sistema regulador de metais de transição (transferrina, ferritina), e o sistema de reparação do DNA.²¹ Como fontes exógenas de antioxidantes importantes, temos as vitaminas da dieta, em especial a Vitamina E e Vitamina C, bem como o beta- caroteno, além de inúmeros outros compostos.^{12,13,36}

O sistema antioxidante de defesa do organismo combate a ação deletéria dos agentes oxidantes, (protege contra a geração de metabólitos de O_2 intra e extracelularmente). Existem várias linhas de defesa antioxidantes.³⁷ as quais podem ser enzimáticas (SOD, CAT, GPx) ou não enzimáticas (glutation, vitaminas C e E e beta caroteno).^{32,34} Na primeira linha de defesa está a superóxido dismutase (SOD) que converte O_2^- em H_2O_2 , o qual futuramente será convertido à H_2O . Glutation peroxidase (GPx) é outra enzima antioxidante que catalisa a conversão H_2O_2 a H_2O . A mais potente enzima é a catalase (CAT). GPx e CAT são importantes na inativação de muitas mutações por causas ambientais. CAT é também reconhecida por reduzir aberrações cromossômicas. Vitaminas antioxidantes tais como A, E, e C tem várias atividades biológicas tais como imunoestimulação, inibição da formação de nitrosaminas e na alteração dos metabólitos cancerígenos ativados. Elas podem prevenir mudanças genéticas por inibição dos danos ao DNA, induzidos pelas espécies ativas do oxigênio. Podem se úteis no tratamento do câncer.³⁸ O envolvimento das espécies reativas do oxigênio em vários processos degenerativos e no envelhecimento é já estabelecido com certeza, e neste estudo *in vivo*, em animais, foi feito uma análise nas mudanças relativas à idade e à atividade das enzimas antioxidantes nas diversas regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) (foram utilizados porcos de várias idades). Os resultados mostraram que a atividade da superóxido dismutase e da glutathione peroxidase, se encontraram reduzidas em todas as regiões do SNC estudada.

A atividade da catalase diminuiu significativamente somente no córtex cerebral, hipotálamo e cerebelo. A atividade da glutathione reductase, no entanto, diminuiu no córtex cerebral e hipotálamo. Foi concluído que o declínio nas atividades das enzimas é específico por região e dependente do tipo de enzimas. Nos animais mais velhos, os peróxidos lipídicos endógenos encontraram-se aumentados, significativamente, e após incubação, a análise dos tecidos, mostrou a queda da peroxidação lipídica.

Tais resultados levaram a conclusão de que o acúmulo dos peróxidos lipídicos acontece com o passar dos anos (envelhecimento), mas a suscetibilidade a lipídeo peroxidação diminui nos animais mais velhos.⁵

A regulação da expressão do gene por meio de oxidantes, antioxidantes, e estado redox, permanece como uma abordagem terapêutica promotora. Vários agentes anticarcinogênicos têm sido mostrados como inibidores dos radicais livres e dos danos ao DNA, inibindo assim a promoção do tumor.^{6,7}

Os compostos de cromo são amplamente usados nas indústrias químicas, e são carcinógenos conhecidos. Cromo II foi o primeiro a ser documentado como indutor de danos oxidativos em exames dos níveis de 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OH-dG), em DNA de bezerro incubado com CCl_3 e H_2O_2 .³⁹ Neste estudo *in vitro* são analisados os efeitos antioxidantes de quatro substâncias: melatonina; N¹-acetil -N²-formil-5-metoxi quinuramina; resveratrol e ácido úrico. E são observadas suas propriedades varredoras de radicais livres, e protetoras aos danos oxidativos ao DNA. As três primeiras substâncias, pelos resultados das experiências, são sugeridas com utilidade na proteção do meio ambiente com cromo, e suas ações são explicadas pela habilidade varredora dos radicais OH $\cdot$. Neste estudo a formação de 8-OH-dG foi provavelmente devido à reação tipo FENTON, mediada pelo Cr II, gerando radicais OH $\cdot$, os quais por sua vez podem danificar o DNA, ou pode haver eventualmente mutações no 8-OH-dG formado, levando ao câncer. Concluindo, que estes antioxidantes poderiam reduzir a incidência de câncer por cromo.³⁹

A ação carcinogênica dos oxidantes resulta então da superposição de efeitos genéticos e epigenéticos. Em estudos com células epidermais de ratos.³⁷ demonstra-se que é o balanço entre várias enzimas antioxidantes, em vez da atividade de uma simples componente, o determinante do grau de proteção. Quando houve aumento dos níveis de SOD- Zn ou SOD- Cu, sozinhos, inexplicavelmente ocorreu maior ação oxidante (sensibilização), resultando em aberrações cromossômicas e quebras na molécula de DNA. No entanto um concomitante aumento na CAT ou GPx, corrigiu ou amenizou a hipersensibilidade dos clones de SOD, dependendo dos raios de atividade CAT/SOD ou GPx/SOD. A capacidade celular antioxidante também alterou (diminuindo a indução) o protooncogene.⁴⁰ Aumentos em CAT e GPx protegeram as células epidermais dos ratos da quebra do DNA, induzido pela luz ultravioleta (290 - 320nm), a qual representa o mais potente comprimento de onda carcinogênico do espectro solar, e é conhecida por exercer sua ação pelo menos em parte por mecanismos oxidativos.

Estudos *in vitro* utilizando células de três tipos de câncer de pele: carcinoma celular basal, carcinoma celular escamoso e melanoma, foram analisadas em relação à ação destas enzimas antioxidantes.⁴¹ quando comparadas à ação na pele total: na derme e epiderme saudáveis. Glutation reduzido e oxidado, glutathione S-transferase, e superóxido dismutase, foram mais altos na epiderme que na derme saudável, enquanto que o teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, mostrou mais altos resultados na derme que na epiderme. Estes resultados sugerem que existe uma indução de um mecanismo de anti-radicais livres na epiderme, em resultado ao aumento da produção dos radicais livres. Glutathione S-transferase e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foram mais altas em todos os tumores do que na epiderme saudável, mas glutathione oxidado foi mais baixo. As atividades da glutathione reduzida e da superóxido dismutase foram mais baixas nas amostras do carcinoma basal e do escamoso. Glutathione S-transferase aumentou enquanto as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e superóxido dismutase diminuíram em amostras do melanoma. Maior atividade da glutathione S-transferase, houve particularmente nas formas mais invasivas do melanoma, indicando maior malignidade. Similarmente uma diminuição na atividade da superóxido dismutase pode encorajar uma diminuição na progressão do tumor. A partir destes resultados em cultura de células tumorais, sugere-se novas estratégias para o tratamento do câncer - terapia genética.

4.8.1 Substâncias antioxidantes naturais

Os flavonóides presentes em muitas plantas tem mostrado efeito farmacológico antiulcerogênico, e seu poder antioxidante é ressaltado como sua principal propriedade.

Triterpenos e taninos, também são mencionados como possíveis compostos a serem usados na úlcera gástrica, talvez por aumentar esta atividade antioxidante. Em particular neste trabalho enfatizou-se o uso da planta argentina, *Artemisia douglasiana* Besser (FIG.11), com o nome popular *matico*, na verificação da atividade antioxidante frente a úlcera gástrica. Seu princípio ativo principal é a lactona sesquiterpenóide - dehidroleucodine (Dhl).²⁶



FIGURA 11 *Artemisia douglasiana* Besser

Disponível em: <<http://images.google.com.br/images?hl=pt-BR&lr=&ie=UTF-8&q=artemisia+douglasiana&btnG=Pesquisar>> Acessado em: 01 jul 2004.

Tem-se relatado o efeito antimutagênico dos polifenóis presentes em muitas plantas, o qual se tem relacionado com a sua atividade antioxidante e sua capacidade de induzir enzimas ativadoras de carcinógenos como a glutathione peroxidase, catalase, glutathione S-transferase e a NAD(P)H.⁴² Uma grande quantidade de experimentos *in vivo* e *in vitro* são realizados em torno de substâncias chamadas flavonóides - grande grupo de fenilcromonas, encontrados em frutas, vegetais, cascas raízes, flores, chás etc. e consumidos diariamente em grande quantidade na dieta. Como as informações disponíveis ainda são limitadas na literatura científica, a respeito de absorção, distribuição, metabolismo e excreção estes componentes, trabalhos neste sentido são importantíssimos. Os flavonóides analisados tem demonstrado possuir atividades antialérgicas, antiinflamatórias, antivirais e antioxidantes, além disto e agindo por vários mecanismos diferentes, determinados flavonóides podem exercer significativa atividade anticancer.^{43,44}

O níquel é um poluente ocupacional ambiental, tóxico e carcinogênico. E neste estudo a quercetina, um flavonóide comum na dieta, é relatado por modular muitos efeitos de agentes mutagênicos e carcinogênicos. Os resultados deste trabalho sugerem que radicais livres inclusive espécies reativas do oxigênio devam estar envolvidos na formação de lesões ao DNA induzida pelo níquel (em células da mucosa do cólon), e que a quercetina pode exercer efeito protetor nestas células.⁴⁵

A capacidade antioxidante e imunomoduladora da *Hippophae rhamnoides* (extratos alcoólicos das folhas e frutos), usando linfócitos como um sistema modelo, foram analisadas. O cromo II na forma de dicromato foi usado para induzir os danos oxidativos.

A produção de radicais livres pelo cromo e a habilidade dos extratos alcoólicos em inibir os danos oxidativos causados pelo cromo foram investigadas. Os resultados mostraram que a adição do cromo às células, resultou no aumento da toxicidade, indução da apoptose, produção de radicais livres e diminuição dos níveis de glutathione, e a adição de um extrato alcoólico desta planta, foi capaz de inibir tais danos, e tais dados sugerem que estes extratos testados, possuem marcantes propriedades citoprotetoras, as quais podem ser atribuídas a atividade antioxidante.⁴⁶ Tem-se relatado o efeito antimutagênico dos polifenóis presentes em muitas plantas, o qual se têm relacionado com a sua atividade antioxidante e sua capacidade de induzir enzimas ativadoras de carcinógenos como a glutathione peroxidase, catalase, glutathione S-transferase e a NAD(P)H.⁴²

A flora brasileira é muito rica. Entre elas a família Piperaceae, especialmente *pariparobas*, são largamente usadas no tratamento de doenças do fígado.

