

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARINA TOLEDO SCOPARO

**EFEITOS DA HISPIDULINA
SOBRE O METABOLISMO OXIDATIVO E A VIABILIDADE DE
CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO (HepG2)**

**CURITIBA
2012**

CARINA TOLEDO SCOPARO

**EFEITOS DA HISPIDULINA
SOBRE O METABOLISMO OXIDATIVO E A VIABILIDADE DE
CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO (HepG2)**

Dissertação de mestrado apresentado ao
Colegiado do Curso de Pós-Graduação em
Ciências-Bioquímica do Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Profa. Dra. Maria Eliane Merlin
Rocha

Co-Orientação: Profa. Dra. Sheila Maria. B.

Winnischofer

CURITIBA
2012

TERMO DE APROVAÇÃO

CARINA TOLEDO SCOPARO

EFEITOS DA HISPIDULINA


**SOBRE O METABOLISMO OXIDATIVO E A VIBILIDADE DE CÉLULAS DE
HEPATOMA HUMANO (HepG2)**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



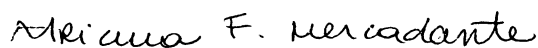
Profa. Dra. Maria Eliane Merlin Rocha

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR



Profa. Dra. Juliana Bello Baron Maurer

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR



Profa. Dra. Adriana Frohlich Mercadante

Departamento de Patologia Básica, UFPR

Curitiba, 28 de fevereiro de 2012

Dedico esse trabalho de mestrado aos meus amados pais, José Roberto Scoparo e Tânia Scoparo, à minha amada irmã gêmea Camila Toledo Scoparo, à minha irmã de coração Normanda Souza Melo e a todos os amigos que contribuíram de alguma forma para que esse objetivo fosse alcançado. Vocês tornaram possível a realização de um sonho, e de forma ativa participaram da concretização desta conquista, a vocês eu dedico o meu eterno amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos que estiveram ao meu lado e me ajudaram de alguma forma em todas as etapas do meu mestrado.

À Profa. Maria Eliane, pela orientação, confiança, conversas, conselhos e liberdade que me foi concedida nesses dois anos;

À Profa. Sheila pela co-orientação, correções, dicas, enfim, tudo que me ajudou;

Aos meus pais José Roberto Scoparo e Tânia Scoparo que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando, mesmo à distância, em todos os momentos de minha vida, que compartilharam comigo minhas vitórias e me deram força nos momentos em que mais precisei, devo toda minha vida e faço tudo que for preciso para estar com eles;

À minha irmã Camila Scoparo por ser minha metade, por ser essa pessoa que eu não vivo sem, meu tudo, minha vida, desde sempre e pra sempre;

À Normanda (nenenzinha) minha irmãzinha de coração;

Ao Gláucio, Fernanda, Paulo, Thiago, Andréia, Beth, pelas imensas ajudas sempre que precisei;

À todos os meus amigos da vida;

A toda minha família por todo amor e apoio.

Aos meus amigos da Bioquímica no geral, que de alguma forma fizeram parte de alguns momentos ou que me ajudaram de alguma forma neste período;

Aos colegas dos laboratórios pelos momentos passados juntos: Anninha, Patty, Jú, Carol...

Aos coordenadores do Curso de Pós-Graduação, Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá e Prof^a Dr^a Sílvia M. Cadena por toda dedicação prestada a nós.

.A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR.

À CAPES, Fundação Araucária e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é a mais comum neoplasia maligna primária do fígado em todo o mundo, com opções limitadas de tratamento. Os flavonóides são um grupo de compostos polifenólicos com muitas atividades biológicas, incluindo propriedades antitumorais. Embora os efeitos antitumorais de alguns flavonas já estão descritos em alguns tipos de tumores, os efeitos da hispidulina (5,7,4'-tri-hidroxi-6-metoxiflavona) em células de hepatoma humano HepG2 ainda não foram descritas. Assim, os objetivos desse trabalho foram em células de CHC avaliar os efeitos da hispidulina sobre: a) viabilidade celular; b) ciclo celular c) níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) intracelular; d) viabilidade na presença de N-acetilcisteína; e) níveis de glutathione e f) expressão das enzimas antioxidantes. Através do método do MTT verificou-se que hispidulina é capaz de reduzir a viabilidade celular das células HepG2 de maneira dependente da dose e do tempo, observando-se uma redução de 24%, 45% e 53% nas doses de 50, 100 e 200 μM respectivamente após 24 horas de incubação; 36%, 51% e 68% respectivamente após 48 h e 60%, 82% e 91% respectivamente após 72 h de tratamento. Para avaliar alterações no ciclo celular, realizou-se um ensaio utilizando citometria de fluxo, onde observou-se que após tratamentos com hispidulina (50 e 100 μM , 24 h) houve um aumento da fase subG1 de 69% e 93% respectivamente, assim como uma diminuição de 13% e 20% nas mesmas doses na fase G1. Para avaliar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) utilizou-se a sonda DCFH-DA e foi constatado que após tratamento com hispidulina (50 e 100 μM) por 24 horas houve um aumento de 49% e 61% respectivamente, após 48 horas o aumento foi de 55% e 122%, e após 72 horas o aumento foi de 92% e 177% respectivamente. O aumento dos níveis de ERO pode gerar um dano oxidativo à membrana mitocondrial e esse dano pode levar à morte celular por apoptose. Para confirmar o envolvimento do aumento de ERO na indução de morte celular, realizou-se a análise da viabilidade (MTT) na presença de hispidulina com um tratamento simultâneo com um antioxidante (N-acetilcisteína - NAC) e verificou-se que após tratamento com a hispidulina (50 μM , 24 h) houve uma redução de 28% na viabilidade celular, quando adicionou-se NAC nas concentrações de 5 e 10 mM, estas reduções foram de 22% e 14% respectivamente. Após o tratamento com hispidulina (100 μM) a redução de viabilidade foi de 36%, porém com a adição de NAC 5 e 10 mM essas reduções foram de 23% e 17% respectivamente quando o dobro da concentração de NAC (10 mM) foi utilizado, indicando que a adição de NAC protege contra a morte celular. Nos experimentos para avaliar os níveis de glutathione total (GSH) e a relação GSH/GSSG, utilizou-se análise espectrofotométrica e observou-se uma diminuição significativa dos níveis de GSH de 43% e 52% após o tratamento com a hispidulina (50 e 100 μM , 24 h). Foi visto também uma diminuição de 36% e 46% respectivamente na relação GSH/GSSG, o que indica uma diminuição das defesas antioxidantes celulares. Os níveis de ERO também podem ser afetados pelas atividades de enzimas antioxidantes, para essa análise utilizando-se RT-PCR, foi possível observar que os níveis de mRNA da enzima catalase diminuíram significativamente em 38 e 40% nas doses de 50 e 100 μM respectivamente. Conjuntamente, os resultados parecem indicar que a hispidulina pode ter um potencial para novos estudos visando o tratamento do carcinoma hepatocelular.

Palavras-chave: hispidulina, HepG2, ERO, NAC, enzimas antioxidantes

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary malignancy of the liver in the world, with limited therapeutic options. Flavonoids are a group of polyphenolic compounds with many biological activities, including antitumor properties. While the antitumor effects of some flavones are already described in some types of tumors, the effects of hispidulin (5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavone) in HepG2 human hepatoma cells have not been described. The objectives of this study were in HCC cells to evaluate the effects of hispidulin on: a) cell viability b) cell cycle c) levels of reactive oxygen species (ROS) intracellular, d) viability in the presence of N-acetylcysteine; e) levels of glutathione and f) expression of antioxidant enzymes. By the MTT method it was found that hispidulin is capable of reducing cell viability of HepG2 cells in a manner dependent on dose and time, observing a reduction of 24%, 45% and 53% at doses of 50, 100 and 200 μM , respectively, after 24 hours of incubation, 36%, 51% and 68% after 48 hours and 60%, 82% and 91% respectively after 72 h of treatment. To assess alterations in cell cycle, a test was carried out using flow cytometry, where it was observed that after treatment with hispidulin (50 and 100 μM , 24 h) an increase in the phase subG1 69% and 93% respectively, and as a decrease of 13% and 20% tables doses in G1 phase. To assess the levels of reactive oxygen species (ROS) used the probe DCFH-DA and it was found that after treatment with hispidulin (50 and 100 μM) for 24 hours there was an increase of 49% and 61% respectively after 48 hours, the increase was 55% and 122% after 72 hours and increased by 92% and 177% respectively. The increased levels of ROS can cause oxidative damage to mitochondrial membrane and this damage can lead to cell death by apoptosis. To confirm the involvement of reactive oxygen species increase in the induction of cell death, there was consideration of the viability (MTT) in the presence of hispidulin with simultaneous treatment with an antioxidant (N-acetylcysteine - NAC) and it was found that after treatment with the hispidulin (50 μM , 24 h) there was a 28% reduction in cell viability when NAC was added at concentrations of 5 and 10 mM, these reductions were 22% and 14% respectively. After treatment with hispidulin (100 μM) the reduction of viability was 36%, but with the addition of NAC (5 e 10 mM) these reductions were 23% and 17% respectively when twice the concentration of NAC (10 mM) was used, indicating that the addition of NAC protects against cell death. In experiments to assess the levels of total glutathione (GSH) and GSH / GSSG, spectrophotometric analysis was used and there was a significant decrease in GSH levels of 43% and 52% after treatment with hispidulin (50 and 100 μM , 24 h). It has also been a decrease of 36% and 46% respectively in the GSH / GSSG ratio, which indicates a decrease in cellular antioxidant defenses. The levels of ROS can also be affected by the activities of antioxidant enzymes, for this analysis using RT-PCR, we observed that the mRNA levels of catalase significantly decreased in 38 and 40% at doses of 50 and 100 μM respectively. Together, the results seem to indicate that hispidulin may have a potential for new studies to the treatment of hepatocellular carcinoma.

Keywords: hispidulin, HepG2, ROS, NAC, antioxidant enzymes

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|---|----|
| FIGURA 1 – | FASES DO CICLO CELULAR..... | 20 |
| FIGURA 2 – | REAÇÕES DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES: A) SUPERÓXIDO DISMUTASE, B) CATALASE, C) GLUTATIONA PEROXIDASE E D) GLUTATIONA REDUTASE..... | 24 |
| FIGURA 3 – | ESQUEMA GERAL PARA A INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ATRAVÉS DA VIA DE SINALIZAÇÃO KEAP1-NRF2-ARE..... | 26 |
| FIGURA 4 – | ESTRUTURA GERAL DOS FLAVONÓIDES COM ANEL C.... | 28 |
| FIGURA 5 – | ESTRUTURA QUÍMICA DAS PRINCIPAIS CLASSES DE FLAVONÓIDES..... | 29 |
| FIGURA 6 – | ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUMAS FLAVONAS..... | 34 |
| FIGURA 7 – | FÓRMULA ESTRUTURAL DA HISPIDULINA..... | 41 |
| FIGURA 8 – | FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL..... | 44 |
| FIGURA 9 – | EFEITO DA HISPIDULINA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS – MTT..... | 55 |
| FIGURA 10 – | EFEITO DA HISPIDULINA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS – CRISTAL VIOLETA..... | 56 |
| FIGURA 11 – | EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE AS FASES DO CICLO CELULAR EM CÉLULAS HepG2..... | 59 |
| FIGURA 12 – | EFEITO DA HISPIDULINA SOBRE OS NÍVEIS DE ERO INTRACELULAR EM CÉLULAS HepG2 NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS..... | 62 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 13 - EFEITO DA HISPIDULINA E NAC SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HEPG2 APÓS DE 24 HORAS DE TRATAMENTO..... | 64 |
| FIGURA 14 - EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE OS NÍVEIS DE GLUTATIONA TOTAL E RELAÇÃO GSH/GSSG | 67 |
| FIGURA 15 - EFEITOS DA HISPIDULINA NOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE mRNA DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES | 70 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| TABELA 1 – | SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DOS PRIMERS UTILIZADOS PARA RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL..... | 52 |
| TABELA 2 – | COMPARAÇÃO DOS EFEITOS PROMOVIDOS PELA HISPIDULINA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 UTILIZANDO-SE OS MÉTODOS DO MTT E CRISTAL VIOLETA..... | 57 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS E TERMOS*

Compostos

| | |
|-------------------------------|--|
| ADP | - Adenosina 5'-difosfato |
| ATP | - Adenosina 5'-trifosfato |
| SFB | - Soro fetal bovino |
| DMSO | - Dimetilsulfóxido |
| ERO | - Espécies reativas de oxigênio |
| Gpx | - Glutaciona peroxidase |
| Gred | - Glutaciona redutase |
| GSH | - Glutaciona reduzida |
| Glc | - Glucose |
| GSSG | - Glutaciona oxidada |
| CAT | - Catalase |
| SOD | - Superóxido dismutase |
| H ₂ O ₂ | - Peróxido de hidrogênio |
| MTT | - Brometo de 3-(4,5-demitiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio |
| DCFH-DA | - 2',7'-diclorofluorescina diacetato |
| DCFH | - 2',7'-diclorofluorescina |
| DCF | - 2',7'-diclorofluoresceína |
| VP | - 2-Vinilpiridina |
| NADH | - Nicotinamida adenina dinucleotideo reduzida |
| $\cdot\text{O}_2$ | - Radical superóxido |
| BSA | - Albumina bovina sérica |

| | |
|------|------------------------------------|
| TRIS | - Tris (hidroximetil) amino metano |
| TFA | - Ácido trifluoracético |
| NAC | - N-acetilcisteína |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 2.1 CARCINOMA HEPATOCELULAR | 17 |
| 2.2 PRINCIPAIS ALVOS DOS COMPOSTOS ANTITUMORAIS | 19 |
| 2.2.1 CICLO CELULAR | 19 |
| 2.2.2 RADICAIS LIVRES E DEFESAS ANTIOXIDANTES | 22 |
| 2.3 FLAVONÓIDES | 27 |
| 2.3.1 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS FLAVONÓIDES | 29 |
| 2.3.2 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE | 32 |
| 2.3.3. FLAVONAS E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS SOBRE CÉLULAS TUMORAIS | 34 |
| 2.3.4 HISPIDULINA E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS | 40 |
| 4. OBJETIVOS | 43 |
| 5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL | 44 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS | 45 |
| 5.1. REAGENTES | 45 |
| 5.2 PREPARO DA HISPIDULINA | 45 |
| 5.3 CÉLULAS | 45 |
| 5.4 ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS | 46 |
| 5.5 SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA | 46 |
| 5.6 PROCEDIMENTOS DE CULTIVO | 47 |
| 5.7 ENSAIOS EM CÉLULAS | 48 |
| 5.7.1 EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2 | 48 |
| 5.7.2 NÍVEIS INTRACELULARES DE ERO | 49 |
| 5.7.3 VIABILIDADE NA PRESENÇA DE N-ACETILCISTEÍNA (NAC) | 50 |
| 5.7.4 ANÁLISE DO CICLO CELULAR | 50 |
| 5.7.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES | 50 |
| 5.7.5.2 ISOLAMENTO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA | 51 |
| 5.7.5.3 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE mRNA POR REAL-TIME RT-PCR | 51 |
| 5.7.6 DETECÇÃO DE GLUTATIONA TOTAL E GLUTATIONA OXIDADA (GSSG) | 52 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 54 |
| 6.1 EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR HEPG2 | 54 |
| 6.1.1. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR DETERMINADA PELO ENSAIO DO MTT E CRISTAL VIOLETA | |
| 6.1.3 ANÁLISE DE CICLO CELULAR | 59 |
| 6.1.4 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS INTRACELULARES DE ERO | 61 |
| 6.1.5 VIABILIDADE NA PRESENÇA DE N-ACETILCISTEÍNA (NAC) | 63 |

| | |
|---|-----------|
| 6.1.6 EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE OS NÍVEIS DE GLUTATIONA E SOBRE A RELAÇÃO GSH/GSSG | 66 |
| 6.1.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES | 69 |
| 7. DISCUSSÃO FINAL | 72 |
| 8. CONCLUSÕES | 77 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 78 |

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular (CHC) representa a sexta neoplasia maligna e a terceira causa de morte mais comum relacionada com câncer em todo o mundo (CHA *et al.*, 2010). Nos Estados Unidos e Europa, onde a infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) representa o principal fator de risco, a incidência do CHC tem aumentado e espera-se aumentar ainda mais nas próximas 2 a 3 décadas (BRUNO *et al.*, 1997; TANAKA *et al.*, 2002). Na África subsaariana e em partes da Ásia, é um dos quatro principais tumores malignos em adultos, além de ser um dos tumores cuja incidência mais vem aumentando, principalmente com o aumento da idade dos pacientes. A maioria dos tumores são detectados em estágios intermediários ou avançados, devido ao curto tempo de evolução do hepatocarcinoma. O tempo de duplicação do volume de massa do tumor é em torno de quatro meses (RUSTGI, 1988). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2010), no Brasil esse tumor não entra na lista dos dez mais frequentes; sua taxa pode variar entre 1 a quase 10 casos em 100 mil habitantes, sendo mais comum em homens que em mulheres. Nos locais de baixa incidência, essa doença aparece por volta dos 60-70 anos. Nos locais de maior incidência, o tumor acomete pacientes mais jovens, entre os 30-50 anos. No Paraná, a incidência varia por região, sendo que as regiões norte e centro-oeste são as que apresentam maior incidência, sendo o índice de mortalidade entre 5,3 e 8 indivíduos a cada 100.000 habitantes (SESA/PR, 2003).

Nos últimos anos, o interesse na quimioprevenção do câncer está aumentando, e antimutagênicos e promotores antitumorais estão sendo cada vez mais procurados. Os métodos atuais de tratamento incluem cirurgia, além de quimioterapia e radioterapia, que são métodos citotóxicos que agredem tanto células tumorais quanto células saudáveis. Apesar dos avanços significativos feitos em relação à quimioterapia para o tratamento do carcinoma hepatocelular, as eficácias das drogas são muitas vezes dificultadas por uma série de efeitos colaterais adversos impostos ao paciente, como infecções, sepse/septicemia, anemia, anafilaxia, conjuntivite, hemorragias, náusea/vômito, erosões gástricas, diarreia, entre outros. Uma droga bastante utilizada para o tratamento de tumores malignos por quimioterapia é a doxorubicina, sendo que em câncer de mama, pulmão, bexiga e tireóide a eficácia fica em torno de

16-30% segundo a ANVISA, e em torno de 10% para o CHC (INCA, 2009). Porém a dose utilizada deve ser limitada devido a sua alta cardiotoxicidade (ASHIKAWA, 2004). O uso de agentes citotóxicos no tratamento do CHC tem sido bastante desapontador, com poucos agentes que mostram taxas de resposta (RRs) acima de 20% (NOWAK *et al.*, 2004)

Assim, torna-se importante explorar uma nova abordagem para o desenvolvimento de uma terapia eficaz contra o carcinoma hepatocelular (NOWAK; CHOW, 2004). Nesse contexto, encontram-se os flavonóides, que são metabólitos secundários de plantas. Os flavonóides desempenham um papel fundamental na proteção do vegetal (HEIM *et al.*, 2002; MIDDLETON 2000; HARBORNE, WILLIAMS, 2000) mas também possuem várias propriedades biológicas em células animais. Um número crescente de estudos epidemiológicos sugere que a alta ingestão de flavonóides pode estar relacionada com diminuição do risco de câncer (RUSTGI, 1988; KNOWLES, 1978; AMERIKS 1975). Existem vários relatos na literatura que demonstram os efeitos antioxidantes destes compostos (BURDA; OLESZEK, 2001; BORS; MICHEL; STETTMAIER, 1997; PIETTA, 2000; SASKIA *et al.*, 1996), ou mesmo os efeitos pró-oxidantes gerando espécies reativas de oxigênio e induzindo apoptose de forma dependente da concentração (PAN *et al.*, 2005; QANUNGO *et al.*, 2005), ou ainda podendo atuar como agentes quimiopreventivos, por inibirem a progressão de tumores (HSU *et al.*, 2004). A estrutura química dos flavonóides e a sua concentração são determinantes para obtenção dos efeitos desejados (KUO, 1996). Os flavonóides são divididos em classes de acordo com a sua estrutura química. Entre estas classes encontramos as das flavonas. Várias flavonas como apigenina (4,5,7 – trihidroxiflavona) e luteolina (3',4',5,7-tetrahidroxiflavona) são capazes de induzir apoptose em diversas linhagens de células tumorais (GUPTA *et al.*, 2001; PLAUMANN *et al.*, 1996; CHIANG *et al.*, 2006; YEE *et al.*, 2003) .

Neste trabalho, foi utilizada a hispidulina (5,7,4'-trihidroxi-6-metoxiflavona), uma flavona já estudada anteriormente em nosso laboratório, que possui a capacidade de reduzir o consumo de oxigênio e inibir a atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (DABAGUI-BARBOSA *et al.*, 2005; HERRERIAS, 2005). Outras propriedades biológicas já relatadas sobre essa flavona são: efeitos inibitórios dose dependentes sobre a peroxidação lipídica

(YUTING *et al.*, 1990); atividade pró-oxidante pela capacidade de estimular a degradação de desoxirribose num sistema contendo Fe^{+3} -EDTA na presença de H_2O_2 (SANZ *et al.*, 1994); capacidade de reduzir a viabilidade de células HeLa (DABAGUI-BARBOSA *et al.*, 2005; HERRERIAS, 2005), entre outras. Contudo, ainda não são conhecidos efeitos da hispidulina sobre células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). Desta forma, tendo em vista a ausência de drogas eficazes para o tratamento do hepatocarcinoma e os importantes efeitos biológicos já descritos para essa flavona em outros estudos, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dessa flavona sobre as células de carcinoma hepatocelular (HepG2) para observar se há alterações nos mecanismos oxidativos e a viabilidade dessas células, contribuindo, então, para o melhor entendimento dos mecanismos de ação deste composto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARCINOMA HEPATOCELULAR

O carcinoma hepatocelular (CHC) é a mais comum neoplasia maligna primária do fígado em todo o mundo. É responsável por cerca de 6% de todos os cânceres humanos anualmente (NOWAK; CHOW, 2004) e sua incidência é de 250.000 a 1.000.000 novos casos ao ano (CURLEY *et al*, 1999). Os tumores malignos de fígado podem ser divididos em dois tipos: câncer primário (que tem sua origem no próprio órgão) e secundário ou metastático (originado em outro órgão e que atinge também o fígado). Dentre os tumores originados no fígado, o mais frequente é o hepatocarcinoma ou carcinoma hepatocelular. Este tipo de tumor é agressivo e ocorre em mais de 80% dos casos. Outros tipos de câncer primário de fígado são o colangiocarcinoma (originado nos dutos biliares do fígado), o angiossarcoma (câncer raro que se origina nos vasos sanguíneos do órgão) e o hepatoblastoma, tumor maligno raro que atinge recém-nascidos e crianças nos primeiros anos de vida (RUSTGI, 1988).

O CHC é uma neoplasia com alto potencial para a invasão vascular e metástases para locais distantes. Quando não tratado geralmente leva a morte, como resultado da progressão local do tumor. No entanto, quando há intervenção cirúrgica, há uma diminuição no risco de um posterior surgimento de doença metastática, principalmente quando o tumor pode ser submetido a uma ressecção hepática parcial ou quando o paciente é submetido a um transplante de fígado. O risco de surgimento posterior de doença metastática pode ser previsto no pré-operatório utilizando critérios de imagem base (presença de invasão vascular macular macroscópica e tamanho/número de tumores) (ROYAIE, *et al.*, 2004).

Em torno de 50% dos pacientes com carcinoma hepatocelular apresentam cirrose e hepática, que pode estar, entre outros fatores, associada ao etilismo ou hepatite crônica, sendo que o fator etiológico principal é a infecção pelo vírus da hepatite B (onde há a incorporação do genoma do vírus da hepatite B ao DNA de hepatócitos, aumentando o risco de carcinogênese) (FATTOVICH *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2002; Hepatocentro).

A variabilidade e incidência de câncer de fígado primário é basicamente explicada pela distribuição e história natural do vírus da hepatite B e C. As estimativas do risco atribuível para os efeitos combinados dessas infecções são responsáveis por bem mais de 80% desse tipo de câncer em todo o mundo. Além de que este é o primeiro câncer humano passível de prevenção com a vacina contra os vírus da hepatite B e pode ser feita prevenção também através de triagem do sangue e seus derivados para os vírus da hepatite B e C (BOSCH, *et al.*, 2005).

O serviço de estatística e epidemiologia dos Estados Unidos (SEER) considera que o câncer de fígado é um dos tumores cuja incidência mais vem aumentando. A incidência de carcinoma hepatocelular aumenta progressivamente com a idade dos pacientes, mas o câncer primário do fígado se desenvolve em uma proporção maior de pacientes mais jovens do que a maioria dos outros tumores. Nos EUA e Europa Ocidental, os pacientes com carcinoma hepatocelular estão predominantemente no final da meia idade ou são idosos. Contudo, os pacientes africanos são principalmente adultos jovens e de meia idade, e os pacientes asiáticos são em sua maioria de meia-idade. (RUSTGI *et al.*, 1998). O prognóstico é de sobrevida de cinco anos, com raras exceções. A maioria dos tumores são detectados em estágios intermediários ou avançados, devido ao curto tempo de evolução do hepatocarcinoma. O tempo de duplicação do volume de massa do tumor é em torno de quatro meses. Alguns exames podem auxiliar o médico na confirmação do diagnóstico, como a Tomografia computadorizada, a Ressonância Nuclear Magnética (RNM) e a Laparoscopia. Os métodos de tratamento atual incluem cirurgia (ressecção - método mais indicado), transplante de fígado, a quimioterapia e a radioterapia (LUI, 2011; INCA, 2010).

Segundo o INCA, a doxorubicina é a droga mais usada até o momento na quimioterapia do CHC. É uma droga antineoplásica antraciclínica, produzida pelo fungo *Streptomyces peucelii* var. *caesius* e classificada como agente intercalante que, quando ligada ao DNA, inibe a ação da topoisomerase II (NOVIELLO, *et al.*, 1994; CHABNER, *et al.*, 1996). Alguns dos efeitos colaterais causados pela doxorubicina são: infecção, sepse/septicemia, anemia, anafilaxia, conjuntivite, hemorragias, náusea/vômito, erosões gástricas, diarreia, entre outros (ANVISA). As taxas de respostas giram em torno de 10% para o tratamento de tumores primários. A quimioterapia intra-

arterial possibilita maior concentração da droga no fígado com menor efeito tóxico sistêmico. Muitos laboratórios estão desenvolvendo medicamentos antitumorais, no entanto, as drogas convencionais causam danos não apenas as células tumorais, mas, também, aos tecidos e células não tumorais (OZEKI; NATORI , 2010). Desta forma, os produtos naturais representam uma excelente fonte de substâncias que possuem uma grande variedade de atividades biológicas (CRAGG *et al.*, 2000), incluindo antitumorais, que tem apresentado certa seletividade de efeito indicando uma diferenciação entre células tumorais e não-tumorais (HERREIAS, 2009; VALDAMERI *et al.*, 2011).