Neste trabalho é analisado a atividade antioxidante *in vitro*, da *Pothomorphe umbellata* L. Miq, e comparada a da *Piper regnellii* (outra Piperaceae). A atividade antioxidante da *Pothomorphe umbellata* foi também avaliada em relação à do tocoferol, e os resultados mostraram uma maior atividade da planta em relação a vitamina.⁴⁷

Os constituintes das folhas de *Morina morindoides* foram estudados, e então isolados dez flavonóides, os quais foram analisados no poder de inibir a xantina oxidase e como varredores de ânions superóxido. Quase todos exibiram as duas ações requeridas, em diferentes graus. Estudos relacionando a estrutura e a atividade demonstraram que a atividade não foi somente dependente da natureza dos constituintes e do lugar onde ocorrem substituições, mas também da natureza da aglicona.⁴⁸

Extratos alcoólicos de *Areca catechu* L. mostraram potentes atividades antioxidantes, varredoras de radicais livres e antihialuronidase. Mostraram também ação antialérgica e antimelanogênese.⁴⁹

Plantas tradicionais da medicina japonesa foram analisadas.⁵⁰ por técnicas de ressonância spin-elétron, a fim de verificar a eficácia sobre o antivelhecimento e propriedades varredoras de radicais livres do oxigênio.⁵⁰ Oito componentes da *Rhodiola sacra* mostraram suave ou forte atividade inibitória contra radicais ânions superóxido, enquanto seis, contra radicais hidroxila.

Outra família amplamente representada na flora brasileira é a Asteraceae. A *mil folhas*, (*Achillea millefolium* L) (FIG. 12) é uma espécie representativa da riqueza do metabolismo secundário das espécies desta família, muito importante para a fitoterapia, reconhecida como medicinal por suas propagadas atividades antitumorais, antibacterianas, antihipertensivas e cicatrizantes. Os estudos científicos, no entanto ainda não são suficientes e nem conclusivos.⁵¹



FIGURA 12 – *Achillea millefolium* L.

Disponível em: <<http://www.botanical-online.com/florachilleamillefolium.htm>> Acessado em: 01 jul 2004.

O papel dos antioxidantes como inibidores e varredores de radicais é importantíssimo, pois dão proteção aos seres humanos contra as infecções e doenças degenerativas. Em estudos em plantas: *Diplazium esculentum* (FIG.13)("paku shoot"), *M. utilissima* ("tapioca shoot") e *Sauropous androgynus* ("cekur manis"), determinou-se a atividade total antioxidante e as propriedades potencialmente anticâncer.⁵²

Foram testadas ambas amostras: frescas e fervidas e utilizados ambos métodos de extração: orgânico e aquoso, e analisados quanto ao poder antioxidante (teste do tiocianato férrico e do ácido tiobarbitúrico).

A atividade anticancerígena foi testada em várias linhas de células cancerosas: câncer de mama, de cólon, de fígado, e normais. (Uso de extrato etanólico).

Os resultados foram os seguintes:

- quanto a atividade antioxidante total (tanto no extrato aquoso quanto no orgânico), todas as amostras foram significativamente diferentes e na seguinte ordem decrescente:

- extrato aquoso: *M. utilissima* (extrato fresco)
- *D. esculentum* (extrato fresco)
- *S. androgynus* (extrato fresco)
- *M. utilissima* (extrato fervido)
- *D. esculentum* (extrato fervido
- *S. androgynus* (extrato fervido)

Também ficou demonstrado que o extrato etanólico de *S. androgynus* foi capaz de inibir a viabilidade da linha de células cancerígenas da mama. Os extrato etanólicos de *D. esculentum* e *M. utilissima* não o foram. *S. androgynus*, *D. esculentum* e tapioca não mostraram efeitos citotóxicos contra linha de células cancerígenas do cólon e do fígado.



FIGURA 13– *Diplazium esculentum* Retz

Disponível

em<http://www.hear.org/starr/hiplants/images/600max/html/starr_030807_8009_diplazium_esculentum.htm>

Acessado em: 01 jul 2004.

Importante ressaltar que certos flavonóides possuem efeito de poder inibitório sobre vários sistemas de enzimas que estão intimamente conectadas ao processo de ativação celular, tais como: proteína C quinase, fosfolipases, e outras, e podem influenciar a estimulação de atividade de numerosos tipos de células como basófilos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos T e B, macrófagos, hepatócitos, e outras.

Este presente estudo sugere a presença de flavonóides na dieta para a prevenção de doenças e da saúde.

As atividades antioxidante, anticancer e antimicobacterianas dos extratos de gengibre : *Zingiber officinale* Roscoe, ⁵³ (FIG.14) de alecrim: *Rosmarinus officinalis* L. (FIG.15) e de açafrão: *Curcuma longa* L. (FIG.16) foram verificadas.⁵⁴

O poder antioxidante dos extratos foram avaliados usando a reação entre beta-caroteno e ácido linolêico. A atividade antimicobacteriana foi testada contra *M. tuberculosis* (pelo teste MABA), e atividade anticâncer, testada contra nove conhecidos tipos de canceres humanos.

Alecrim exibiu mais forte poder antioxidante e mais baixo poder antimicobacteriano. O extrato de açafrão mostrou o maior poder antimicobacteriano.

Os extratos de gengibre e açafrão mostraram seletiva atividade anticancer.

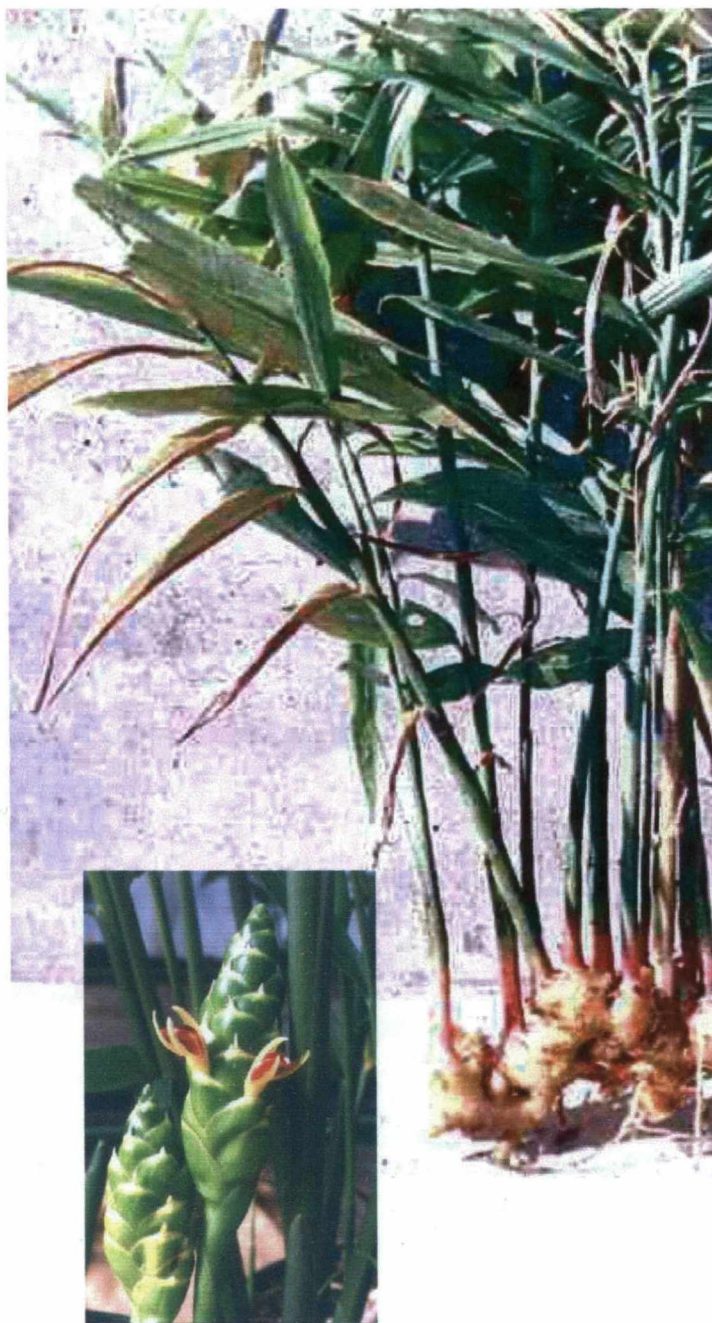


FIGURA 14– *Zingiber officinale* Roscoe

Disponível em: <http://plants.usda.gov/cgi_bin/plant_profile.cgi?symbol=ACMI2> Acessado em: 01 jul 2004.



FIGURA 15 – *Rosmarinus officinalis* L.

Disponível

em>http://www.hear.org/starr/hiplants/images/600max/html/starr_030418_0151_rosmarinus_officinalis.htm.

Acessado em: 01 jul 2004.

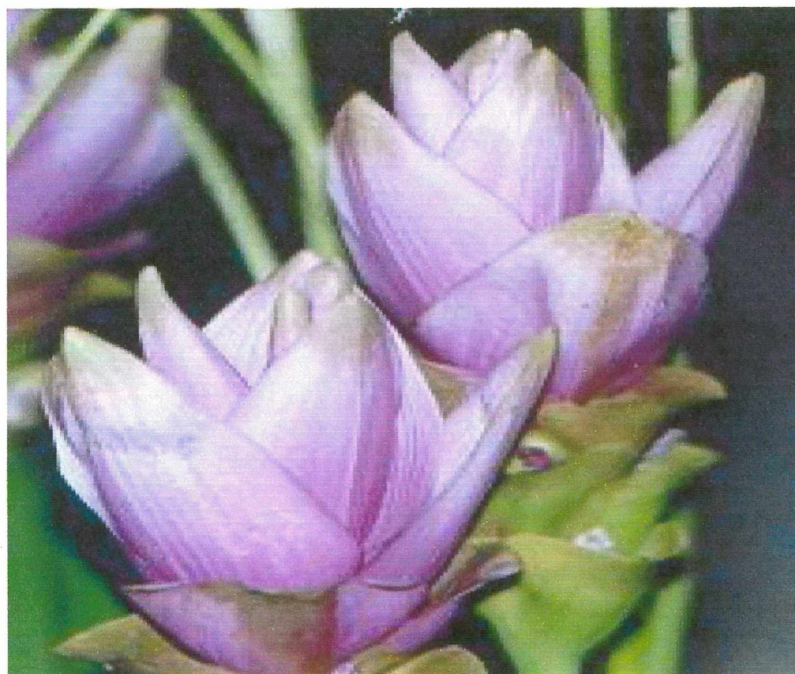


FIGURA 16– *Curcuma longa* Linn.

Disponível em: <http://www.wang.kfunigraz.ac.at/~katzner/engl/generic_frame.html?Curc_lon.html> Acessado em: 01 jul 2004.

Os extratos metanólicos de quatro plantas a seguir assim como os óleos essenciais das mesmas plantas foram testados *in vitro*, quanto a peroxidação lipídica.

Durante a autooxidação do ácido linoléico, todos os extratos foram ativos e nesta ordem:

atividade antioxidante do BHT > atividade antioxidante do alfa tocoferol > atividade antioxidante do extrato metanólico da *Daphne gnidium* > atividade antioxidante do óleo essencial do *Eucalyptus globulus* > atividade antioxidante do óleo essencial da *Colycotome villosa* > atividade antioxidante do óleo essencial e extrato metanólico da *Artemisia arborescens* > atividade antioxidante do extrato metanólico da *Colycotome villosa*.