2.2 PRINCIPAIS ALVOS DOS COMPOSTOS ANTITUMORAIS

À medida que avançam os estudos sobre o metabolismo e controle da indução de morte de células tumorais, são conhecidos novos possíveis alvos celulares de agentes terapêuticos para o combate ao câncer, entre os principais encontram-se aqueles que afetam o ciclo celular e as defesas antioxidantes. Alterações nas defesas antioxidantes apresentam grande importância para o sucesso na terapia. Alguns dos compostos candidatos a atuarem nas células são os flavonóides, por atuarem em vias de sinalização que medeiam processos celulares, sendo que diversas flavonas já foram estudadas nesse sentido (MA *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2006; VALDAMERI *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2005; LEUNG *et al.*, 2006; HERRERIAS *et al.*, 2009).

2.2.1 Ciclo celular

As células passam por etapas durante seu desenvolvimento, tais como, crescimento (replicação do material genético) e divisão, passos que são capazes de controlar a proliferação celular. Estas etapas são cíclicas, assim, o ciclo celular representa o ciclo vital da célula (GARRETT, 2001). A divisão celular consiste de dois processos consecutivos, caracterizada principalmente pela replicação do DNA e a segregação de cromossomos replicados em duas células separadas. Originalmente, a divisão celular foi dividida em duas etapas: a mitose (M), ou seja, o processo de divisão nuclear, e a intérfase, o intermediário entre as duas fases M. Os estágios da mitose incluem prófase,

metáfase, anáfase e telófase. Sob o microscópio, células em intérfase simplesmente crescem em tamanho, mas diferentes técnicas revelaram que a intérfase inclui as fases G1, S e G2. A replicação do DNA ocorre em uma parte específica da chamada fase S da interfase. A fase S é precedida por um espaço chamado G1, durante o qual a célula está se preparando para a síntese de DNA e é seguido por um espaço chamado G2, durante o qual a célula se prepara para a mitose. As fases G1, S, G2 e M são as subdivisões tradicionais do ciclo celular padrão (Figura 1). Células em G1 podem, antes de se comprometer com a replicação do DNA, entrar em um estado de repouso chamada G0. Células em G0 representam a maior parte das células que estão em não-proliferação no corpo humano (VERMEULEN *et al.*, 2003; BRONSTEIN *et al.*, 2008).

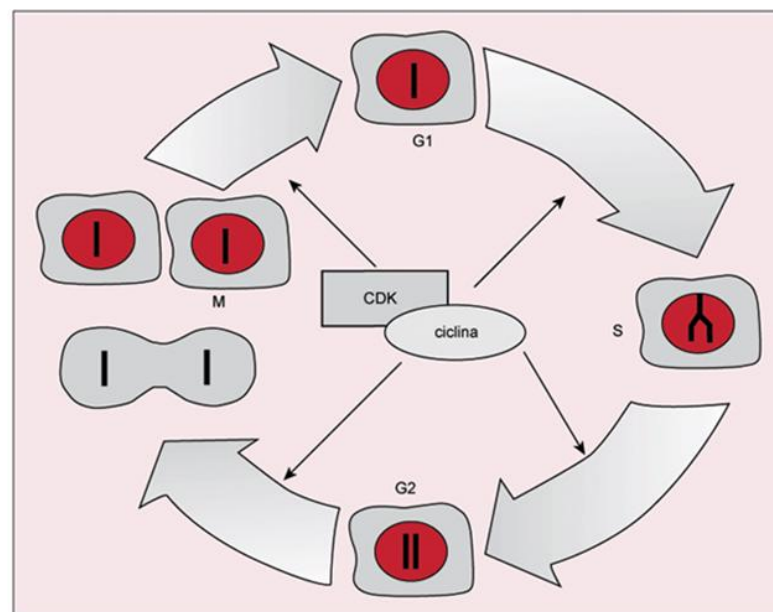


FIGURA 1: FASES DO CICLO CELULAR

FONTE: BRONSTEIN *et al.*, 2008

A transição de uma fase do ciclo celular para outra ocorre de forma ordenada e é regulada por diferentes proteínas celulares. As principais são as quinases ciclina-dependentes (CDK), uma família de proteínas quinases que são ativadas em pontos específicos do ciclo celular. Quando ativada, as CDKs induzem a fosforilação de proteínas selecionadas. A atividade das CDKs pode ser contrabalançada por proteínas celulares inibitórias do ciclo, chamadas inibidoras de CDK (CKI) que se ligam a CDK sozinha ou ao complexo CDK-ciclina e regulam a atividade. As CKIs são reguladas tanto por sinais internos

quanto externos: a expressão da proteína p21 (reguladora da transição da fase G1 para S no ciclo celular) está sob controle transcricional do gene supressor tumoral p53 (importante mediador de apoptose, 'guardião do genoma'). O promotor do gene p21 contém um sítio de ligação p53, que permite que a p53 transcricionalmente ative o gene p21. Uma falha na p53 em transativar a p21 pode levar a proliferação descontrolada da célula (VERMEULEN *et al.*, 2003; YIN *et al.*, 1999; ELBENDARY *et al.*, 1996; MORGAN, 1995).

Controles adicionais ou *checkpoints* são ainda encontrados no ciclo celular, os quais são responsáveis pelo movimento em cada fase do ciclo e de transição de uma fase para a próxima, determinando a progressão ou parada do ciclo (regulação), sendo que determinam se as condições adequadas foram cumpridas antes que ele possa progredir através de um ciclo de divisão celular (YAO; DAI, 2012; HARTWELL; WEINERT, 1989). Se em algumas dessas fases houver alguma anomalia na célula, como um dano no DNA, o ciclo é interrompido para que o defeito seja reparado e o ciclo celular possa continuar. Caso isso não ocorra, a célula é conduzida à apoptose. Os *checkpoints* estão posicionados antes da célula entrar na fase S (*G1-S checkpoint*) ou após a replicação do DNA (*G2-M checkpoint*) e parece haver postos de controle de danos ao DNA durante as fases S e M. No *checkpoint G1/S*, a parada do ciclo celular induzida por dano ao DNA é dependente da proteína p53. Normalmente, o nível celular da proteína p53 é baixo, mas o dano ao DNA pode levar a rápida indução da sua atividade. A proteína p53 estimula a transcrição de genes diferentes, incluindo a proteína p21, uma CKI, o que resulta em inibição de CDK e parada do ciclo celular, impedindo a replicação do DNA danificado (VERMEULEN *et al.*, 2003; TAYLOR; STARK; 2001).

A origem das células cancerosas está associada a anomalias na regulação do ciclo celular (alterações nos genes que controlam a progressão do ciclo e as funções dos *checkpoints*) e à perda de controle da mitose (PARK; LEE, 2003; GARRETT, 2001). No câncer, há alterações fundamentais no controle genético da divisão celular, o que resulta em uma proliferação celular descontrolada. Mutações ocorrem principalmente em duas classes de genes: proto-oncogenes (versões de função normal de oncogenes, responsáveis pelo controle da divisão celular) e genes supressores de tumor. Versões mutantes dos proto-oncogenes ou oncogenes podem promover o crescimento do tumor. Inativação de genes supressores de tumor, como p53 e pRb (proteína

retinoblastoma) resultam em disfunção de proteínas que normalmente inibem a progressão do ciclo celular. A pRb desempenha um papel fundamental no controle da transição entre as fases G1 e S do ciclo celular e uma das funções é evitar o crescimento excessivo de células por inibir a progressão do ciclo celular até que a célula esteja pronta para se dividir. As mutações têm sido observadas em genes que codificam CDK, ciclinas, CKI, substratos da CDK (pRb) e proteínas dos *checkpoints* (MCDONALD; EL DEIRY, 2000)

2.2.2 Radicais livres e defesas antioxidantes

Radical livre pode ser definido como um átomo, grupo de átomos ou moléculas que apresentam elétrons de valência desemparelhados, como por exemplo: o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$). Porém, existem compostos tão reativos quanto os radicais livres, mas, que não apresentam esses elétrons desemparelhados, não podendo ser, portanto, classificados como tais. Surge então uma classificação mais ampla para esses compostos: as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), que abrangem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o peroxinitrito ($ONOO^-$) entre outros. A geração intracelular de H_2O_2 , a ERO mais estável, tem sido considerada um importante mediador de apoptose, e até mesmo a adição exógena de H_2O_2 é um potente ativador de tal maquinaria (DINI, 2005). A presença dessas espécies reativas é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais, e um desequilíbrio entre a produção de ERO/ERN e a remoção pelos sistemas de defesa antioxidantes leva a uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração dessas espécies, o que pode causar danos estruturais e lesões oxidativas com prejuízo as funções vitais da célula (DRÖGE, 2002; VALKO *et al.*, 2004). Este conjunto de efeitos é denominado estresse oxidativo. Uma definição alternativa para o estresse oxidativo é uma ruptura da sinalização redox e controle. Evidências consideráveis acumuladas nos últimos 15 anos mostram a função das espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) na sinalização redox. Estas espécies reativas estão presentes em concentrações muito baixas nas células e são difíceis de medir diretamente, então utiliza-se geralmente a relação GSH/GSSG como um meio para definir quantitativamente o estresse oxidativo em células em cultura (JONES, 2006)

Os agentes antioxidantes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos (SIES, 1993). O sistema antioxidante não enzimático é composto pela glutathione (GSH), ubiquinona ou coenzima Q (CoQ) e do ácido úrico, que são produzidos *in vivo*, e por outros compostos como: vitamina E (tocoferol), vitamina C (ascorbato), β -caroteno, selênio e flavonóides (polifenóis), que são obtidos através da ingestão de substâncias com propriedades antioxidantes provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Um conhecido antioxidante, a N-acetilcisteína (NAC), precursora da L-cisteína e da glutathione reduzida, têm sido utilizado como ferramenta para investigar o papel de ERO em numerosos processos biológicos e patológicos. NAC é um tiol, uma fonte de grupos sulfidrilas nas células e sequestradora de radicais livres interagindo com ERO tais como $\cdot\text{OH}$ e H_2O_2 (ZAFARULLAHA, 2003).

Os antioxidantes enzimáticos são a primeira linha de defesa contra espécies reativas ou radicais livres de oxigênio. As principais enzimas antioxidantes são: superóxido dismutases (SOD, EC 1.15.1.1) que fazem a dismutação do radical superóxido (Figura 2A) como a CuZnSOD e a MnSOD; a catalase (CAT, EC 1.11.1.6), uma hemoproteína presente em todos os organismos aeróbicos, que faz a decomposição do H_2O_2 em O_2 e H_2O (Figura 2B); a glutathione peroxidase (GSH-Px), que catalisa a redução dos hidroperóxidos pela glutathione reduzida (GSH), levando à formação de glutathione oxidada (GSSG) e água (Figura 2C). Esse último processo catalítico é diretamente dependente da redução da glutathione oxidada pela glutathione redutase (NORDBERG, ARNÉR, 2001; VALKO *et al.*, 2006; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A glutathione redutase (Gred) é uma flavoproteína dependente de NADPH que faz a redução da glutathione oxidada (GSSG) (Figura 2D) e, portanto, dependente da integridade da via das pentoses fosfato. Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) quando há prejuízo da função da Gred (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; FERREIRA; MATSUBARA *et al.*, 1997).

Os organismos contam com estas defesas para não sofrer danos causados pela própria produção de radicais livres e assim, manter a homeostase celular.

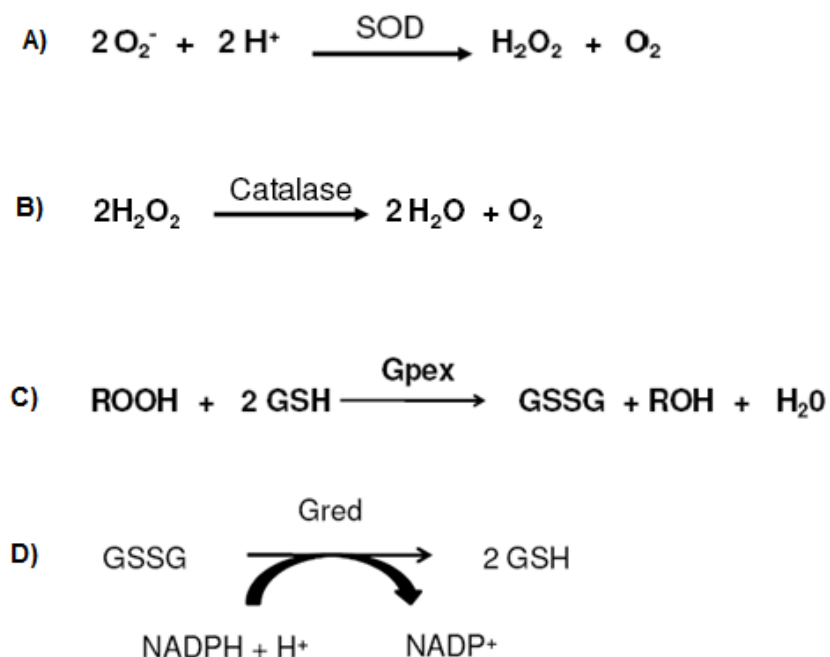


FIGURA 2. REAÇÕES DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES: A) SUPERÓXIDO DISMUTASE, B) CATALASE, C) GLUTATIONA PEROXIDASE E D) GLUTATIONA REDUTASE

FONTE: O Autor (2011), modificada de BARNETT; KING, 1995.

2.2.2.1 O sistema Nrf2/Keap1 e a expressão de enzimas antioxidantes

O estresse oxidativo imposto por composto como eletrófilos e oxidantes agravam muitas doenças crônicas, além de contribuir para o envelhecimento e doenças relacionadas à idade tais como câncer, doenças cardiovasculares, e doenças neurodegenerativas. Os níveis de proteínas oxidadas, fosfolípidios e DNA são aumentados nesses processos.

As células têm desenvolvido programas adaptativos para neutralizar estresses impostos por oxidantes intrínsecos, extrínsecos e eletrófilos. A indução desta resposta protetora requer pelo menos três componentes essenciais: (a) elementos antioxidantes de resposta (AREs), sequências reguladoras presente em cada gene em cópias únicas ou múltiplas, (b) Nrf2 (fator nuclear eritróide 2), o principal fator de transcrição que heterodimeriza com os membros da pequena família Maf de fatores de transcrição, liga-se a AREs, e recruta a maquinaria transcricional geral para expressão de genes

antioxidantes tais como os genes que codificam para a heme oxigenase, NADH: quinone oxidoreductase, glutamylcysteine synthase c, glutathione S-transferase (GST), catalase, superóxido dismutase (MnSOD) entre outros, sendo sua expressão induzida após a exposição das células ao estresse oxidativo e (c) Keap1 (E3 Kelch associando proteína 1), uma proteína citosólica repressora que se liga ao Nrf2, o retém no citoplasma, e promove a sua degradação proteossomal. Os vários resíduos de cisteína em Keap1 podem servir como sensores primários para os sinais de estresse e a sua alteração leva a mudanças conformacionais em Keap1, produzindo a liberação de Nrf2. Desta forma, Keap1 desempenha um papel central na regulação da resposta protetora ao estresse oxidativo (KENSLENER *et al.*, 2007; ANTELMANN *et al.*, 2011). Na ausência de estresse, Nrf2 está localizada no citoplasma, ligado a Keap1, o que facilita a degradação de Nrf2 através da via da ubiquitina-proteassoma (Figura 3).

Os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da estabilidade de Nrf2 em resposta a eletrófilos e ERO tem sido uma questão crucial no estudo da resposta ao estresse. Keap1 é uma proteína rica em tiol e possui múltiplas cisteínas reativas cujos resíduos são geralmente aminoácidos básicos. Os tióis reativos são alvos excelentes de eletrófilos e ERO. Alterações em Keap1 compromete a integridade estrutural do complexo Keap1-Cul3 E3 ligase, resultando em um declínio na ubiquitinação, facilitando assim o acúmulo de Nrf2. Assim, Keap1 age como um sensor que transduz sinais eletrofilicos em ativação transcricional (TAGUCHI *et al.*, 2011).

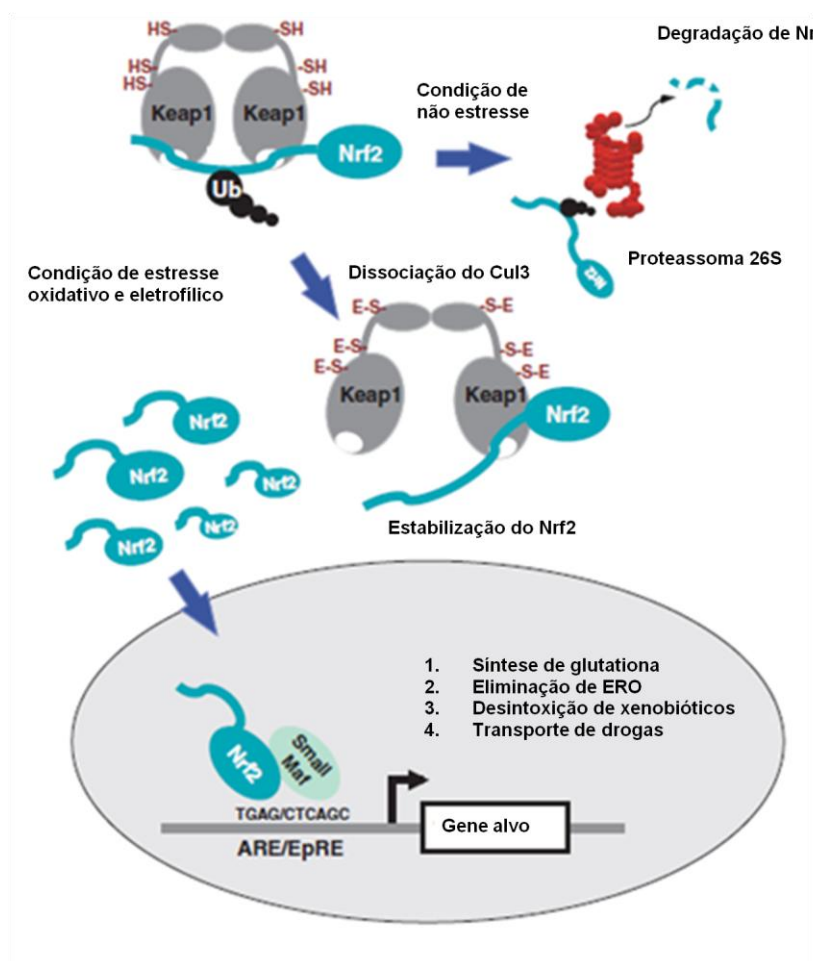


FIGURA 3: ESQUEMA GERAL PARA A INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ATRAVÉS DA VIA DE SINALIZAÇÃO Keap1-Nrf2-ARE

FONTE: Modificado de Taguchi *et al.*, (2011).

Mutações freqüentes em Keap1 e Nrf2 têm sido encontradas recentemente em tumores humanos, como de próstata, pulmão, canal biliar, cabeça e pescoço. Tais mutações levam à perda de função de Keap1 e ativação de Nrf2 e os seus genes citoprotetores, que contribuem para quimiorresistência durante a terapia. Nrf2 protege as células normais contra carcinogênese, mas a sua ativação constitutiva em certos tumores aparentemente contribui para a sobrevivência e crescimento dessas células. Nrf2 agora é visto, então, como um alvo farmacológico para superar a resistência terapêutica de vários tipos de tumores (TANG, *et al.*, 2011; ITOH *et al.*, 2010; HAYES *et al.*, 2009, LAU *et al.*, 2008). Deste modo, a identificação de moléculas que potencialmente inibam especificamente Nrf2 é bastante desejável, e tais compostos podem ser utilizados para aumentar a eficácia de fármacos antitumorais.

2.2.2.2 O sistema redox da glutathiona

Glutathiona é um tripeptídeo (L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existente no organismo em duas formas, a reduzida (GSH) e a oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, sendo o mais importante deles o sistema de defesa antioxidante (BERG *et al.*, 2004). A relação GSH/GSSG é um indicativo do estado redox da célula (HERNANDEZ-MIJARES *et al.*, 2011; LAFLEUR *et al.*, 1994).

Sabe-se que células cancerosas tendem a apresentar níveis mais elevados de GSH intracelular, possivelmente como uma resposta adaptativa a um maior metabolismo e, portanto, maiores níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) (BATIST *et al.*, 1996). A depleção de GSH como uma estratégia potencial para sensibilizar as células cancerosas tem sido investigada por mais de uma década (SCHNELLDORFER, 2000).

Estudos têm demonstrado que agentes oxidantes que induzem a perda do balanço celular redox GSH/GSSG são importantes na sinalização apoptótica (CIRCU *et al.*, 2008). Alguns compostos naturais encontrados em plantas têm essa propriedade, entre eles encontram-se os flavonóides, um grupo de grande relevância para o estudo de novas drogas que apresentam várias propriedades biológicas incluindo atividade antitumoral (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

2.3 FLAVONÓIDES

Os flavonóides são compostos polifenólicos encontrados como metabólitos secundários em plantas, sendo que são conhecidos atualmente mais de 6.467 destes compostos. Ocorrem naturalmente nos alimentos de origem vegetal e são considerados como suplementos dietéticos e ingredientes funcionais de bebidas, grãos, ervas e produtos lácteos (REN *et al.*, 2003; HARBORNE, WILLIAMS, 2000). Também são encontrados em várias plantas medicinais e fitoterápicos sendo usados na medicina popular em todo o mundo (DI CARLO *et al.*, 1999).

Eles são importantes para o crescimento normal, desenvolvimento e defesa de plantas, desempenhando um papel fundamental na proteção contra agentes oxidantes, como, por exemplo, os raios ultravioletas, a poluição

ambiental, substâncias químicas presentes nos alimentos entre outros (REN *et al.*, 2003; DI CARLO *et al.*, 1999).

Esses compostos são derivados de benzo- γ -pironas e apresentam baixo peso molecular (HEIN *et al.*, 2002), consistindo em sua maioria de um esqueleto base de 15 carbonos (C6-C3-C6), geralmente composto de um núcleo benzênico (anel A) e um anel heterocíclico (anel C), com uma fenil substituição (o anel aromático B) geralmente na posição 2 (Figura 4). De acordo com as variações no anel heterocíclico C, flavonóides são classificados em flavonas, flavonóis, dihidroflavonas, dihidroflavonóis, isoflavonas, chalconas, flavanas, entre outros (Figura 5). A estrutura básica dos flavonóides permite uma multiplicidade de padrões de substituição nos anéis A e B. Em cada classe de flavonóides: encontramos substituições como hidroxilas fenólicas, metoxilas, O-ou C-grupos glicosil, entre outros, e isso garante a esses compostos uma diversidade de aplicações biológicas (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Várias plantas e especiarias, que contêm derivados de flavonóides, têm encontrado aplicação como agentes preventivos contra doenças e na terapêutica na medicina tradicional na Ásia há milhares de anos (KANDASWAMI *et al.*, 2005)

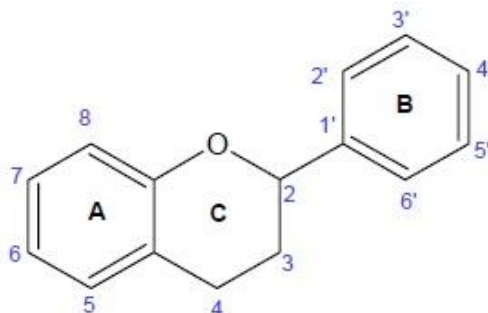


FIGURA 4: ESTRUTURA GERAL DOS FLAVONÓIDES COM ANEL C

FONTE: Bravo, (1998)

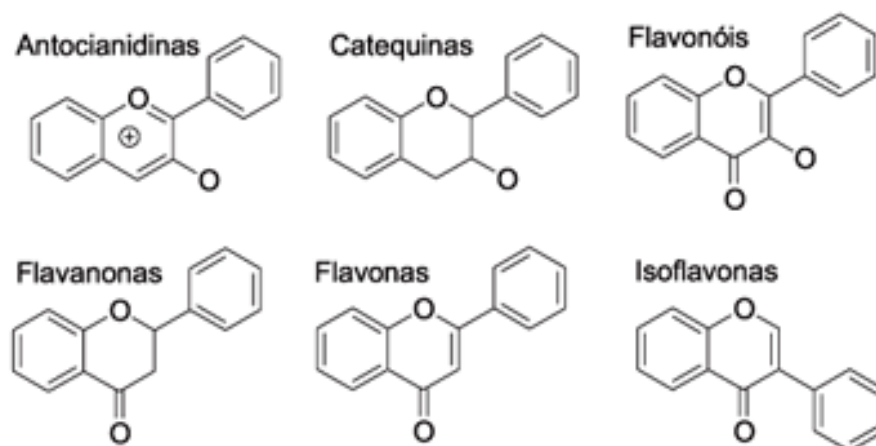


FIGURA 5: ESTRUTURA QUÍMICA DAS PRINCIPAIS CLASSES DE FLAVONÓIDES

FONTE: Havsteen, (1983)

2.3.1 Atividades biológicas dos flavonóides

Os flavonóides possuem uma variedade de atividades biológicas incluindo atividades antibacterianas, antivirais, antialérgicas, ações anti-inflamatórias, vasodilatadoras e antitumorais (REN *et al.*, 2003; ARON, 2008; COOK, 1996). Essas atividades dos flavonóides devem-se as suas atividades antioxidantes e pró-oxidantes, como a excelente capacidade sequestradora de radicais livres, e sua capacidade de transferir elétrons para radicais livres através da formação de radicais fenoxil de baixa reatividade, quelante de metais de transição como o ferro, suprimindo a geração de radicais hidroxila através da reação de Fenton, atividade inibitória de crescimento celular em diversas linhagens de células tumorais (MORA *et al.*, 1990; HAVSTEEN, 1983; BRANDI, 1992; LE MARCHAND, 2002). Cerutti *et al.*, (1985) observaram que os flavonóides apresentam-se como sequestradores altamente eficazes da maioria dos tipos de moléculas oxidantes, incluindo o oxigênio singlete e vários radicais livres, que estão possivelmente envolvidos nos danos ao DNA e promoção do tumor (BRAVO, 1998).

A atividade inibitória do crescimento celular tem sido demonstrada por vários flavonóides em várias linhagens de células tumorais humanas (BIRT *et al.*, 2001; WANG, 2000; LE MARCHAND, 2002).

O flavonóide Sophoranone, uma flavanona encontrada na tradicional medicina chinesa Shan Dou Gen, inibe o crescimento celular, induzindo a apoptose em várias linhagens de células tumorais, como as de câncer de estômago humano (células MKN7) e de leucemia humana (células U937) (FUKAI *et al.*, 2002).