As atividades foram investigadas durante a autooxidação e durante a oxidação do ácido linolêico mediada por EDTA ou ferro e comparada com o do BHT, alfa tocoferol e EDTA. As plantas utilizadas foram *Artemisia arborescens* L.; *Colycotome villosa* L.; *Daphne gnidium* L.; e *Eucalyptus globulus* Labill.⁵⁵

Nenhuma das plantas testadas mostrou atividade próoxidante.

Durante a oxidação do ácido linolêico catalisada pelo ferro, os óleos não se mostraram ativos, enquanto todos os extratos metanólicos, mostraram alguma eficiência na prevenção dos processos oxidativos.

Todos os extratos foram também testados em culturas de células, a fim de investigar sua atividade citotóxica ou sua habilidade para inibir o crescimento de alguns microorganismos patogênicos.⁵⁵

As espécies reativas do oxigênio causam peroxidação lipídica, a qual contribui para processos de aterosclerose, e estão também envolvidos aos danos ocorridos ao miocárdio (isquemia e reperfusão). Neste trabalho.⁵⁶ a *trinoleína* - um triacilglicerol, foi purificado da *Panax pseudoginseng*, (FIG.17) comumente usada na medicina tradicional chinesa, a qual possui vários efeitos farmacológicos percebidos através dos anos.

Aqui foram analisados seus efeitos antioxidantes, os quais foram os responsáveis pelos benefícios obtidos no tratamento das doenças circulatórias.

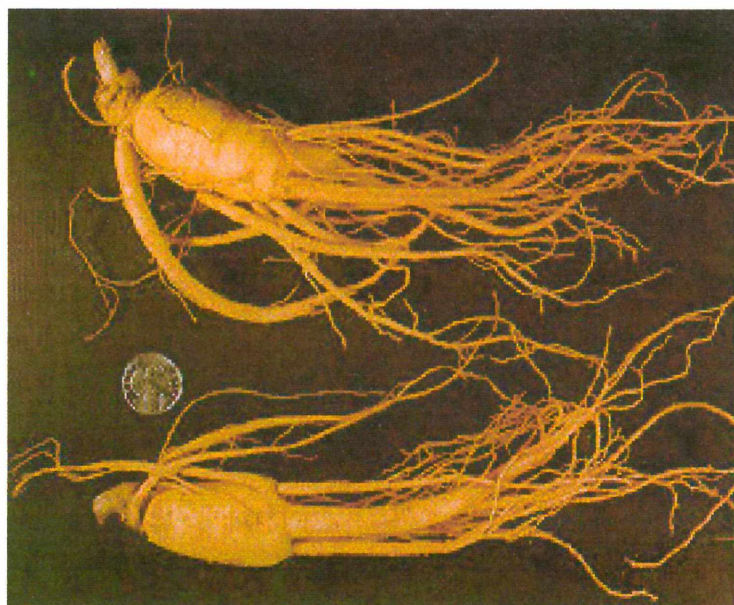


FIGURA 17 – *Panax pseudoginseng* L.

Disponível em: <<http://images.google.com.br/images?hl=pt-BR&lr=&ie=UTF-8&q=panax+pseudoginseng&btnG=Pesquisar>> Acessado em: 01 jul 2004.

Estudos com o óleo essencial de *Thymus zygis* L. ressaltaram que os antioxidantes minimizam a oxidação dos componentes lipídicos nas membranas celulares, pela remoção dos radicais livres, e enfatizaram que com a idade o balanço entre a produção e remoção de radicais livres vai se danificando.⁵⁷

Estudos em ratos demonstraram que gengibre não só reduz o nível plasmático dos lipídeos do plasma, mas também áreas de lesão aterosclerótica.⁵³

O efeito antioxidante pode ser o responsável na atenuação do desenvolvimento da aterosclerose.

No presente artigo, a experimentação é realizada utilizando ratos alimentados em 2% e com 5% de alimento, medindo-se então após o experimento as diferenças nos níveis das peroxidases e glutatión do plasma.

Os resultados mostraram que em ambas as concentrações, o gengibre poderia inibir ou varrer os radicais do corpo do rato (em diferentes graus). Houve aumento do glutatión (GSH-Px) e diminuição das peroxidases.

Um outro estudo, feito em ratos com glicosídeos de *Cistanche*.

Estes tiveram uma significativa ação antioxidante *in vivo* podendo prevenir danos oxidativos nos tecidos. Houve aumento da superóxido dismutase e diminuição do malondialdeído em células de cérebro e fígado de camundongos.⁵⁸

Ginkgo biloba L. (FIG.18) é bem conhecido como uma eficiente droga contra doenças induzidas por radicais livres, por suas ações antioxidantes.

Um primeiro estudo realizado com *Ginkgo biloba*, utilizando métodos estequiométricos e estudo da cinética das reações, foi feito comparações entre seu potencial antioxidante (dois flavonóides são os principais responsáveis por esta ação: campferol e quercetina) com o do alfa tocoferol e o do propil-galato.⁵⁹



FIGURA 18– *Gigko biloba* L.

Disponível em:<<http://www.tc.cc.tx.us/~mstorey/plants/ginko4.jpg>> Acessado em: 01 jul 2004.

Os polissacarídeos existentes na *Gingko biloba* L. aumentam significativamente a atividade da superóxido dismutase e diminuem a atividade do malondialdeído, em células de ratos tratadas. Aqui foram feitos estudos comparativos entre as células normais e células cancerosas dos ratos, sendo que nenhum efeito foi encontrado nas células normais, indicando que pode haver uma modulação no sistema dos radicais livres sob estados normais.⁶⁰

Uma outra planta, muito usada na medicina oriental *Ganoderma lucidum* também se destaca por suas atividades potencialmente antiinflamatórias e antioxidantes. Neste estudo foi testado a fração amino sacarídica da *Ganoderma lucidum* para a habilidade em proteger contra os danos oxidativos ocasionados pelos radicais livres derivados do oxigênio.⁶¹ As espécies reativas do oxigênio, tais como os ânions superóxido e radicais hidroxila estão associadas a carcinogênese e outras condições fisiopatológicas, portanto eliminando ou inativando tais espécies ou ainda inibindo sua geração em excesso, pode-se conseguir benefícios na redução do câncer e outras doenças.

O resultado prático deste trabalho (feito em homogeneizados de cérebro de ratos, numa reação ferro-dependente), na utilização da porção amino-polissacarídica da *Ganoderma lucidum* foi de que houve uma significativa inibição da peroxidação lipídica e dos danos oxidativos ao DNA, sugerindo que esta fração possa ser um potencial preventivo a ser utilizado contra o câncer.

O boldo, esta erva chilena empregada popularmente, e reconhecida em muitas farmacopéias - *Peumus boldus* Mol - principalmente em doenças do fígado), merece particular atenção em especial seu constituinte a boldina que é o mais importante e mais abundante alcalóide desta planta do ponto de vista farmacológico.

Pela eficiência deste alcalóide como efetivo antioxidante em sistemas biológicos e não biológicos, a perspectiva de maiores usos em medicina e indústria se amplia.

Suas propriedades antioxidantes são basicamente úteis em muitas doenças caracterizadas por injúrias oxidativas causadas por radicais livres.⁶²

Um outro antioxidante natural tanshinona II-A (TS II-A), isolado da raiz da *Salvia miltorrhiza* Bunge (FIG.19), é também estudado sempre na busca de novas plantas a serem utilizadas no combate aos danos ao DNA e à inibição da peroxidação lipídica.

Neste estudo foram utilizadas células de fígado marcadas com [3H] ácido araquidônico, na presença de FeCl_2 -DTPA.⁶³

Os resultados mostraram que o DNA nuclear isolado a partir destas células tratadas, tinha mais alta radioatividade se comparado à controles, e esta radioatividade aumentava com uma incubação mais longa.

A parte do DNA lipídico purificado, tinha uma característica espectro-fluorescente e mostrou decréscimo da hipercromicidade.

A conclusão destes estudos é a de que TS II-A, poderia inibir a associação dos produtos da peroxidação com o DNA nas células do fígado, e proporcionar a diminuição da viabilidade da atividade na célula da O6- metilguanina.

Com o aumento da incubação, se comparado com outros antioxidantes, TS II-A teve um maior raio de inibição, o qual foi similar a vitamina E e BHT, marcadamente mais forte que NaN_3 , manitol e superóxido dismutase.

Os resultados das técnicas aqui usadas demonstraram que TS II-A representa um novo e efetivo antioxidante que inibe a associação dos produtos da peroxidação lipídica com o DNA. Este efeito protetor poderia ser exercido através da quebra da cadeia de reações por propriedades varredoras dos radicais livres lipídicos, deste modo decrescendo sua toxicidade.

Outro trabalho em células de hepatoma humano são analisadas no que se refere a ação das espécies reativas do oxigênio e a apoptose, utilizando-se *Salvia miltiorrhiza*.⁶⁴ Extratos de *Salvia miltiorrhiza* tem sido largamente usados na medicina tradicional chinesa, para o tratamento de doenças do fígado.

Evidências experimentais recentes indicam que ela tem potencial antioxidante.

O efeito protetor da *Salvia miltiorrhiza* na hepatocarcinogênese induzida por aflatoxina - B1 (ver figura 4) em ratos (fêmeas), foi investigado e os resultados mostraram que as atividades da aspartato aminotransferase e alaninaaminotransferase do soro foram quase completamente abolidas, indicando que a *Salvia miltiorrhiza* poderia prevenir injúrias às células do fígado, induzidas pela aflatoxina - B1 além disto esta inibição da hepatocarcinogenicidade das células do fígado também estaria associada à correspondente diminuição da indução da oxidação causadora de danos ao DNA.

Salvia miltiorrhiza reduziu substancialmente glutathione S-transferase e a expressão do gene GST-mRNA. Estes seriam os dois caminhos propostos para sua ação, sua propriedade antioxidante ou caminho da detoxificação da aflatoxina -B1 especialmente pela inibição da indução da expressão do gene.



FIGURA 19 – *Salvia miltiorrhiza*

Disponível em: <http://plants.usda.gov/cgi_bin/plant_profile.cgi?symbol=ACMI2> Acessado em: 01 jul 2004.

Um estudo epidemiológico relata uma revisão a respeito da relação entre a quantidade de tomates e dos produtos à base deles utilizados, e o nível de licopeno no sangue e o risco de vários cânceres.

Os dados obtidos sugerem vários efeitos benéficos para vários tipos de câncer, mas como tais dados se orientaram em estudos de observação de relação: causa - efeito, não se pode estabelecê-los como definitivos.

Numerosos outros componentes estão presentes nos tomates e complexas interações entre eles pode contribuir para as propriedades anticâncer dos tomates.