Em células tumorais estrogênio-dependente, o efeito anti-proliferativo foi relacionado com as propriedades antiestrogênica de certos flavonóides. Foram comparadas as propriedades estrogênicas e anti-estrogênicas de dois conhecidos fitoestrogênios, uma isoflavona genisteína e um flavonol, a quercetina, em linhagens de células de câncer de mama MCF-7. A genisteína exerceu efeito bifásico, estimulando o crescimento (em até 120% em relação ao controle) em concentrações menores que 5 μM e provocando uma inibição dose-dependente em concentrações mais elevadas. A quercetina não influenciou o crescimento celular em doses de até 2,5 μM e inibiu drasticamente o crescimento em concentrações mais elevadas (MIODINI *et al.*, 1999).

Kuo (1996) comparou a capacidade antiproliferativa de vários flavonóides estruturalmente diferentes obtidos na dieta sobre células de câncer de cólon (Caco-2 e HT-29). Os flavonóides variaram significativamente na sua potência antiproliferativa em função das características estruturais. Alguns dos mais potentes flavonóides foram a quercetina e a genisteína (20-40 μM), cujo efeito encontrado foi dose-dependente, com uma indicação de indução de apoptose.

Em outros modelos (*in vitro*), verificou-se que os flavonóides interferem na sinalização celular e na progressão do ciclo celular. Por exemplo, os flavonóides do chá verde e do chá preto inibem as vias de transdução de sinal mediada por fator de crescimento epidérmico e o fator de crescimento derivado de plaquetas, que influenciam favoravelmente em eventos como angiogênese (WISEMAN, 2001).

O flavonol fisetina (3,3',4',7-tetrahidroxiflavona) (10–60 μM por 24 e 48 h) inibe o crescimento celular de forma dose e tempo dependentes e induz apoptose e parada do ciclo celular na linhagem de células de câncer de próstata (LNCaP) (KHAN *et al.*, 2008)

Martin *et al.* (2009), estudaram os efeitos antioxidantes de alguns flavonóides e verificaram que o estresse oxidativo é amplamente reconhecido

como um importante mediador da apoptose em células hepáticas e desempenha um papel crucial na patogênese de várias doenças. Estes autores utilizaram alguns flavonóides (catequinas, epicatequinas) encontrados no cacau e viram que possuem uma potente atividade antioxidante e colaboram na prevenção do estresse oxidativo, gerado por *tert*-butil hidroperóxido (t-BOOH). Verificou-se que a incubação de células HepG2 com o t-BOOH induz a apoptose (ativação da caspase-3) e que o tratamento com CPE (extrato polifenólico do cacau) promoveu o aumento das atividades de duas enzimas antioxidantes, glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR). Os autores sugerem que CPE é um indutor eficaz das atividades de GPx e GR, através da ativação de quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs) e que este aumento parece ser necessário para atenuar as lesões induzida por t-BOOH.

Du *et al.* (2007) observaram que polifenóis são essenciais para as propriedades antioxidantes de extratos de semente de uva (GSE). Estes autores investigaram se os dois principais polifenóis isolados do GSE (catequinas e proantocianidinas B4) poderiam aumentar as enzimas antioxidantes endógenas (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) em cardiomiócitos de rato (H9C2(2-1), e se esse aumento das defesas celulares poderia fornecer proteção contra a lesão celular oxidativa cardíaca. Células cardíacas H9C2(2-1) foram incubadas com concentrações micromolares de catequina ou proantocianidina resultando em uma indução significativa de enzimas antioxidantes celulares de uma forma dependente da concentração. Os resultados indicaram que os polifenóis da semente da uva (GSP) poderiam proteger estas células cardíacas contra a apoptose através da indução de enzimas antioxidantes endógenas (catalase, SOD, GPx, GST).

A primeira base molecular para as propriedades quimiopreventivas do flavanol quercetina (5-40 μ M, 12 h) demonstrou um aumento da atividade de AREs (via expressão do mRNA de NADPH:quinona oxidoreductase - NQO1) pela “*upregulation*” da expressão de Nrf2, impedindo a sua ubiquitinação e degradação proteossomal, e acelerando a degradação de Keap1 de maneira proteossoma-independente em células de carcinoma hepatocelular (HepG2) (TANIGAWA *et al.*, 2007).

No entanto, recentemente Kweon *et al.* (2006) relataram que o flavanol epigallocatequina 3-galato (EGCG), o principal polifenol encontrado no chá

verde, suprime a expressão da heme oxigenase 1 (HO-1) por inativar o Nrf2 em células de câncer de pulmão humano A549, que exibem Nrf2 constitutivamente ativo. Essa descoberta sugere que a superexpressão de HO-1 mediada por Nrf2 confere resistência à indução de apoptose por EGCG e que sua inativação pode ser um alvo para a superação da resistência a quimioprevenção e quimioterapia.

As atividades biológicas dos diferentes flavonóides são dependentes das suas estruturas químicas em especial dos números e posições de alguns grupamentos.

2.3.2 Relação estrutura-atividade

Inúmeros autores têm investigado a atividade antioxidante e pró-oxidante dos flavonóides, e várias tentativas foram feitas para elucidar as relações estrutura-atividade desses compostos. Foram descobertos três requisitos na estrutura química dos flavonóides possivelmente responsáveis pela atividade de neutralização de radicais exercida por essa classe de compostos, sendo eles: a) presença do grupo orto-dihidroxi ou grupo catecol no anel B, o que confere uma maior estabilidade à forma radicalar pois contribui para a deslocalização dos elétrons; b) ligação dupla conjugada com a função 4-oxo que aumenta a deslocalização eletrônica a partir do anel B; c) grupos hidroxila nas posições 3 e 5 com função oxo que promovem a deslocalização eletrônica do grupo 4-oxo para esses dois substituintes (MARTÍNEZ-FLORES *et al.*, 2002).

A presença de grupamentos hidroxil, O-metil, glicosil e de dupla ligação, no esqueleto básico dos flavonóides têm importância fundamental para as atividades sequestradoras de radicais livres, quelante de metais e antioxidantes (HEIM, 2002). Hidroxilas parecem aumentar a atividade antioxidante como por exemplo com a luteolina (Figura 6), enquanto os grupamentos metoxila parecem suprimir a atividade antioxidante como na hesperetina [2,3-dihidro-5, 7-dihidroxi-2-(3-hidroxi-4-methoxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona] (ARORA *et al.*, 1998).

A substituição da hidroxila no C-3 por um grupamento metil ou glicosil é capaz de extinguir completamente a atividade da quercetina e do kaempferol

em relação à inibição da oxidação do ácido linoléico (BURDA; OLESZEK, 2001).

Herrerias *et al.* (2009), em nosso laboratório verificaram que a presença de substituintes na estrutura básica das flavonas é importante para o efeito inibitório desses compostos sobre a enzima antioxidante catalase em células de melanoma murino (B16-F10), visto que, somente a flavona sem substituintes não promoveu este efeito. A presença do grupamento 6-metoxil na estrutura da hispidulina e da eupafolina mostrou-se desfavorável para o efeito inibitório sobre a enzima glutatona redutase. Desta forma, verifica-se que a presença e a posição dos grupamentos hidroxil ou metoxil podem afetar de forma distinta as atividades das enzimas antioxidantes. Além disso, Herrerias e cols. constataram que há uma importante correlação entre a presença do anel catecol e o efeito citotóxico em células tumorais (B16-F10) e melanócitos normais de camundongo (Melan-A).

RUSAK *et al.* (2005), estudaram a importância do número de grupamentos hidroxil no anel B de alguns flavonoides (quercetina, miricetina, kaempferol, isoramnetina, 3'-metilquercetina) para atividade sequestradora de radicais DPPH (radical livre estável, não natural). Verificaram também a importância da presença da dupla ligação entre C2-C3, do grupamento 3'-hidroxil e da ausência do 6-hidroxil para os efeitos antiproliferativos em células humanas de leucemia (HL-60).

Bors *et al.* (1990), demonstraram também que a presença de uma orto-hidroxilação no anel B da molécula, o número de grupos hidroxilas livres, uma ligação C2-C3 dupla no anel C, ou a presença de um grupamento hidroxila em C3 são indispensáveis para as atividades antioxidantes e anti-radicalares de diversos flavonóides testados.

A hispidulina, a flavona que é objeto de estudo neste trabalho possui: a) dupla ligações entre C-2 e C-3, b) grupo ceto em C-4 e c) hidroxila 4' no anel B e em posições 5 e 7 no anel A e d) um único grupamento metóxi em C-6 no anel A, tornando importante o estudo de sua capacidade de estar envolvida em reações de óxido-redução e ainda de promover inibições enzimáticas.

2.3.3. Flavonas e suas atividades biológicas sobre células tumorais

Os flavonóides pertencentes a classe das flavonas caracterizam-se por possuírem uma ligação dupla entre C2-C3 e ausência de grupamento hidroxila no C3, como pode ser verificado nas estruturas químicas mostradas na figura 6 (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

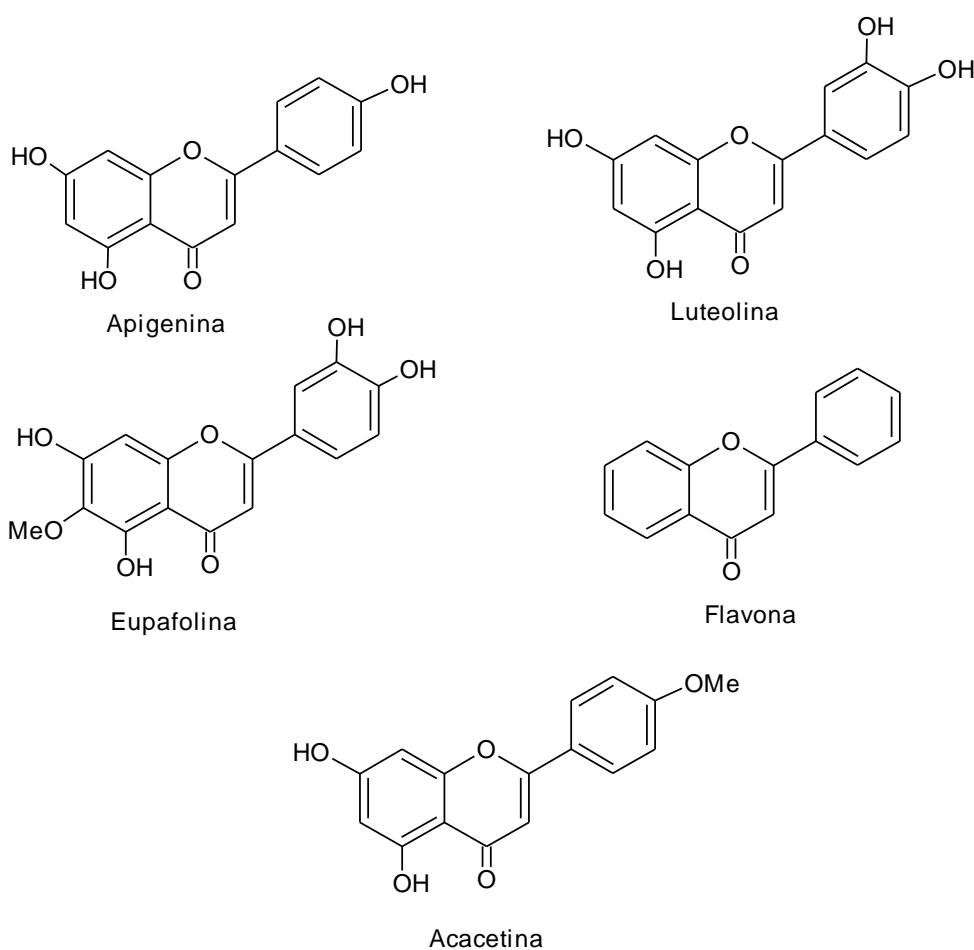


FIGURA 6: ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUMAS FLAVONAS
FONTE: O autor (2012)

Muitas flavonas apresentam diversas atividades biológicas sobre células tumorais. A apigenina (4,5,7 – trihidroxiflavona)(Figura 6) induz a apoptose em células de carcinoma humano hepatocelular HepG2, aumentando o acúmulo da proteína p53 e induzindo a expressão da proteína p21. Demonstrou-se que a apoptose induzida pela apigenina em células HepG2 era mediada

possivelmente pela via dependente de p53 e p21 e associada à parada do ciclo celular na fase G2/M (CHIANG *et al.*, 2006).

Foram investigados os efeitos anti-proliferativos da luteolina (Figura 6) e também da apigenina, isoladas da erva chinesa *Ixeris sonchifolia* Hance, em células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). Nos ensaios de viabilidade celular, a luteolina (8 μ M) mostrou-se mais eficiente nos seus efeitos anti-proliferativos do que a apigenina, sendo que a redução da viabilidade foi de aproximadamente 40%, e com a apigenina essa redução foi de apenas 20%. Utilizando as técnicas de marcação por iodeto de propídio e estudos de citometria de fluxo, foi verificado que estes efeitos poderiam ser resultado de uma parada do ciclo celular. Estes dados sugerem que a luteolina pode ter potencial como um agente anti-câncer (YEE *et al.*, 2003)

Attoub *et al.* (2011), investigaram os efeitos da luteolina (Figura 6) (25-200 μ M) sobre a viabilidade, migração e invasão de células cancerosas *in vitro* e verificaram que após 24 horas de tratamento na dose de 50 μ M, os autores verificaram que a flavona reduziu a viabilidade de linhagens de células humanas de câncer de pulmão (LNM35) em 40%, de cólon (HT29) em 30%, de fígado (HepG2) em 45% e de mama (MCF7 / 6 e MDA-MB231-1833) em 20% , além de aumentar a fração sub-G1 em aproximadamente 20% nas células LNM35 na mesma dose.