O licopeno tanto pode ser o responsável, ou apenas contribuir para estes efeitos.⁶⁶

O fruto da palma (*Elaies guineensis*), fornece óleo de palma, que é uma gordura semi-sólida, rica em ácidos olêico e linolêico, e componentes menos solúveis em óleo, e ainda vitamina E (tocoferóis, tocotrienóis), carotenóides e fitoesteróis.

Recentemente tem-se conseguido recuperar e concentrar antioxidantes solúveis em água, contendo maior conteúdo de ácidos fenólicos e flavonóides.

Tem este óleo se tornado vantajoso, do ponto de vista das recomendações dietárias correntes.

As diferentes frações do óleo de palma natural diferem em suas características físico-químicas, e a mais notável delas: a fração do óleo de palma vermelha é muito rica em carotenóides.

Por sua riqueza em vitamina E, (30% de tocoferóis e 70% de tocotrienóis), o óleo de palma tem sido pesquisado extensivamente, por suas propriedades nutricionais, atividades antioxidantes, efeitos anticâncer, proteção contra a aterosclerose e contra ao aumento do colesterol.

O conteúdo antioxidante deste óleo, particularmente flavonas e compostos fenólicos, mostra potente ação contra o câncer de pele e mama, além de outros.

Tem sido muito usado na indústria cosmética, como produto contra o envelhecimento.

O papel da dieta antioxidante no controle dos danos ao DNA, é muito discutido. Uma dieta rica em gorduras pode ocasionar a formação de ácidos biliares secundários que são mutagênicos e co-carcinogênicos.⁶⁷

A maioria dos cereais, nozes, legumes, óleo de sementes, pólen e esporos, contêm 1 - 5% de ácido fítico. Este forma quelato com o ferro e com isto serve como um potente antioxidante, exercendo função na preservação das sementes.

Pelo mesmo mecanismo, sua adição aos alimentos, inibiria a peroxidação lipídica e concomitantemente estragos oxidativos tais como descoloração, putrefação, e outros.

O ácido fólico na dieta poderia diminuir a incidência de câncer do cólon e proteger contra outras doenças inflamatórias do intestino.^{68,69}

Danos oxidativos a proteínas, lipídeos e DNA, são importantes fatores etiológicos no envelhecimento e no desenvolvimento de doenças crônicas tais como o câncer, aterosclerose e formação de catarata.

A patologia associada a estas doenças provavelmente ocorre somente após a produção das espécies reativas do oxigênio terem excedido a capacidade do corpo em proteger-se e reparar efetivamente os danos oxidativos.

Vitamina C, Vitamina E e beta-caroteno, freqüentemente são referidas como "vitaminas antioxidantes" e tem sido sugeridos para limitar os danos oxidativos em humanos, e assim deste modo diminuir o risco de certas doenças crônicas.

Neste estudo de revisão, foram examinados as evidências científicas que a suplementação em humanos de vitamina C, vitamina E e beta-caroteno, diminuem *in vivo* os danos oxidativos à lipídeos, proteínas e DNA, utilizando a medição da oxidação em biomarcadores. Vitamina E e talvez a vitamina C, mostraram ser capaz de uma diminuição significativa aos danos oxidativos à lipídeos em fumantes e não fumantes. Mas são necessários mais estudos conclusivos sobre isto para afirmar sobre as demais vitaminas.⁷⁰

A dieta tem realmente um importante papel nas quatro maiores doenças dos tempos modernos: doenças cardiovasculares, câncer, hipertensão e obesidade.⁷¹

Embora o grau desta importância não seja precisamente avaliado, existe uma relação que é aceitável pela maioria dos pesquisadores que é a de que ao menos um terço dos casos de câncer podem ser atribuídos à dieta e talvez metade dos casos de doenças do coração e artérias e hipertensão igualmente atribuídos à dieta.

Existe forte, e consistente evidência que um aumento no consumo de frutas e vegetais, exerce proteção contra vários cânceres, especialmente os do trato digestivo e respiratório.²⁷

Neste trabalho de revisão é abordado as propriedades dos componentes das frutas cítricas e seus efeitos protetores para a saúde e especialmente os efeitos anticancer.

Segundo os dados deste trabalho, os efeitos protetores do aumento do consumo de frutas e vegetais são atribuídos a micronutrientes ativos (vitaminas e minerais) e componentes não-nutritivos conhecidos como fitoquímicos.

Estes últimos são bem definidos como substâncias encontradas em frutas e vegetais comestíveis, que podem ser ingeridos diariamente por humanos (em grande quantidade), e

que exibem potencial para modular o metabolismo humano numa maneira favorável para a prevenção do câncer e outras doenças degenerativas.⁷² Qualquer redução no risco de doenças associada ao aumento da taxa de nutriente antioxidante, pode ser resultado da ação conjunta de uma mistura de alimentos ricos em antioxidantes, ao invés da ação de um só.

Dados experimentais mostram que suplementação com vitaminas antioxidantes ou beta-caroteno, tem sido bastante desencorajadora, testes clínicos tem demonstrado nenhum tipo de efeito ou efeitos adversos sob as doenças cardiovasculares e câncer.⁷²

A frequência do consumo e não o seu conteúdo em vitamina C está relatado em vários estudos como o fator responsável pela maioria dos efeitos protetores e de redução em vários cânceres. Isto sugere que as frutas cítricas contêm vários agentes quimiopreventivos.

As frutas cítricas incluem laranja, limão, limas e grapefruits, e são principais fontes de tais agentes.

Elas contêm alimentos funcionais como vitamina C, folato, fibras e outros componentes bioativos como carotenóides e flavonóides (aos quais é atribuída a responsabilidade de prevenção das doenças degenerativas e atividade anticancer). Frutas cítricas contêm em grande quantidade a classe de fitoquímicos, conhecido como limonóides. Estes são responsáveis nas frutas cítricas pelo sabor amargo. Em maior quantidade destes estão *limonin* e *nomilin*.

Eles têm sido analisados em estudos feitos em animais, e demonstraram ter certas atividades biológicas que podem ser usadas como agentes quimiopreventivos para o câncer. *Limonin* e *nomilin* possuem em suas estruturas um anel furano substituído, e a presença deste parece ser essencial para a indução da enzima GST (glutathione S-transferase). Sendo o *nomilin* muito mais indutor de.⁷² GST, é muito mais ativo como inibidor da carcinogênese que o *limonin* (menos efetivo).

Estudos *in vitro* com *Citrus sinensis*, em formulações para a pele, aplicadas topicamente após a exposição solar, demonstraram que há efetivamente uma proteção da pele aos danos causados pela radiação ultravioleta (UVB).^{73,74}

Embora muitos estudos em animais em relação aos efeitos inibidores e protetores: tumores de estômago, de pulmão, pele, tenham bons resultados o que torna encorajador o uso dos limonóides como quimiopreventivos para humanos no futuro, muitos problemas ainda terão que ser solucionados para isto, e entre estes está, o dos limonóides serem extremamente amargos, e sua concentração em sucos de frutas ser muito baixa, além de serem solúveis somente em solventes orgânicos. Uma alternativa seria utilizar a forma glicosídica destes, que

existe em grande quantidade nos sucos de frutas, e estudos preliminares em animais tem mostrado atividade preventiva em relação ao câncer.

A suplementação dietária dos componentes bioativos presentes nas frutas cítricas, não é tão efetiva na prevenção do câncer, quanto se eles forem consumidos na fruta *in natura*. Isto sugere que o efeito protetor pode ser resultado de interação entre os componentes bioativos ou atribuído a algum ou alguns dos componentes ainda desconhecidos.⁷² A própolis, uma resina natural produzida por abelhas, mostra uma forte atividade antimicrobiana e possui como constituinte o éster do ácido caféico, que é um antioxidante fenólico. Este tem mostrado inibir a formação de peróxido de hidrogênio intracelular e a oxidação de bases no DNA.⁷⁵

Uma substância tumoricida foi isolada da própolis brasileira e caracterizada como: 3-[4-hidróxi-3,5-bis(3metil-2-butenil)fenil]2-ácidopropenóico(3,5-diprenilhidroxicinâmico)-*Artepilin C*, mostrando citotoxicidade em células de carcinoma hepático humano (cultura *in vitro*), com atividade antitumor maior que 5-fluorouracil. A citotoxicidade foi atribuída a um efeito de apoptose.⁷⁶

A peroxidação lipídica foi ativada em salmonelas.

O conteúdo de hidroxiperóxidos e malondialdeído foi aumentado nas células do fígado de ratos. Ao mesmo tempo a atividade das enzimas antioxidantes foi alterada. A administração contínua de própolis estabilizou a peroxidação lipídica; ficando a sugestão de que a própolis poderia ser usada como droga em medicina.⁷⁷

Estudos em laboratório tem estabelecido que ésteres do ácido caféico, presentes na própolis, são potentes inibidores do crescimento de células de adenocarcinoma de cólon (em ratos). Este trabalho discute a utilização destas substâncias na dieta.⁷⁸ Em culturas de células *in vitro*, tratadas com o extrato etanólico de própolis.⁷⁹ foi demonstrado um aumento do número total de células.

A adição do extrato etanólico de própolis ao meio nutritivo de células, causou uma forte ativação das mitoses, e o metabolismo distintamente intensificado destas células expressou-se por uma forte ativação da NADH₂- redutase. A ação antiinflamatória e antibiótica foi demonstrada em estudo de extrato etanólico *in vitro*, e *in vivo*.⁸⁰ Atividades estas, relacionadas ao menos ao conteúdo de ácido caféico.

Outros trabalhos mostram que o ácido caféico (seu éster) é um inibidor da lipoxigenase, com propriedades antioxidantes.⁸¹ A antimutagenicidade do ácido caféico e ácido clorogênico foi estudada usando-se *Salmonella typhimurium*.^{82,83}

Em muitas plantas, em uvas e em produtos à base destas, encontra-se um antioxidante chamado resveratrol (uma fitoalexina), com muitas propriedades farmacológicas, destacando-se propriedades antiinflamatórias e anticâncer.^{84,85}

Neste trabalho examina-se o efeito antiproliferativo do reverastrol por apoptose. Foram analisadas células de câncer de fígado humano Hep G₂ e H₃B. Os resultados mostraram que resveratrol inibiu o crescimento celular na posição p-53, somente em células Hep G₂.

O efeito anticâncer foi resultado da morte celular por apoptose induzida pela via p-53 - agente disparador.

Os resultados demonstraram que o resveratrol efetivamente inibiu o crescimento celular (em G₁), e induziu a morte celular programada em células dos hepatócitos na base molecular, (houve aumento da expressão do gene p 21), sugerindo que este produto seja usado como uma nova droga candidata a prevenção do câncer.

Vinhos vermelhos contém uma variedade de antioxidantes polifenólicos: ácido gálico, *trans*-resveratrol, quercetina e rutina, são quatro compostos fenólicos bem estudados.

O conteúdo fenólico total destes vinhos de acordo com o método de Folin-Ciocalteu foi estimado em 1800 - 2300mg/l, expressado em equivalentes do ácido gálico.⁸⁶

Camellia sinensis L. (FIG.20) é cultivada em trinta países, e representa a bebida mais consumida no mundo.

A maioria dos estudos experimentais conduzidos com a fração polifenólica do chá verde, demonstra efeitos antimutagênicos e anticancerígenos.

Vários derivados (polifenóis) presentes no chá verde são os responsáveis por estes efeitos sendo a (-)-epigallocatequina-3-galato a mais ativa e em maior abundância.

Os mecanismos deste efeito quimiopreventivo não são completamente entendidos, e várias teorias são propostas, mas as diversas propriedades dos polifenóis presentes nos chás, fazem deles efetivos agentes com esta ação preventiva contra a iniciação, promoção e progressão do câncer.⁸⁷

A (-) epigallocatequina-3-galato tem mostrado possuir propriedades antiproliferativas. Em um estudo sobre seus efeitos sobre o papilomavírus humano (HPV-16) em linha de células cancerosas cervicais, o mecanismo de ação inibitória do crescimento celular e regulação da expressão do gene, foram também avaliados.

Os dados pesquisados *in vitro* sustentaram que esta catequina pode inibir o crescimento das células cancerosas através da indução da apoptose e através do bloqueio do

ciclo celular na fase G₁. Estes dados sustentam o uso de uma nova droga para pacientes com câncer cervical.⁸⁸

Nos anos mais recentes existem inúmeros relatos documentados, a respeito dos efeitos quimiopreventivos do consumo do chá verde em vários tipos de câncer como: de bexiga, próstata, esôfago e estômago.

Esta propriedade é atribuída à presença dos polifenóis incluindo epigallocatequina-3-galato, epigallocatequina e epicatequina.⁸⁹

Além das propriedades antioxidantes já mencionadas, alguns autores têm proposto um mecanismo de ação citotóxica dos polifenóis derivados de plantas contra as células do câncer o qual envolve a mobilização de cobre endógeno e consequente ação prooxidante.

Os mesmos autores demonstraram que o extrato de chá verde é consideravelmente mais eficaz que o extrato de chá preto na ruptura da estrutura do DNA em presença de íons cobre (danos oxidativos ao DNA).

Os resultados são discutidos em relação as diferentes estruturas entre os polifenóis dos chás verde e preto.⁹⁰ O extrato de chá verde mostrou uma taxa mais alta de redução de Cu (II) e conseqüente formação de radical hidroxila.

Esta redução provavelmente é acompanhada da formação de espécies oxidadas de polifenóis do chá, as quais por sua vez parecem catalisar esta redução, levando a um ciclo redox de íons cobre.

Há sugestão do uso do chá verde (pelos resultados experimentais com microsossomos de ratos) como fotoprotetor para a pele e para doenças onde o stress oxidativo desempenha um papel chave (por suas propriedades antioxidantes).⁹¹



FIGURA 20 – *Camellia sinensis* L.

Disponível em: <http://plants.usda.gov/cgi_bin/plant_profile.cgi?symbol=ACMI2> Acessado em: 01 jul 2004.

As propriedades antioxidantes de *Asparagus racemosus* contra os danos induzidos pelas radiações foram analisados.⁹²

É altamente impraticável, quantificar todos os componentes nas plantas que exibem atividade antioxidante e uma variedade de métodos tem sido desenvolvidos para tentar fazer esta quantificação, a fim de se obter a capacidade antioxidante total dos extratos de plantas.⁹³

Um estudo feito com as folhas do espinafre de duas espécies *Cnidoscolus chayamansa* McVaugh e *Cnidoscolus aconitifolius* Miller, foi realizado, utilizando-se extratos de folhas cruas e cozidas das duas espécies. A capacidade antioxidante mostrou-se maior no material in natura que no cozido. Os flavonóides isolados dos extratos das folhas em maior quantidade foram campferol-3-O-glicosídeo e quercetina -3-O-glicosídeo.

Cnidoscolus aconitifolius, conteve mais variedades de glicosídeos flavonóides que a *Cnidoscolus chayamansa*. O cozimento reduziu a atividade antioxidante e o conteúdo fenólico, resultando em muita perda de glicosídeos quercetina e campferol nos resíduos dos extratos de folhas. Estes resultados indicaram que as folhas de espinafre são uma rica fonte de antioxidantes naturais através da dieta.

Um estudo comparativo entre três potentes antioxidantes, foi realizado *in vivo*, em ratos, utilizando linha de células de câncer prostático humano.⁹⁴

Os antioxidantes usados foram: um antioxidante natural encontrado nas folhas do espinafre denominado NAO, o maior constituinte polifenólico do chá verde epigallocatequina 3-galato, denominada EGCC, e a H-acetilcisteína denominada NAC. Todos mostraram efeitos antitumor específicos.

Particularmente NAO, inibiu a proliferação celular (dose-dependente), aumentando o número de células G₁ e reduzindo os níveis de radicais livres (espécies reativas do oxigênio). As propriedades antioxidativas e antiproliferativas de NAO poderiam explicar sua eficácia no lento processo carcinogênico prostático ocorrido nos ratos

Além das propriedades antioxidativas e antiproliferativas, propriedades antiinflamatórias também têm sido descritas para as folhas de espinafre, nos sistemas biológicos. Um outro estudo utilizando dados pré-clínicos e epidemiológicos foi realizado para demonstrar a eficácia do extrato destas folhas em relação às propriedades descritas e a segurança do seu consumo na dieta.⁹⁵

Neste trabalho foram feitas considerações sobre a composição química do espinafre, seus efeitos e benefícios, e recomendações sobre sua inclusão na dieta.

Também neste estudo são mencionados o potencial anticancer e antienvelhecimento, e outros benefícios do extrato de espinafre, como aminoproteção ao Sistema Nervoso Central. Aqui a atividade antioxidante da NAO é demonstrada ser superior *in vitro* e *in vivo* à do chá verde (EGCC), a da N-acetilcisteína (NAC), a do BHT e a da vitamina E. NAO tem mostrado ser não mutagênica e tem mostrado efeitos promissores anticarcinogênicos tanto em câncer de próstata quanto em câncer de pele. Não tem demonstrado toxicidade a nenhum órgão específico e nenhum efeito colateral.

As folhas de alcachofra (*Cynara scolymus* L.)(FIG.21), são usadas na medicina popular há muitotempo. Os componentes químicos destas folhas têm sido estudados extensivamente, e os resultados mostram, uma fonte muito rica em compostos polifenólicos e flavonóides.⁹⁶

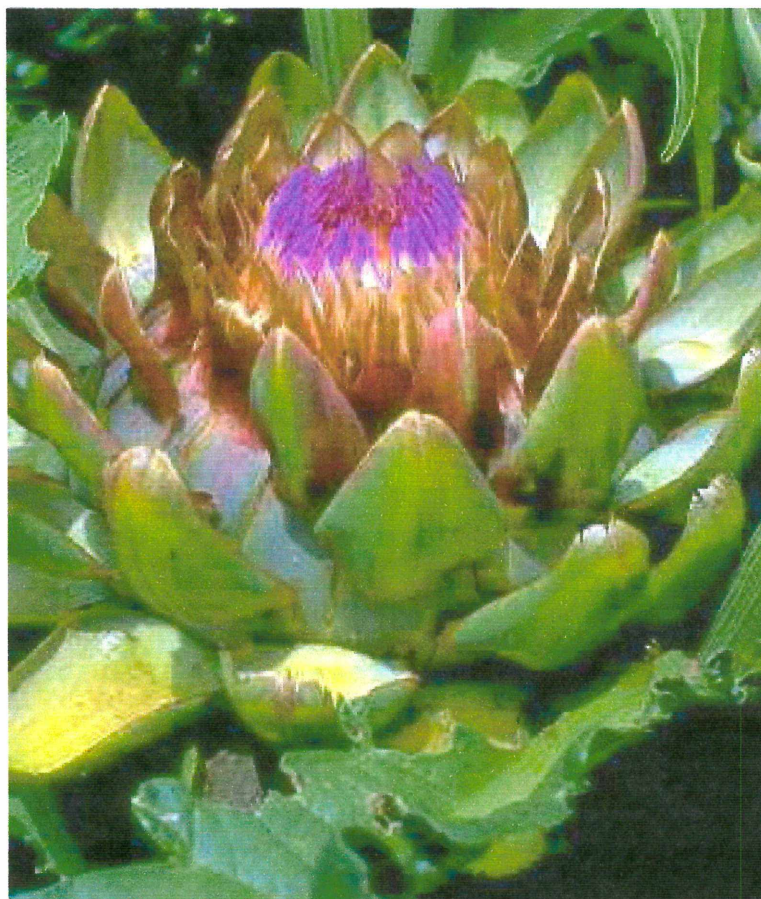


FIGURA 21– *Cynara scolymus*

Disponível em: <http://www.rain-tree.com/Plant-Images/Cynara_scolymus_p1jpg.jpg> Acessado em: 01 jul 2004.

Em vários sistemas de testes farmacológicos, os extratos de folhas de alcachofra têm mostrado atividades antibacterianas, antioxidativas, anti -HIV, na excreção da bile, atividades hepatoprotetoras, urinárias e coleréticas, assim como a habilidade para inibir a biossíntese do colesterol e a oxidação da LDL.

As propriedades antioxidantes, tem sido enfocadas só mais recentemente, e as folhas de alcachofra provam ter ação antioxidante por proteger contra a oxidação induzida pelo stress oxidativo em culturas de hepatócitos de ratos, por proteger lipoproteínas da oxidação *in vitro*, por inibir estresse oxidativo quando células humanas são estimuladas com agentes que geram espécies reativas de oxigênio.

Neste presente estudo, foram isolados e purificados, sete componentes ativos da alcachofra (folhas e cabeça), de três variedades distintas, (*Imperial star*, *Green globe e Violet*), e foram elucidadas suas estruturas usando métodos adequados (MS e NMR).

Dois destes compostos apigenina-7-rutosídeo e narirutina foram relatados com sendo únicos nas cabeças de alcachofra, e este trabalho como sendo o primeiro relato destes compostos na porção comestível da planta.

Em geral os resultados em relação às atividades antioxidantes da alcachofra, são estimados pela capacidade em retirar os radicais livres DPPH e são altamente correlacionados e diretamente proporcionais, ao total de fenóis.⁹⁷

Outro objeto de estudo foi a planta *Achyrocline saturioides* (Lam) DC, Compositae, conhecida como *marcela*. Esta planta medicinal usada na Argentina, Uruguai, Brasil e Paraguai, por suas propriedades coleréticas, hepatoprotetoras e antiespasmódicas, foi estudada no que diz respeito as suas atividades antioxidantes, através de bioensaios realizados com seus extratos, aquosos e metanólicos, verificando a capacidade varredora de radicais livres e a capacidade em reduzir a peroxidação lipídica.⁹⁸ A presença do flavonóide quercetina e seus derivados, e de diferentes ácidos fenólicos tais como caféico, clorogênico e isoclorogênico, nas partes aéreas desta planta é o que tem levado à várias pesquisas sobre a sua atividade antioxidante. Os resultados aqui obtidos em ambos extratos aquosos e metanólicos, sugerem que a *Achyrocline saturoides* possui significativa propriedade no combate aos radicais livres e atividade antioxidante *in vitro*, e este fato deve encorajar futuros estudos *in vivo*.