Acacetina (5,7-dihidroxi-4'-metoxi flavona) (Figura 6) promoveu a redução do crescimento celular sobre as células LNCap de 30 e 63% após 24 horas de tratamento, 45 e 77% após 48 h e 50 e 80% após 72 h de tratamento com 25 e 100 μ M respectivamente, acompanhado de morte celular, demonstrando um efeito depende do tempo e da dose de tratamento. A acacetina também inibe a proliferação celular e induz apoptose em células de carcinoma gástrico humano (AGS) de forma dependentes da dose e do tempo de tratamento (0-100 μ M) acompanhada pela ativação das cascatas de caspases e produção de espécies reativas de oxigênio, além de provocar uma rápida perda de potencial de transmembrana mitocondrial e liberação de citocromo C no citosol (PAN *et al.*, 2005).

Herrerias (2009) em nosso laboratório verificou o efeito de algumas flavonas (10-200 μ M) sobre a viabilidade de células de melanoma B16-F10 e constatou que a flavona reduziu a viabilidade celular (50%) somente na dose

de 200 μM . A eupafolina (Figura 6) diminuiu a viabilidade nas doses de 25-200 μM chegando a aproximadamente 80% na maior dose. As flavonas apigenina e luteolina reduziram em aproximadamente 40 e 75% respectivamente, a viabilidade das células de melanoma murino após o tratamento por 24 h na dose de 200 μM .

Valdameri *et al.* (2011) observaram, também em nosso laboratório, que a apigenina reduziu a viabilidade de células de câncer de fígado (HepG2) de uma maneira dose e tempo-dependente (10-100 μM , 24, 48, 96, ou 144 h), além disso esta flavona também induz a geração de ERO e diminui significativamente os níveis de expressão de mRNA da catalase e níveis de GSH intracelular.

Na última década têm sido verificados vários efeitos de flavonas sobre o ciclo celular e expressão e/ou atividades de enzimas antioxidantes.

2.3.3.1 Efeitos de flavonas sobre o ciclo celular

Vários flavonóides, entre eles diversas flavonas, causam parada de ciclo celular e/ou aumento de células na fase subG1, o que é um indicativo de morte celular. Pan *et al.*, (2005), observaram aumento na porcentagem de células apoptóticas em células de carcinoma gástrico humano (CCRC 60102) após tratamento com acacetina (60 μM), sendo esses aumentos de 11, 24, 26, 40 e 60% após 3, 6, 9, 12 e 24 h de incubação respectivamente, e 35, 48, 53, 58 e 62% após incubação com 20, 40, 60, 80 e 100 μM respectivamente. Shim *et al.*, (2007) observaram também um aumento na população de sub-G1 utilizando acacetina (25-150 μM) em células de câncer de mama da linhagem MCF-7. Singh *et al.* (2005), observaram que a acacetina inibe o crescimento celular e a progressão do ciclo celular e induz apoptose em células de câncer de próstata nas linhagens celulares LNCaP e DU145.

A apigenina (4 e 8 $\mu\text{g/mL}$, 48 h) promoveu o aumento do número de células na fase G2/M em células de carcinoma hepatocelular (HepG2) dependente da dependente. Verificou-se que o aumento de porcentagem de células na fase G2/M foi acompanhado por um decréscimo concomitante de número de células na fase G0/G1 (CHIANG *et al.*, 2006). Esse mesmo efeito

também foi observado em linhagens de células de câncer de mama (MCF-7) (YIN *et al.*, 2001).

Nos estudos de Valdameri *et al.* (2011), realizados em nosso laboratório, verificou-se que a apigenina (100 μM , 24 h) promove a fragmentação do DNA, observada pelo aumento do número de células na fase sub-G1, e diminuição da percentagem de células na fase G1 em células HepG2 em comparação com culturas controle não tratadas. Apigenina também causa parada do ciclo celular e apoptose seletiva de células de carcinoma de próstata, mas não em células normais. Nas doses de 1-10 μM observou-se uma parada na fase G2-M de forma dependente da dose em linhagem de câncer de próstata humano CA-HPV-10, mas não na linhagem de células epiteliais normais de próstata PZ-HPV-7, indicando, então um efeito seletivo da droga sobre as células tumorais (GUPTA *et al.*, 2001).

2.3.3.2 Efeitos de flavonas sobre as defesas antioxidantes

2.3.3.2.1 Enzimas antioxidantes

Leung *et al.* (2006), verificaram os efeitos da luteolina sobre as atividade de enzimas antioxidantes. Estes autores verificaram uma indução dependente do tempo de tratamento (2, 6, 12, 24 horas) da atividade de SOD e catalase pelo tratamento com a luteolina em células de câncer de pulmão humano (CH27). Estes mesmos autores também demonstraram o aumento da expressão dos níveis das proteínas Cu/Zn SOD e MnSOD durante apoptose induzida por luteolina (50 μM) pela técnica de *Western blotting*.

Herrerias *et al.* (2009) analisaram, em nosso laboratório, o efeito da flavona, hispidulina, eupafolina, apigenina e luteolina (50 μM) sobre a atividade total das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione redutase após o tratamento por 24 h sobre células de melanoma humano B16-F10. Das flavonas estudadas, a hispidulina e a apigenina estimularam a atividade de SOD total em aproximadamente 40%. Em relação a catalase a hispidulina, eupafolina, apigenina e luteolina inibiram, em 25, 45, 40 e 35%, respectivamente a sua atividade quando comparadas com o controle. Dos cinco compostos testados, apenas a flavona não alterou a atividade enzimática da catalase, indicando a importância dos substituintes no anel

básico da flavona para esse efeito biológico. Já a atividade da glutathione peroxidase não foi alterada por nenhuma das flavonas no tempo (24 horas) na concentração testada (50 μ M) quando comparadas com o controle. Somente a apigenina e luteolina inibiram a atividade da glutathione reductase em 20 e 30%, respectivamente. Hispidulina e eupafolina não afetaram significativamente este parâmetro. Apesar de serem conhecidos os efeitos da hispidulina sobre algumas linhagens tumorais, ainda não são conhecidos os efeitos dessa flavona sobre a expressão das enzimas antioxidantes em células HepG2, desta forma, torna-se importante avaliar o efeito desse composto sobre tais enzimas.

2.3.3.2.2 Efeito de flavonas sobre o sistema Nrf2

Têm sido recentemente demonstrado que alguns flavonóides favorecem tanto a translocação do Nrf2 nuclear quanto a ativação de AREs em diversas linhagens celulares, estratégia importante para a prevenção do câncer. Porém, observou-se que em diversos tipos de tumores, Nrf2 está constitutivamente ativo (LEONARDUZZI *et al.*, 2010) e a ativação de Nrf2 resulta no aumento da expressão no nível transcricional de algumas enzimas de proteção, incluindo a cobre/zinco superóxido dismutase (CuZnSOD), manganês superóxido dismutase (mitocondrial) (MnSOD), glutathione S-transferase (GST) e catalase aumentando as defesas antioxidantes da célula (OSBURN; KENSLER, 2008), o que pode contribuir para quimiorresistência durante a terapia. Nrf2-Keap1 agora é uma via vista como alvo farmacológico para superar a resistência terapêutica de vários tipos de tumores (HAYES *et al.*, 2009; ITOH *et al.*, 2010).

Ren; Tang (2011) observaram, que a apigenina inibe a proliferação celular de várias linhagens de câncer de pulmão de uma maneira dependente da dose e que o tratamento combinado de apigenina e drogas antitumorais é muito eficaz sobre células humanas de câncer de pulmão, e a via Nrf2-ARE parece contribuir para esse mecanismo.

Recentemente também foi descrito que a luteolina é um potente inibidor de Nrf2. Em células de câncer de pulmão da linhagem A549, que possuem Nrf2 constitutivamente ativa, luteolina provocou uma redução dramática de Nrf2 em ambos os níveis de mRNA e proteína, levando à diminuição da ligação de Nrf2 aos AREs, regulação dos genes AREs e depleção de glutathione reduzida. O

estudo demonstrou que um inibidor de Nrf2 pode melhorar a capacidade de resposta das células cancerosas para medicamentos quimioterápicos e indica o potencial de aplicação de luteolina como um sensibilizador natural em quimioterapia (TANG *et al.*, 2011). Então, como este sistema afeta também enzimas do metabolismo da glutathione, torna-se importante verificar os efeitos de outras flavonas (ex: hispidulina) sobre os níveis de GSSG e GSH.

2.3.3.2.3 Efeito de flavonas sobre a relação GSH/GSSG

Diversos flavonóides foram estudados em relação a sua capacidade de alterar o sistema glutathione, como um indicativo de estresse oxidativo celular, como por exemplo nos estudos de Galati, *et al.* (2001), onde observaram que apigenina e naringenina (5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxifenil) croman-4-ona) (5, 10 e 25 μ M) promoveram uma extensa oxidação de GSH *in vitro* dependente da dose em pH fisiológico, na presença de peroxidase e H₂O₂, sendo que na ausência dos flavonóides, essa oxidação foi muito pequena.

A capacidade de uma série de flavonóides de induzir a depleção de glutathione (GSH) também foi medida em linhagens de células tumorais humanas de pulmão (A549), mielóide (HL-60), e de próstata (PC-3). As flavonas apigenina e chrisina foram as mais eficazes em células PC-3, diminuindo entre 50-70% a GSH intracelular no prazo de 24 h de exposição a 25 μ M (KACHADOURIAN, *et al.*, 2006).

Shukla e Gupta (2008), verificaram que a apigenina (40 μ M) apresenta uma redução de 67% nos níveis de glutathione após 1h de tratamento nas células de câncer de próstata humana 22Rv1, chegando a 81% com 3h de tratamento.

No entanto, Lima *et al.* (2006) verificaram que a luteolina e a quercetina promovem uma proteção celular contra o dano em DNA induzido pelo t-butilhidroperóxido (t-BHP) e promoveram uma prevenção da depleção de GSH causada pelo t-BHP em células de câncer de fígado humano (HepG2). A relação entre a prevenção da redução da concentração de GSH e a proteção contra danos ao DNA é um fator de interesse por grande parte dos pesquisadores porque esse efeito pode estar relacionado com o potencial

anticarcinogênico dos flavonóides, além de atuar na prevenção de outras doenças já descritas por estudos epidemiológicos.

Uma vez que já foram demonstradas que as flavonas apresentam diversas atividades biológicas sobre os sistemas antioxidantes e a importância dessas defesas sobre o controle dos níveis de ERO e indução de morte celular, torna-se importante o estudo do mecanismo de ação da hispidulina sobre essas defesas.

2.3.4 HISPIDULINA E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

A hispidulina (5, 7, 4'- trihidroxi – 6 – metoxiflavona) (Figura 7), também denominada de dinatina, pertence à classe das flavonas, sendo um flavonóide encontrado em muitas plantas, podendo-se citar: *Digitalis lanata* (DOHERTY *et al.*; 1963), *Clerodendrum indicum* L. (SANZ *et al.*, 1994), *Clerodendrum petasites* (HAZEKAMP *et al.*, 2001) e *Lippia citriodora* (Lemon verbena) (VALENTÃO *et al.*; 1999) da família *Verbenaceae*, cujas folhas são usadas industrialmente como aromatizante de bebidas ou na medicina popular como infusos para fins antiespasmódicos, antipiréticos e para distúrbios gástricos; *Millingtonia hortensis* L. (CHULASIRI, *et al.*, 1992) da família *Bignoniaceae*; *Eupatorium littorale* Cabrera, pertence à família *Asteraceae* (HARBORNE, 1967), sendo que dentre as plantas que fazem parte desta família, em várias delas foi encontrada a hispidulina, podendo-se citar: *Arnica montana* L. (BOURDILLAT *et al.*, 1988) *Balduina angustifolia* (LEE *et al.*, 1972); *Saussurea stella* (YUTING *et al.*, 1990); *Baccharis trimera* (SOICKE *et al.*, 1987; NAKASUGI; KOMAI, 1998), conhecida popularmente no Brasil como carqueja, sendo suas folhas bastante usadas em infusões com uso medicinal para problemas renais e hepáticos, entre outros .

Já foi visto em vários estudos que a hispidulina apresenta diversas atividades biológicas tais como: efeitos inibitórios dependentes da dose sobre a peroxidação lipídica (YUTING *et al.*, 1990); atividade pró-oxidante por estimular a degradação de desoxirribose num sistema contendo Fe⁺³-EDTA na presença de H₂O₂ (SANZ *et al.*, 1994); atividade broncodilatadora (ANULAKANAPAKORN *et al.*, 1987), entre outras. Verificou-se também que a hispidulina (150 mg/Kg) possui atividade antioxidante *in vivo* promovendo inibição da hepatotoxicidade causada por bromobenzeno, sendo capaz de

neutralizar os efeitos da depleção de glutathiona, de forma semelhante a observada com N-acetilcisteína (150 mg/Kg), (FERRÁNDIZ *et al.*, 1994).