Efeitos sobre a peroxidação lídica microsomal, foi verificado em trabalhos *in vitro* utilizando-se *Helichrysi flos*.⁹⁹

Série de ensaios *in vitro* foram realizados com extratos do flavonóide extraído da *Garcinia kola* o *Kolaviron*. Este, marcadamente diminuiu a atividade oxidante pela inibição

da peroxidação do ácido linolêico. *Kolaviron* exibiu 57% efeito varredor sobre o radical superóxido (concentração de 1mg/ml), 85% sobre o peróxido de hidrogênio (1,5mg/ml), 89% (2mg/ml) sobre o radical -alfa-difenil-beta-picrilhidrazil, indicando que estes extratos têm efetiva atividade como doadores de hidrogênio e como antioxidantes. *Kolaviron* reagiu com o radical hidroxil pela inibição da oxidação da desoxirribose induzida pela reação de Fenton. *Kolaviron* também foi efetivo na prevenção da peroxidação lipídica induzida pelo ferro/ascorbato (dose dependente). Sua ação conclusiva como antioxidante na peroxidação lipídica, foi atribuída às suas propriedades varredoras de radicais livres e relacionada diretamente à prevenção da propagação da peroxidação lipídica.¹⁰⁰

Uma relação muito estreita entre a composição fitoquímica das substâncias antioxidantes presentes em plantas e sua ação antiinflamatória, foi demonstrada nos experimentos onde se utilizou plantas de comprovados efeitos antiinflamatórios (por modelos de inflamação aguda e crônica), com conhecidas composições fitoquímicas e se observou que muitas delas possuem em comum muito elementos reconhecidamente antioxidantes como os flavonóides, taninos e compostos polifenólicos.¹⁰¹

Incessante estudos sobre antioxidantes naturais são realizados, e neste em particular feito por pesquisadores brasileiros buscou-se a investigação sobre o antioxidante curcumina em danos aos cromossomos, induzidos pelo agente oxidativo Bleomicina, a fim de determinar o efeito nas aberrações cromossômicas em células de ovário de hanster.¹⁰²

Açafrão, é uma especiaria obtida do rizoma de *Curcuma longa* Linn (Zingiberaceae).

Estudos sugerem que este é um potente agente antimutagênico *in vivo* contra carcinógenos tais como benzo-[alfa]pirene e metil dolantrene e é efetivo na inibição da formação de mutações no sistema urinário em fumantes.¹⁰²

Curcumina é o princípio ativo do tumeric, comumente usada como agente corante em alimentos, drogas e cosméticos, e com inúmeros efeitos. Curcumina é conhecida por agir como antioxidante, antimutagênico e anticarcinogênico.¹⁰²

Bleomicina é um antibiótico e glicopeptídeo radiomimético, que é rotineiramente usado na quimioterapia do câncer como um agente antineoplásico. Bleomicina (BLM) é mutagênico em diversos testes genéticos e se pensa exercer seu efeito genotóxico através da produção de radicais livres e indução de danos oxidativos ao DNA.

Três concentrações dos antioxidantes foram combinados com BLM em células de ovário de hanster, tratadas durante as fases G₁/S, S e G₂/S do ciclo celular. Não houve prevenção dos danos causados aos cromossomos, em qualquer das fases. Houve uma

potencialização da clastogenicidade da BLM pela curcumina, claramente observada nas células tratadas durante a fase S e G₂/S.

Curcumina foi também clastogênica sozinha, em dois protocolos experimentados. Portanto o exato mecanismo pela qual a curcumina produziu clastogenicidade e potencialização dos efeitos, permanece desconhecido.

Curcubitáceas são conhecidas por causar efeitos anticancer e citotoxicidade.

Dois novos glicosídeos de curcubitáceas, tem sido isolados a partir da fração purificada do rizoma da *Wilbrandia verticillata*, uma Curcubitácea, popularmente conhecida como *cabeça de negro*, e é usada como remédio antireumático na medicina popular do Brasil.

¹⁰³ Os dois novos compostos descritos são similares as norcurcubitáceas já caracterizadas por outros pesquisadores anteriormente.¹⁰²

Várias informações tem sido relatadas sob o mecanismo de ação das curcubitáceas, especialmente aqueles relatados a alterações de sistemas metabólicos.

Tem sido demonstrado que elas inibem o oxigênio em células de carcinoma de Erlich e a síntese de DNA e RNA e proteínas, em células Hela. Embora sejam resultados preliminares, pode-se esperar que a atividade destas duas curcubitáceas Wv1 e Wv2) esteja relacionada a alterações do sistema metabólico das células do tumor. Os autores desta pesquisa propõe novos estudos isolando as duas curcubitáceas e explorando o aumento da atividade antitumor, através de modificações na estrutura química.¹⁰³

Influência da *Podophyllum hexandrum* no sistema de defesa antioxidante endógeno em ratos, demonstrou um possível papel desta planta em radioproteção.¹⁰⁴

A hidroxycamptotencina (HCPT), tem sido relatada como fonte inibitória em grande variedade de tumores animais. Tem mostrado efetividade no tratamento de pacientes com carcinoma gástrico, carcinoma de fígado, tumores da cabeça e pescoço e leucemia. HCPT e análogos, tem sido encontrada em *Camptotheca acuminata* Descaine (planta popular da China).

Estudos farmacológicos demonstraram que HCPT deprime significativamente a fase S das células do tumor, atrasando o trânsito das células de G₁ para S e com isto há formação de quebra nas cromátides celulares, e danos a membrana nuclear e membrana de outras estruturas incluindo a da mitocôndria.

Esta indução da quebra do DNA foi demonstrada por métodos específicos.¹⁰⁵

Outros agentes antitumor de origem natural também tem se mostrado bem promissores, tais como Indirrubina, isolada do Indigo naturalis (no tratamento da leucemia

lielocítica); Irisquinona, isolada das sementes de *Íris palasii* (como radiosensibilizador na clínica médica); Oridonina, isolada da *Rabdosia rubesens* (no tratamento do carcinoma de esôfago); Norcantaridina - derivado da cantaridina, isolada da *Mylaris phalerata* (atividade antitumor em pacientes com hepatoma).

Homoharringtonina (HHRT), um dos alcalóides obtidos da *Cephalotaxus fortunei* Hook F, é efetivo no tratamento da leucemia aguda, e em combinação com outras drogas é também útil no tratamento de alguns tumores sólidos como o carcinoma mamário. Em experimentos recentes em ratos, HHRT é relatada pelo poder em reduzir metástases, e marcadamente pelo poder de inibir a síntese protéica e de ácidos nucleicos. Sua toxicidade tem sido diminuída com o uso de fenobarbital sódico.

Licobetaina (LBT), derivada da liconina, principal componente isolado da *Lycoris radiata* L'Herit.Herb., mostrou possuir forte ação inibitória em ascites tumores.¹⁰⁵

Por estes dados, se observa que os agentes de origem natural desenvolvidos na China têm grande potencial para o desenvolvimento de drogas melhores e mais efetivas para o tratamento de malignidades.

5. CONCLUSÕES

Apesar de todos os esforços que vem sendo feitos, e do grande número de profissionais envolvidos na pesquisa do câncer, ainda é muito grande a quantidade de dúvidas e incertezas a seu respeito.

Dos trabalhos revisados, algumas deduções e conclusões mais expressivas serão descritas a seguir.

O melhor conhecimento sobre o crescimento celular e da base molecular do processo que envolve o ciclo celular, parece ser uma área extremamente importante e primordial.

A seqüência dos eventos no processo da formação tumoral é quase com certeza, conseqüência de mudanças gênicas, e a compreensão destas ainda nos leva a muitos problemas sem solução.

É certo dizer, que no processo da carcinogênese, a iniciação é o primeiro passo, e as células assim transformadas, podem desenvolver câncer imediatamente, ou muito lentamente, ou até mesmo podem ficar latentes por muito tempo até que um agente promotor atue sobre elas.

É certo também que, embora o crescimento celular seja necessário para o desenvolvimento do tumor, outros fatores estão envolvidos. Existe um sentido importante no qual o câncer é uma doença única; todas as células de tumores, quaisquer que seja sua origem e tipo, apresentarão um conjunto de mudanças básicas e seguirão um padrão de comportamento anormal. Todas as células cancerosas apresentam mudanças muito semelhantes ou até mesmo idênticas.

As células dos tecidos normais operam em comunidades, e fatores controladores restringem seu crescimento e reprodução. No câncer elimina-se as restrições à reprodução, e a duplicação das células é rápida e descontrolada.

Diferentemente das células normais, as células cancerosas também se movem freqüentemente para outros tipos de tecidos ou locais de origem diferentes do seu.

Mutações são mudanças no material gnético (DNA) celular. Tumores malignos são um conjunto de células que sofreram mutações.

A maior parte das principais mutações é letais a célula afetada, e não ocorrem outros danos.

Algumas mutações, entretanto, fazem com que a célula se reproduza desorganizada e descontroladamente, afetando a regulação gênica normal ao ativando genes específicos que produzem tumores (os oncogenes), e desta maneira originando o câncer. Conclui-se que qualquer agente capaz de danificar o DNA é potencialmente capaz de causar câncer.(Carcinogênicos).

Radicais livres são um tipo de molécula altamente reativa que causam oxidação nas células. A oxidação é um processo químico natural que ocorre nas células (e naturalmente gera radicais livres), e uma oxidação descontrolada recebe o nome de estresse oxidativo que é prejudicial e pode levar à morte celular.

A maioria dos tratamentos para o câncer desde a radioterapia até a quimioterapia produz eventos oxidativos para matar as células.

A idéia da maior parte dos pesquisadores nos trabalhos investigados, é coerente e se baseia no fato de que quanto maior for o entendimento dos processos oxidativos que ocorrem nas células, maior a capacidade de uma chance de manipulá-los, o que levaria a melhores e mais eficientes terapias de tratamento.

As defesas antioxidantes do organismo têm a habilidade para limpar estes radicais e então prevenir injúrias às células. Este ocorre desde que o estresse oxidativo não ultrapasse a capacidade de defesa celular.

Um dos mais eficazes antioxidantes do corpo humano é o tocoferol (Vitamina E). Sua lipossolubilidade é extremamente importante, uma vez que o dano mais significativo provocado por radicais livres é as membranas celulares.