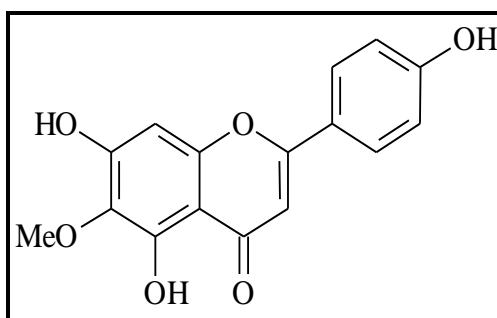


FIGURA 7: FÓRMULA ESTRUTURAL DA HISPIDULINA

FONTE: Frehse (1999)

He *et al.* (2011), verificaram que a hispidulina (20 mg/kg/dia, por 35 dias) inibe o crescimento tumoral e a angiogênese em aproximadamente 50% após os 35 dias de tratamento em camundongos com tumor pancreático PANC-1, e reduz a viabilidade de células de câncer pancreático (PANC-1, PANC-28, e BxPC-3) em várias concentrações da droga (5-100 μ M) após 48 horas de incubação.

LIN *et al.* (2010) observaram que o tratamento com a hispidulina (0-80 μ M, 48 horas), isolada da *Saussurea involucrate*, resultou em uma inibição da proliferação de duas linhagens de células de glioblastoma multiforme (GBM8401 e GBM8901), o tipo mais comum e letal de tumor cerebral primário de uma maneira dependente da dose. Além disso, hispidulina (60 e 40 μ mol/L, por 12, 24 e 48 horas) foi capaz de bloquear a progressão do ciclo celular na fase G1 e induzir a apoptose através da indução de expressão da proteína p53 e “*upregulation*” da expressão da proteína p21.

Efeitos citotóxicos da hispidulina sobre células tumorais também foram verificados em nosso laboratório (Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular da UFPR). A hispidulina (100 μ M) reduz em 40% a viabilidade da linhagem de células HeLa e esta citotoxicidade pode, pelo menos em parte, ser explicada pelas alterações nos parâmetro respiratórios (BARBOSA *et al.*, 2005; HERRERIAS, 2005).

Herrerias *et al.* (2009) também em nosso laboratório verificaram que a hispidulina (10 μ M) reduz em 20% a proliferação de células de melanoma humano B16-F10 em 48 horas de tratamento. Ao relacionar a atividade

antiproliferativa e a estrutura química das flavonas, pode-se observar que o grupamento 6-metoxil presente na estrutura da hispidulina pode ter sido o responsável por reduzir o efeito antiproliferativo quando comparados seus efeitos aos das outras flavonas testadas não metoxiladas.

Dabagui-Barbosa *et al.* (2005) observaram em nosso laboratório que a a hispidulina, assim como a eupafolina (5,7,3',4'-tetrahidroxi-6-metoxiflavona) foram capazes de promover a liberação de ferro de ferritina, o qual poderia ser utilizado para catalisar reações que geram ERO, como ocorre na reação de Fenton, onde o ferro livre pode reagir com peróxido de hidrogênio formando radical hidroxil (extremamente reativo), podendo oxidar várias biomoléculas,. Porém, o efeito da eupafolina foi três vezes maior que o causado pela hispidulina em uma mesma concentração molar (0,2 mM), sugerindo que o anel catecol na estrutura da eupafolina pode ser o responsável por tal diferença. Os resultados indicaram que hispidulina é capaz de liberar ferro da ferritina, mas tem propriedades pró-oxidantes e antioxidantes distintas quando comparadas com a eupafolina.

Também verificou-se, em sistema *in vitro*, utilizando mitocôndrias isoladas de fígado de rato que a hispidulina apresenta efeitos sobre parâmetro relacionados com o transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. Esta flavona inibe atividades de enzimas da cadeia respiratória e inibe o consumo de oxigênio, o que pode contribuir para o aumento de ERO intracelular (BARBOSA *et al.*, 2005; HERRERIAS, 2005; HERRERIAS, 2009).

Apesar de terem sido descritas diversas atividades biológicas da hispidulina em mitocôndrias isoladas de fígado de rato e sobre algumas células tumorais, ainda não são conhecidos os efeitos deste composto sobre células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2).

4. OBJETIVOS

Tendo em vista a necessidade de drogas eficazes e que produzam menos efeitos colaterais para o tratamento do carcinoma hepatocelular, o fato de várias flavonas possuírem efeitos antitumorais, e sabendo que a hispidulina afeta a viabilidade de outras células tumorais, mas ainda não são conhecidos os efeitos desse composto sobre células HepG2, objetivo geral deste trabalho é estudar o efeito desta flavona sobre estas células, para observar se há alterações nos mecanismos oxidativos e na viabilidade celular o que poderá contribuir para o entendimento do seu mecanismo de ação, visando a possibilidade de aplicar essa flavona no tratamento do CHC.

Para tanto, temos como objetivos específicos:

- Em células de carcinoma hepatocelular humano HepG2 cultivadas, avaliar os efeitos da hispidulina sobre:
 1. Viabilidade celular
 2. Ciclo Celular
 3. Níveis intracelulares de ERO
 4. Viabilidade na presença de N-acetilcisteína (NAC)
 5. Níveis de Glutathione
 6. Expressão das enzimas antioxidantes

5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

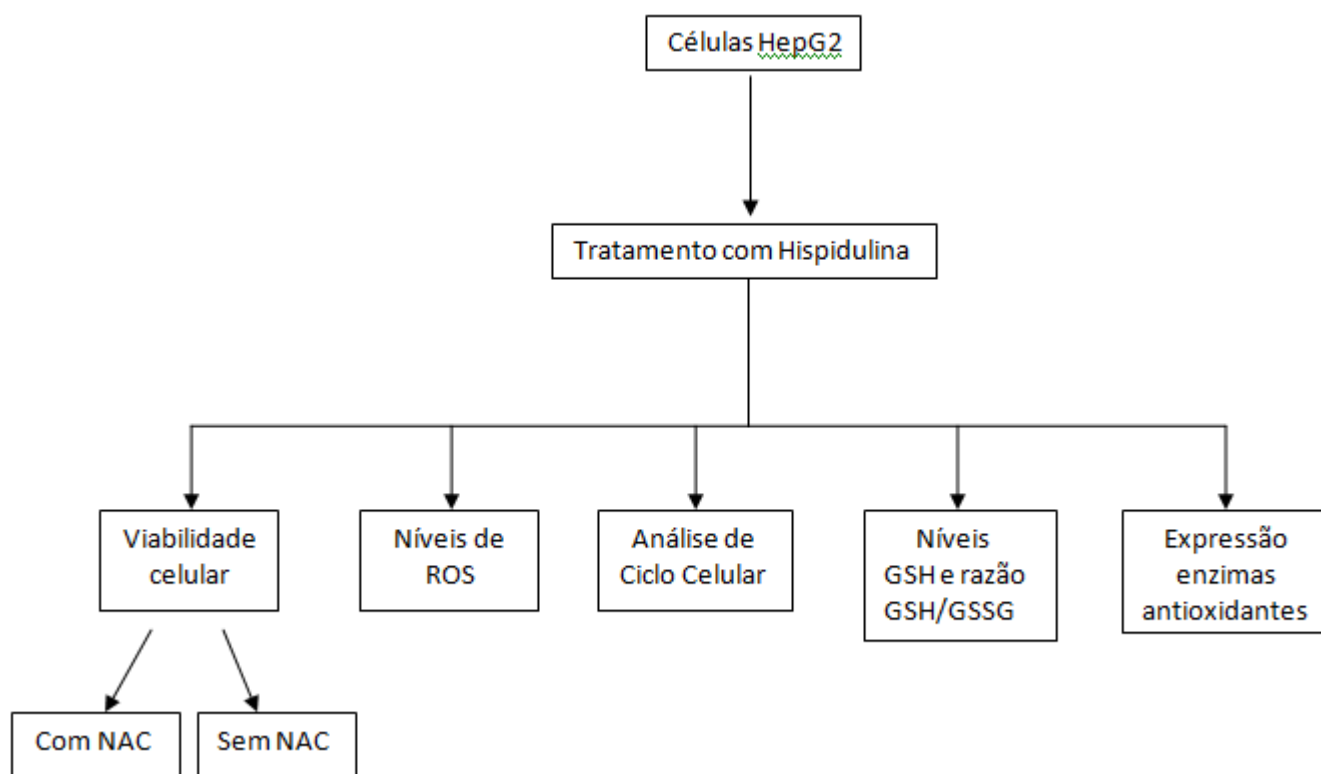


FIGURA 8: FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL

FONTE: O Autor (2011)

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. REAGENTES

Glutamato de sódio, succinato de sódio, NADH, EDTA, DCFDA, iodeto de propídeo, dimetilsulfóxido (DMSO), Soro fetal bovino, DEMEM alta glucose, gentamicina, RNaseA, fosfoenolpiruvato, antimicina, e Tris foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (EUA). Hidróxido de potássio, cloreto de potássio, fosfato monobásico de potássio, fosfato dibásico de potássio, ácido clorídrico, foram adquiridos da Merck do Brasil. A hispidulina foi comprada da empresa Tocris Bioscience dos Estados Unidos (Bristol, U.K.) com uma pureza >98%.

Os demais reagentes utilizados foram do melhor grau analítico comercialmente disponível. As soluções dos reagentes foram preparadas com água deionizada através de sistema purificador Millipore Milli Q.

5.2 PREPARO DA HISPIDULINA

Para a solução estoque (200 μ M) a hispidulina foi solubilizada em DMSO. Nos experimentos polarográficos, as concentrações de hispidulina utilizadas foram aquelas determinadas em experimentos preliminares: 10, 25, 50, 100 e 200 μ M. Para a realização de cada experimento, as células foram incubadas durante 24, 48 e 72 horas com as diferentes concentrações da hispidulina (10 μ M – 200 μ M). Foram realizados em todos os experimentos controles com e sem o uso do solvente DMSO com um volume máximo de 0,1% (v/v).

5.3 CÉLULAS

Foram utilizadas células da linhagem HepG2 (células de hepatoma humano) que é uma linhagem procedente da American Typw Culture Collection. Foi cultivada no laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

5.4 ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS

Todo material de vidro utilizado para os procedimentos de cultivo de células foram esterilizados em autoclave a 120°C, durante 45 minutos, a 1 atm. Material de plástico como garrafas, tubos cônicos e todos foram esterilizados em microondas, durante 40 minutos.

5.5 SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA

5.5.1 Solução Salina Tamponada (PBS)

A solução salina-fosfato tamponada (PBS) foi preparada como solução estoque concentrada 5 vezes. Esta solução concentrada foi constituída por: NaCl 680mM, KCl 13,4 mM, Na₂HPO₄ 40,5mM (pH 7,5). A solução foi esterilizada em autoclave (120°C, 45 minutos) e armazenada a 4°C. Para o uso, a solução foi diluída com água ultra pura estéril, recém obtida.

5.5.2 Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado foi o DMEM – alta glucose, que é uma modificação do Meio Basal Eagle (BME) que contém quatro vezes a concentração de aminoácidos e vitaminas. O meio foi reconstituído em água ultra pura e esterilizados em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm (Millipore) sob pressão em aparelho Sartorius. Após o procedimento de filtração, alíquotas do meio foram deixadas em estuda a 37°C, para o acompanhamento de eventuais contaminantes. O meio foi mantido em geladeira a 4°C. Para os experimentos, o meio foi suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal estéril inativado. O pH do meio foi ajustado com quantidades adequadas de solução de bicarbonato de sódio para pH 7,4 e então esterilizado em autoclave a 120°C por 45 minutos.

5.5.3 Solução de Tripsina-EDTA

A solução de tripsina-EDTA foi constituída de NaCl 137 mM, KCl 5,4 mM, glucose 5 mM, Na₂HPO₄ 0,42 mM, KH₂PO₄ 0,44 mM, NaHCO₃ 2,3 mM, EDTA 0,53 mM, 50 mg% tripsina (1:250) e 2 mg% de vermelho de fenol, sendo o pH ajustado para 7,4 com bicarbonato de sódio. A solução foi esterilizada por filtração e armazenada a -20°C.

5.6 PROCEDIMENTOS DE CULTIVO

As células foram cultivadas em garrafas estéreis com meio DMEM - alta glucose, acrescido de soro fetal bovino 10% (v/v) e gentamicina. As culturas foram mantidas em estufa (Sanyo), em atmosfera contendo 5% de CO₂, com umidade controlada de 95% e temperatura constante de 37°. Os repiques foram realizados utilizando-se de solução de tripsina-EDTA para soltar as células em intervalos de 48h na proporção de 1:3. Para armazenamento das linhagens, as células (10⁶ células/mL) foram suspensas em meio de cultura e DMSO 10% (v/v), e congeladas inicialmente a -70°C e mantidas durante 48 horas, e a seguir estocadas em nitrogênio líquido (-196°C). Para uso as células foram descongeladas a 37°C e adicionadas em garrafas pequenas (50mL) contendo meio adequado como já descrito. Após adesão das células à superfície da garrafa (~2h), o meio foi trocado, eliminando-se o meio de congelamento contendo o DMSO e eventuais células mortas. A monocamada de células foi rotineiramente observada em microscópio invertido (Olympus, modelo CK2).

5.7 ENSAIOS EM CÉLULAS

5.7.1 Efeitos da hispidulina sobre a viabilidade de células HepG2

5.7.1.1 Método do MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT (REILLY et al., 1998). A redução do MTT decorrente da atividade respiratória de células viáveis produz um sal de formazan insolúvel que é posteriormente solubilizado para quantificação em 550 nm. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplacas (TECAN-Infinite M200).