A Vitamina C também é um poderoso antioxidante, e é hidrossolúvel, sendo isto importante, pois assim tem-se a presença de antioxidantes em outras partes do corpo.

Outros antioxidantes importantes são a cisteína, o glutatión e constituintes do sangue: a transferrina (contém ferro) e a ceruplasmina.

Enzima antioxidante mais importante é a superóxidodismutase (SOD). Sua única função é transformar o perigoso radical livre superóxido até peróxido de hidrogênio (que é mais seguro). As enzimas catalase e glutatión peroxidase decompõe este peróxido de hidrogênio até água e oxigênio.

Pelos trabalhos pesquisados conclui-se que há um declínio da atividade enzimática com a idade e estas mudanças são dependentes da região pesquisada e variam para cada tipo de enzima.

Os radicais livres mais importantes são o radical hidroxil ($\text{OH}^\cdot$) e o ânions superóxido ($\text{O}_2^\cdot$), tendo ainda o H_2O_2 , o malondialdeído e o óxido nítrico.

A ação destes radicais na peroxidação lipídica, á exhaustivamente analisada pelos pesquisadores, concluindo-se que certamente estes radicais especialmente as espécies reativas do oxigênio originam peróxidos lipídicos pela ação nos ácidos graxos poliinsaturados especialmente das membranas originando quebra na cadeia do DNA, por mutações, deleções, amplificações e rearranjos.

As espécies reativas do oxigênio, segundo os pesquisadores, com certeza estão associadas a carcinogênese e a outras condições fisiopatológicas, e portanto eliminando ou inativando tais espécies ou ainda inibindo sua geração em excesso, pode-se conseguir benefícios na redução do câncer e outras doenças degenerativas.

Nos trabalhos verificados vários carcinógenos foram relatados, em maior ou menor grau, como formadores de radicais livres no organismo; entre eles substâncias químicas como o cromo e o níquel, partículas do ar, fumaça do cigarro, radiação ultravioleta, consumo exagerado de álcool, exercícios físicos de maneira não adequada, consumo exagerado de alguns alimentos (como a carne) e o não consumo de outros (como os vegetais, fibras e frutas).

É muito aceita a hipótese que a incidência de muitos tipos de câncer que afetam as sociedades ocidentais poderia ser reduzida através de modificações nos hábitos alimentares.

Uma alta ingestão de gordura quase sempre implica numa baixa ingestão de fibras, e para alguns pesquisadores talvez os efeitos maléficos observados sejam justamente causados por esta baixa ingestão de fibras e não pela ingestão de gordura, e há indícios fortes e de aceitação geral, que associam as dietas com alto teor em fibras com a baixa incidência do câncer e outras doenças intestinais.

Ficando claro também que a ação dos carcinógenos oxidantes, resulta da superposição de efeitos genéticos e epigenéticos.

Pelos trabalhos revistos percebe-se que a quantidade de pesquisas em andamento sobre o câncer em geral é enorme, e cada uma contribui para aumentar a compreensão do assunto, mas atualmente a questão dos radicais livres e o câncer vêm sendo bastante abordados.

Vários pesquisadores especialmente o Instituto Nacional do Câncer nos Estados Unidos, vem realizando inúmeras pesquisas em diferentes abordagens, como melhores terapias de tratamento (visando a melhoria do estado geral do paciente), novas alternativas de quimioterapia mais direcionada, poupando as células normais, a terapia genética (aumentar a quantidade de superóxido-dismutase nas células cancerosas), análise profunda das causas do

estresse oxidativo sobre os fatores de transcrição, terapias fotodinâmicas (uso da luz e de drogas sensíveis à luz), entre outras.

Um conhecimento maior a respeito do balanço oxidativo (que governa a saúde da maioria das células), certamente levará a habilidade para senão corrigir, pelo menos melhor proteger estas células, uma vez que danos celulares estão presentes na maioria das principais doenças tais como diabetes, doenças degenerativas, cardiovasculares, envelhecimento e são fatais no câncer.

A busca por novas alternativas de tratamento, tem levado a pesquisa de milhares de plantas, vegetais e frutas como possíveis alternativas futuras.

O papel dos constituintes antioxidantes das plantas, tem se mostrado fundamental na manutenção da saúde, sendo muito benéfico no tratamento do câncer e de muitas outras doenças degenerativas e se tem atribuído esta função a propriedade varredora de radicais livres.

É muito grande o número de plantas pesquisadas, e muitas plantas que tem apresentado atividade citotóxica, antitumor ou anticancer, e os autores atribuem esta atividade aos constituintes antioxidantes, que ao exercerem seu potencial como antioxidantes o fazem pela capacidade varredora de radicais livres, pela propriedade ativadora das enzimas antioxidantes endógenas, por agirem com agentes queladores de metais tais como ferro e cobre (pró-oxidantes), impedindo a ativação celular de algumas enzimas intimamente conectadas a ativação celular, desta maneira contribuindo para que não ocorra reação oxidativa em cadeia, e assim protegendo as células e especialmente o DNA.

A capacidade antioxidante, mostrou-se dependente da estrutura química (substituintes, local de substituição, e natureza da aglicona) do composto antioxidante, e quase sempre esta atividade isolada é menor se comparada a atividade total antioxidante da planta de onde ele foi retirado, sugerindo que o efeito substancial protetor deva ser o resultado de uma interação entre os componentes bioativos ou com outros componentes ainda desconhecidos na planta.

Algumas plantas encontradas nos trabalhos pesquisados como potentes antioxidantes ou com atividade anticancer comprovada, estão listadas a seguir:

Hippophae rhamnoides, *Artemisia douglasiana*, *Pothomorphe umbellata*, *Piper regnellii*, *Achillea millefolium*, *Diplazium esculentum*, *Sauropous androgynus*, *M.utilissima*, *Morinda morindoides*, *Zingiber officinale*, *Rosmarinus officinalis*, *Cúrcuma longa*, *Areca cathecu*, *Rhodiola sacra*, *Artemisia arborescens*, *Colycotome villosa*, *Daphne gnitium*, *Eucalyptus globulus*, *Panax pseudoginseng*, *Thymus zygis*, *Cistanche*, *Ginkgo biloba*, *Paemus*

boldo, Salvia miltorrhiza, Prunus cerasus, Camellia sinensis, Asparagus racemosus, Cnidoscolus chayamansa, Cnidoscolus aconitifolius, Cynara scolymus, Achyrocline satureioides, Helichrysi flos, Garcinia kola, Wilbrandia verticillata, Podophyllum hexandrum, Camptotheca acuminata, Elaies guinensis.

O poder antioxidante do ácido fítico, dos tomates, da própolis, e das frutas cítricas, foram revisados havendo correlação nos trabalhos, com alguma melhora no tratamento de doenças degenerativas e câncer.

Portanto ao menos do ponto de vista da hipótese oxidativa da carcinogênese, que hoje é considerada como responsável em grande número de casos de câncer, doenças degenerativas, problemas cardíacos (onde o estresse oxidativo é considerado causador de danos celulares) os antioxidantes podem ser promissores agentes anticancer, (por causarem proteção às células) sejam como novos produtos a serem pesquisados como drogas para novas terapias, através de manipulação em sua estrutura química, ou seja mesmo através de uma complementação dietária.

Considerando-se também que o consumo de frutas e vegetais contendo antioxidantes, comprovadamente mostraram ser benéficos para a manutenção do balanço oxidativo no organismo, e com isto agem contribuindo para a inibição do câncer.

Tendo em vista que os estudos sobre câncer envolvem cada vez maior número de profissionais, qualquer novo fato é de grande valia para pelo menos poder proporcionar um aumento no bem-estar do estado geral do paciente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Carvalho-Filho, E. T.; Papaléo-Neto, M. *Geriatrics: Fundamentos, clínica e terapêutica*; Atheneu: São Paulo, 2000a.
- (2) Montoro, A. F.; Nogueira, D. P. *Meio ambiente e câncer*; CNPq: Brasília, 1983.
- (3) Franks, L. M.; Teich, H. *Introdução à biologia celular e molecular do câncer*; Roca, 1990.
- (4) Fentiman, I. *Diagnóstico e tratamento do câncer inicial de mama*; Artes Médicas: Porto Alegre, 1993.
- (5) Vohra, B. P. S.; Sharma, S. P.; Kansal, V. K. *Pharmaceutical Research* **1999**, 40, 497-502.
- (6) Knight, J. A. *Advanced Clinical Chemistry* **2000**, 35, 1-62.
- (7) Mates, J. M.; Sanches, F. M. J. *Journal of Biochemistry and cellular biology* **2000**, 32, 157-170.
- (8) Carvalho-Filho, E. T.; Papaléo-Neto, M. *Geriatrics: Fundamentos, clínica e terapêutica*; Atheneu: São Paulo, 2000c.
- (9) Cooper, G. M. *Elements of human cancer*; Jones and Bartlett, 1994.
- (10) Evans, W. C. *Trease and Evan's Pharmacognosy*; 14 ed.; W.B. Saunders: London, 1996.
- (11) Ansel, H. C. *Introduction to pharmaceutical dosage forms*; 3 ed.; Lea and Febinger: Philadelphia, 1981.
- (12) Povoas-Filho, H. *Radicals livres em Patologia humana*; Imago: Rio de Janeiro, 1995.
- (13) Cotran, R. S.; Kumar, V.; Robbins, S. L. *Pathologic Basis of Disease*; W.B. Saunders: Philadelphia, 1994.
- (14) Roitt, I. M. *Imunologia*; 5 ed.; Atheneu: São Paulo, 1999.
- (15) Harris, H. *The cells of the body: A history of somatic cell.*; Spring Harbor Laboratory: New York, 1995b.
- (16) Lewin, B. *Gene V*; Oxford University: New York, 1994.
- (17) Raw, I.; Brentani, M.; Brentani, R.; al., e. *Bases Moleculares da Medicina: Câncer*; Atheneu: São Paulo, 1992; Vol. 3.
- (18) Strachan, T.; Read, A. P. *Human Molecular Genetics*; Bios Scientific: New York, 1998.
- (19) Uzunian, A.; Birner, E. *Biologia*; 2 ed.; Harbra: São Paulo, 2004.
- (20) Gardner, E. J.; Snustad, D. P. *Genética*; 7 ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1986.
- (21) Friedberg, E. C.; Walker, G. C.; Siede, W. *DNA Repair and Mutagenesis*; ASM: Washington, 1995.
- (22) Harris, H. *The cells of the body A history of somatic cell.*; Spring Harbor Laboratory: New York, 1995a.
- (23) Upadhyay, D.; Panduri, V.; Kamp, D. W. *American Journal Respiratory cell and Molecular* **2003**, 29, 180-187.
- (24) Leonard, S. S.; Wang, S. S.; Jordan, B. S.; al., e. *Toxicology* **2000**, 150, 147-157.
- (25) Castro, G. D.; Delgado-de-Layno, A. M.; Costantini, M. H.; al., e. *Journal of Toxicology* **2001**, 160, 11-18.
- (26) Repetto, M. G.; LLeusy, S. F. *Brazilian Journal Medical and Biological research* **2002**, 5, 523-534.

- (27) Lederer, J. *Alimentação e câncer*; Manole Dois: São Paulo, 1990.
- (28) Chatgilialiglu, C.; O'Neill, P. *Exper. Gerontol.* **2001**, 36, 1459-1471.
- (29) Vos, J. M. H. *DNA Repair mechanisms: Impact on human diseases an cancer.*; R.G.Landes: Austin, 1995.
- (30) Gros, L.; Sapparbaev, M. K.; Laval, J. *Oncogene* Paris, 2002; Vol. 16.
- (31) White, A.; Handler, P.; Smith, E. *Princípios de Bioquímica*; 5 ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1976.
- (32) Ray, G.; Hussain, S. A. *Journal of experimental Biology* **2002**, 40, 1213-1232.
- (33) Dreher, D.; Junod, A. F. *European Journal Cancer* **1996**, 32, 308.
- (34) Junod, A. F. *Bulletin of European Physiopathology Respiratory* **1986**, 22, 253-255.
- (35) Okada, S. *Journal of Pathology International* **1996**, 46, 311-332.
- (36) Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; al., e. *Harper: Bioquímica*; 8 ed.; Atheneu: São Paulo, 1998.
- (37) Cerutti, P.; Ghost, R.; Oya, Y.; al., e. *Journal of Enviroment and Health Perspective* **1994**, 102, 123-129.
- (38) Hiramatsu, M.; Velasco, R. D.; Packer, L. *Free radical and Biological Medicine.* **1990**, 9, 459-464.
- (39) Burkhardt, S.; Reiter, R. J.; D.X.Tan; al., e. *The International journal of Biochemistry and Cellular Biology.* **2001**, 33, 775-783.
- (40) Conte, D.; Narindrasorasak, S.; Sarkar, B. *Journal of Biology, Biochemistry and Molecular Biology* **1996**, 271, 5125-5130.
- (41) Nogues, M. R.; Giralt, M.; Cervello, I.; al., e. *Journal Investigation of dermatology* **2002**, 119, 645-652.
- (42) Lourdes, C. B.; González, L.; Garrido, A.; al., e. *Revista Cubana Investigacinones Biomedicas* **2001**, 20, 48-53.
- (43) Middleton, E. J. *Adavanced Experimental medicine and biology* **1998**, 175-182.
- (44) Pietta, P. G. *Journal of Natural Products* **2000**, 63, 1035-1042.
- (45) Blasiak, J.; Arabski, M.; Pertynski, T.; al., e. *Cellular and Biologic Toxicology* **2002**, 18, 279-288.
- (46) Geetha, S.; Ram, M. S.; Singh, V.; al., e. *Journal of Ethnopharmacology* **2002**, 79, 373-378.
- (47) Barros, S. B.; Teixeira, D. S.; Aznar, A. E.; al., e. *Cientific culture* **1996**, 48, 114-116.
- (48) Cimanga, K.; de-Brunye, T.; Hu, J. P.; al., e. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **1999**, 5, 419-424.
- (49) Lee, K. K.; Choi, J. D. *International journal of cosmetic science* **1999**, 21, 275-284.
- (50) Ohsugi, M.; Fan, W.; Hase, K.; al., e. *Journal of Ethnopharmacology* **1999**, 67, 111-119.
- (51) Ferreira, J. L.; Pedroso, P. B.; Lemos, C. E.; al., e. *Revista Científica farmacêutica* **1999**, 20, 449-458.
- (52) Rahmat, A.; Kumar, V.; Fong, L. M.; al., e. *Asia Pacific journal and clinic nutrition* **2003**, 12, 292-295.
- (53) Liu, N.; Huo, G. *Wei Sheng Yan jiu* **2003**, 32, 22-23.
- (54) Leal, P. F.; Braga, M. E.; Sato, D. N.; al., e. *Journal of agricultur and food chemistry* **2003**, 23, 2520-2525.
- (55) Dessi, M. A.; Deiana, M. *Phytotherapy Research* **2001**, 15, 511-518.
- (56) Chan, P.; Tomlinson, B. *Journal of clinical pharmacology* **2001**, 40, 457-461.
- (57) Yodim, K. A.; Deans, S. G.; Finlayson, H. J. *Journal of essencial oil research* **2002**, 14, 210-215.
- (58) Wang, X. W.; Li, L. L.; Muhuyati; al., e. *Journal of Chinese Materia Medica* **1998**, 23, 554-555.
- (59) Shi, H.; Nikki, E. *Lipidis* **1998**, 33, 365-370.

- (60) Xu, A. H.; Chen, H. S.; Wang, L.; al., e. *Journal Chinese materia medica* **1998**, 23, 746-747.
- (61) Lee, J. M.; Kuwon, H. *Phytoterapy research* **2001**, 15, 245-249.
- (62) Speisky, C.; Cassels, B. K. *Pharmacology research* **1994**, 29, 1-12.
- (63) Cao, E. H.; Liu, X. Q. *Free radical and Biological Medicine*. **1996**, 20, 801-806.
- (64) Jin, L.; Ming, S. H.; Nam, O. C. *Life science* **2001**, 69, 1883.
- (65) Liu, J.; Yang, C. F. *Life science* **2001**, 69, 309-326.
- (66) Giovannucci, E. *Journal of national cancer Institute* **1999**, 91, 317-331.
- (67) Booth, L.; Gilmore, I. T.; Bilton, R. F. *Free radical and Biological Medicine*. **1997**, 26, 135-144.
- (68) Haeghele, A. D.; Briggs, S. P.; Thompson, H. J. *Free radical and Biological Medicine*. **1994**, 16, 111-115.
- (69) Graft, E.; Eaton, J. W. *Free radical and Biological Medicine*. **1990**, 8, 61-69.
- (70) Mccall, M. R.; Frei, B. *Free radical and Biological Medicine*. **1999**, 26, 934-1053.
- (71) Martinez, I. V.; Periago, J. M.; Gaspar, R.; al., e. *Archivo Latinoamericano de Nutricion* **2000**, 50, 5-18.
- (72) Silalahi, J. *Asia Pacific journal and clinic nutrition* **2002**, 11, 70-84.
- (73) Bonina, F.; Saija, A.; Tomaino, A.; al., e. *International journal of cosmetic science* **1998**, 20, 331-342.
- (74) Osawa, T. *Cosmetic and toiletries*. **1994**, 109, 77-81.
- (75) Jaiswal, A. K.; venugo, R.; Mucha, J.; al., e. *Cancer research* **1997**, 53, 440-446.
- (76) Matsuno, T.; Jung, S. K.; Matsumoto, Y.; al., e. *Anticancer research* **1997**, 17, 3565-3568.
- (77) Okonenko, L. B. *Vopr. Med. khim.* **1986**, 32, 45-48.
- (78) Rao, C. V.; Desai, D.; Rivenson, A.; Simi, B.; Amin, S.; Reddy, B. S. *Cancer research* **1995**, 55, 2310-2315.
- (79) Scheller, E.; Nolewajka, E.; Pnasiwicz, M.; al., e. *Arzneimittelforschung* **1977**, 27, 1517-1518.
- (80) Strehl, E.; Volpert, R.; Elstner, E. F. *Z. naturforsch (C)* **1994**, 49, 39-43.
- (81) Sud'ina, G. F.; Mirzoeva, O. K.; Pushkareva; al., e. *Febs. Lett.* **1993**, 329, 21-24.
- (82) Yamada, J.; Tomita, Y. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*. **1996**, 60, 328-329.
- (83) Su, Z. Z.; Lin, J.; Prewett, M.; al., e. *Anticancer research* **1994**, 15, 1841-1848.
- (84) Wang, Y.; Catana, F.; Yang, Y.; al., e. *Journal of agriculture and food chemistry* **2002**, 30, 431-435.
- (85) Kuo, P. L.; Chiang, L. C.; Lin, C. C. *Life science* **2002**, 22, 23-24.
- (86) Hawkins, E. *Nature and pharmacology* **2000**, 4, mar.
- (87) Katiyar, S. K.; Mukhtar, H. T. *Journal cell. biochem. suppl.* **1997**, 59-67.
- (88) Ahn, W. S.; Huh, S. W.; Bae, S. M.; al., e. *DNA cell biology* **2003**, 22, 217-224.
- (89) Brown, M. D. *Alternative medicine revision* **1999**, 4, 360-370.
- (90) Malik, A.; Azam, S.; Hadi, N. *Phytoterapy research* **2003**, 17, 358-363.
- (91) Sachiro, O.; Masami, S.; Yoko, I.; al., e. *Biological and pharmaceutical bulletin*. **2001**, 24, 1145-1148.
- (92) Kamat, J. P.; Bloor, K. K.; Gayam, D. M.; al., e. *Journal of Ethnopharmacology*. **2000**, 71, 425-435.
- (93) Kuti, J. O.; Konoru, H. B. *Journal of agriculture and food chemistry* **2004**, 52, 117-121.
- (94) Nyska, A. S.; Bakshi, S.; Lomnitski, L.; al., e. *Toxicology and Pathology* **2003**, 31, 39-51.
- (95) Lomnitski, L.; Bergman, M.; Nyska, A.; al., e. *Nutrition and cancer* **2003**, 46, 202-231.

- (96) Wang, M.; Simon, J. E.; Aviles, F. I.; al., e. *Journal of agricultural and food chemistry* **2003**, *51*, 601-608.
- (97) Mingfu, W.; Simon, J. E.; Aviles, I. F.; al., e. *Journal of agriculture an food chemistry* **2003**, *51*, 601-608.
- (98) Desmacheller, J. C.; Coussio, J.; Ciccía, G. *Brazilian Journal Medical and Biological research* **1998**, *31*, 1163-1170.
- (99) Czinner, E.; Hagy, M. K.; Blazovics, A.; al., e. *Journal of Ethnopharmacology* **2001**, *77*, 31-35.
- (100) Iarombi, E. O.; Akani, O.; Emerole, G. O. *Pharmaceutical Biology* **2002**, *40*, 107-116.
- (101) Bacallao, G.; Dominguea, R.; Mercedes, D.; al., e. *Revista Cubana Investigacinones Biomedicas* **2002**, *21*, 214-216.
- (102) Araújo, M. C.; Dias, F. d.-L.; Kronka, S. N.; al., e. *Genetic and molecular biology* **1999**, *22*, 407-413.
- (103) Rao, V. S. N.; Almeida, F. R. C.; Moraes, A.; al., e. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz* **1991**, *86*, 43-45.
- (104) Mittal, A.; Pathania, V.; Agrawala, P. K.; al., e. *Journal of Ethnopharmacology* **2001**, *76*, 253-262.
- (105) Xu, B.; al., e. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz* **1991**, *86*, 51-54.