As células foram colhidas assepticamente, contadas e plaqueadas em placas de 96 poços com aproximadamente 1×10^4 células por poço. Após a aderência (24 h), foram retirados 200 μ L do sobrenadante e adicionada a hispidulina nas suas diferentes concentrações (10 μ M – 200 μ M), nos tempos de 24, 48 e 72 horas. O volume final foi completado para 200 μ L com meio DMEM alta glucose completo. Após o término dos tratamentos, o sobrenadante foi retirado e adicionaram-se 180 μ L de HBSS + 20 μ L da solução de MTT (5 mg/mL), seguindo-se de incubação por 37°C/ 3 h / 5% CO₂. Após 3h retirou-se o MTT que não reagiu, adicionou-se 200 μ L de DMSO, para solubilizar o formazan formado. Os resultados foram obtidos em leitor de microplacas (TECAN-Infinite M200) em 540 nm contra um branco de DMSO. Os resultados foram expressos em percentagem de células viáveis em relação ao controle (100%).

5.7.1.2 Método do Cristal Violeta

Devido a possíveis interferências da hispidulina sobre desidrogenases mitocondriais (Dabagui-Barbosa *et al.*, 2005) em mitocôndrias isoladas de fígado de rato que poderiam afetar os resultados pelo método do MTT, tornou-se importante a realização da análise dos efeitos desta flavona utilizando-se do método do Cristal violeta (KUENG *et al.*, 1989) para confirmar e comparar os resultados obtidos pelas duas técnicas. O ensaio do cristal violeta é útil para

obter informação quantitativa sobre a densidade relativa de células aderidas em placas de cultura. As células aderidas são as viáveis

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, $1,0 \times 10^4$ células por poço, mantidas por 24 h em estufa de CO_2 a 37°C para adesão e crescimento. Após a aderência (24 h), foram retirados 200 μL do sobrenadante e adicionada a hispidulina nas suas diferentes concentrações (10 μM – 200 μM), nos tempos de 24, 48 e 72 horas. O volume final foi completado para 200 μL com meio DMEM alta glucose completo. Após o término dos tratamentos, o sobrenadante foi retirado, as células foram lavadas com PBS, logo após fixadas com 50 μL de metanol por 10 min, e depois coradas com 50 μL cristal violeta 0,2% em etanol 2% por 2 min. O cristal violeta foi retirado e as células lavadas exaustivamente (+5x) com PBS, estas foram, após, eluídas com 200 μL de citrato de sódio 0,05 mol/L em etanol 50% por 10min e realizada homogeneização das amostras. Foi utilizado citrato de sódio 0,05 mol/L em etanol 50% como branco para as determinações de absorbância em leitor de microplaca microplacas (TECAN-Infinite M200) em 540 nm. Os resultados foram expressos em percentagem de células viáveis em relação ao controle (100%). O Cálculo da viabilidade proporcional foi determinado em relação à absorbância média dos controles tratados com o veículo (DMSO).

5.7.2 Níveis intracelulares de ERO

Mudanças relativas na ERO intracelular em células HepG2 foram monitoradas através de uma sonda fluorescente, DCFH-DA (LABEL *et al.*, 1992). DCFH-DA difunde-se através da membrana celular e prontamente é hidrolisada por esterases intracelulares para a não fluorescente 2', 7'-diclorofluorescina (DCFH), que depois é rapidamente oxidada a altamente fluorescente 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF), na presença de ERO. A intensidade de fluorescência do DCF é proporcional à quantidade de ERO formada intracelularmente (Shen *et al.*, 1996). Para o ensaio, as células foram plaqueadas (1×10^4 células/poço) em placas de 96 poços, deixadas por 24 horas em estufa de CO_2 a 37°C para aderirem. Após os tratamentos nos tempos de 24, 48, 72 h e nas concentrações (10 - 100 μM), o meio foi retirado e foi adicionado 5 μL da solução de DCF-DA (2 mM) e 200 μL de PBS. Como

controle positivo foi utilizado o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na concentração de 200 µM dissolvido em PBS, com volume total de 200 µL por poço. Então foi deixado incubando em estufa de CO₂ a 37°C por 30 minutos. A fluorescência foi monitorada em 480 nm de excitação, e 520 nm de emissão. Os resultados foram expressos como percentagem em relação ao controle.

5.7.3 Viabilidade na presença de N-acetilcisteína (NAC)

Para os ensaios de viabilidade na presença de NAC, foi utilizado o método do MTT, assim como foi descrito do item 5.4.1, realizado tratamento com NAC (5 e 10 mM) e co-tratamento com a hispidulina (50 e 100 µM). Os resultados foram expressos como percentagem em relação ao controle.

5.7.4 Análise do ciclo celular

A metodologia foi baseada no ensaio de Vindelov *et. al.* (1983). A linhagem celular (5,0x10⁵ células) foi plaqueada em placas de 60 mm. As células foram tratadas com as concentrações de hispidulina de 25, 50 e 100 µM no tempo de 24 horas. A seguir, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, coletadas por centrifugação, ressuspensas em 1 mL de PBS duas vezes, coradas com iodeto de propídeo, e tratadas com RNaseA. O conteúdo de DNA de cada amostra foi analisado utilizando um citômetro de Fluxo (BD FACScalibur). Os resultados foram expressos como percentagem em relação ao controle.

5.7.5 Avaliação da expressão das enzimas antioxidantes

5.7.5.1 PCR Real Time

A técnica de RT-PCR faz um paralelo entre a síntese de cDNA com a amplificação *in vitro* por PCR e, possibilita dessa forma a clonagem de genes a partir dos mRNAs respectivos e análise de expressão genética. A síntese de DNA é realizada com uma transcriptase reversa que atua em RNA total ou numa fração enriquecida de RNA poliadenilado. A reação de PCR é feita com uma polimerase de DNA, tendo como molde o cDNA da reação anterior. Para

que cada uma dessas enzimas atue, é necessária a presença de iniciadores de síntese (“primers”) cuja sequência vai levar à especificidade do fragmento amplificado. Na reação da transcriptase reversa podem ser usados “primers” específicos para o gene em análise, oligo(dT) ou, então, oligonucleotídeos de constituição aleatória. No PCR subsequente são sempre usados “primers” específicos para o gene em análise, independentemente do tipo de “primers” usados na primeira reação.

5.7.5.2 Isolamento de RNA e síntese de cDNA

As células foram plaqueadas em uma densidade de 1×10^6 células por 60 milímetros da placa. Após a incubação durante 24 horas, as culturas foram tratadas com hispidulina nas concentrações de 25, 50 e 100 μ M por 24 h. O RNA total foi isolado usando o kit de isolamento spin Mini RNA (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante e armazenadas a -80 °C. Um micrograma de RNA foi transcrito reversamente usando oligo (dT) e Sbscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). A síntese do cDNA foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e o cDNA resultante foi armazenado a -20°C.

5.7.5.3 Quantificação dos níveis de mRNA por real-time RT-PCR

Usando cDNAs como modelo, PCR quantitativo em tempo real foi realizado utilizando o SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) em um TM StepOnePlus Real-Time PCR Detection System (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se *primers* específicos para genes humanos CuZnSOD, MnSOD, CAT, Gred, Gpx1. Um ciclo de dissociação foi realizado após cada corrida para verificar se houve amplificação não-específica ou contaminação. Os níveis de expressão de mRNA foram normalizados utilizando o software de 3,4 geNorm e os correspondentes níveis de expressão gênica HPRT, tubulina e GAPDH. Níveis de expressão relativa foram estimados utilizando o método descrito no Pfaffl, 2001. Conjuntos de primers específicos foram desenhados, utilizando o software Primer Express

(Applied Biosystems), e validadas através de BLAST e BLAT, e suas sequências são mostradas na Tabela 1.

TABELA 1 - SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DOS PRIMERS UTILIZADOS PARA RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

| Gene | Primers oligonucleotídeos |
|----------|---|
| hCuZnSOD | F: 5' - GTGCAGGGCATCATCAATTC - 3' R: 5' - AATCCATGCAGGCCTTCAGT - 3' |
| hZnSOD | F: 5' - GGACACTTACAAATTGCTGCTTGT - 3' R: 5' - AGTAAGCGTGCTCCCACACAT - 3' |
| hCAT | F: 5' - GATAGCCTTCGACCCAAGCA - 3' R: 5' - ATGGCGGTGAGTGTCAGGAT - 3' |
| hGSR | F: 5' - GTGGCACTTGCGTGAATGTT - 3' R: 5' - GGAAAGCCATAATCAGCATGATC - 3' |
| hGpx1 | F: 5' - TGCTGGCCTCCCCTTACAG - 3' R: 5' - GCACACATGGCGCAATTG - 3' |
| hGAPDH | F: 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3' R: 5'-CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3' |
| hTubulin | F: 5' - TCAACACCTTCTTCAGTGAAACG-3' R: 5' - AGTGCCAGTGCGAACTTCATC-3' |
| hHPRT | F: 5'-GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA-3' R: 5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3' |

5.7.6 Detecção de glutatona total e glutatona oxidada (GSSG)

As análises foram realizadas seguindo-se os protocolos de Griffith (1980), He *et al.* (2003), Rahman *et al.* (2007) adaptados. Para o ensaio, as células foram plaqueadas (5×10^5 células/poço) em placas de 96 poços, deixadas por 24 horas em estufa de CO₂ a 37°C para aderirem. Após os tratamentos no tempo e nas concentrações definidas, foi retirado o sobrenadante e efetuada uma lavagem com PBS para a retirada de eventuais células mortas. Foram acrescentados 450 µL de HCl 10 mM e as células retiradas com Scraper e estocadas a -20°C.

Para a análise, as células foram lisadas por processo de congelamento e descongelamento por 5 vezes. Foram centrifugadas a 10.000g por 10 minutos à 4°C e 350 µL do sobrenadante foram coletados. Deste volume, 5µL foram

retirados para a quantificação de proteína pelo método de Bradford (1976). Aos 300µL restantes, foi adicionado 300µL de ácido 5-sulfosalicílico e misturado em agitador de tubos tipo Vortex. Para a precipitação de proteína, as amostras foram deixadas em gelo por 5 minutos, quando foi realizada nova centrifugação a 10.000g por 10 minutos, com as amostras ainda mantidas em 4°C. Foram coletados 200 µL do sobrenadante e separados em 2 alíquotas iguais de 100 µL, uma para a quantificação de GS total e outra para GSSG.

Para a alíquota que foi mensurada GSSG, 2-vinilpiridina foi adicionada para a concentração final de 2% (v/v), a solução foi misturada em Vortex e deixada por 1 h na capela. A neutralização foi realizada com adição de trietanolamina (0,05 mM), para um pH final igual a 7. Foram distribuídos 20 µL da amostra para a quantificação de GS total por poço da placa de 96 poços e para GSSG foram utilizados 60 µL. Imediatamente, 100 µL da mistura fresca preparada [(DTNB 5,5'-ditio-bis(2- ácido nitrobenzoico) 6 mM; tampão fosfato/EDTA pH 7.5 e 20 unidades de glutathione redutase)] foram pipetados em cada poço. Após esta adição, foram adicionados 50 µL de NADPH (1 mM).

A absorbância foi realizada em 415 nm, em um leitor marca Biotek, modelo ELX800, em intervalos de 5 minutos até 20 minutos. Os níveis de GS total foram comparados com padrões de GSH e os níveis de GSSG com padrões de GSSG, com curvas padrão, corrigidas para a quantidade de proteína contida em cada amostra.

5.7.7 Determinação da concentração de proteínas

A quantificação de proteína foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando soluções de BSA como padrão.

5.7.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR HepG2

6.1.1. Ensaios de viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT e Cristal Violeta

Neste trabalho nós testamos a influência da flavona hispidulina sobre a viabilidade da linhagem HepG2 nos tempos de 24, 48 e 72 horas utilizando-se a metodologia do MTT e do cristal violeta. A finalidade desses experimentos foi fazer uma comparação entre os dois métodos verificando os efeitos dessa flavona sobre a viabilidade celular e relacioná-los para uma melhor confiabilidade dos resultados, visto que anteriormente no nosso laboratório verificou-se que a hispidulina diminui a atividade de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de rato em sistema *in vitro* (DABAGUI-BARBOSA *et al.*, 2007; HERRERIAS *et al.*, 2008; VALDAMERI, 2008), o que, a princípio, poderia afetar os resultados utilizando a técnica do MTT.

Na análise de viabilidade das células HepG2 após tratamento com a hispidulina pela técnica do MTT, verificou-se que a flavona nas doses de 50, 100 e 200 μM , foi capaz de reduzir a viabilidade das células HepG2 em 24%, 45% e 53% respectivamente após 24 horas de incubação em comparação com a condição controle, onde as células HepG2 foram tratadas apenas com o veículo da droga - DMSO. Quando as células foram tratadas com a hispidulina nas doses de 50, 100 e 200 μM por 48 horas verificou-se uma redução na viabilidade de 36%, 51% e 68% respectivamente. Após o tratamento das células HepG2 por 72 horas com a hispidulina nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 μM verificou-se uma redução na viabilidade de 41%, 60%, 82% e 91% respectivamente (Figura 9).

Utilizando-se a metodologia do Cristal Violeta, verificou-se que a hispidulina nas doses de 50, 100 e 200 μM , foi capaz de reduzir a viabilidade das células HepG2 em 28%, 42% e 53% respectivamente após 24 horas de

incubação em comparação com a condição controle, onde as células HepG2 foram tratadas apenas com o veículo da droga - DMSO. Quando as células foram tratadas com a droga nas doses de 50, 100 e 200 μM por 48 h verificou-se uma redução na viabilidade de 37%, 53% e 71% respectivamente. Após o tratamento das células com a hispidulina por 72 horas, nas doses de 25, 50, 100 e 200 μM observou-se que houve uma redução na viabilidade de 19%, 39%, 58% e 91% respectivamente. Nas outras doses e tempos testados não se observou diferenças significativas em relação à condição controle com DMSO (Figura 10).

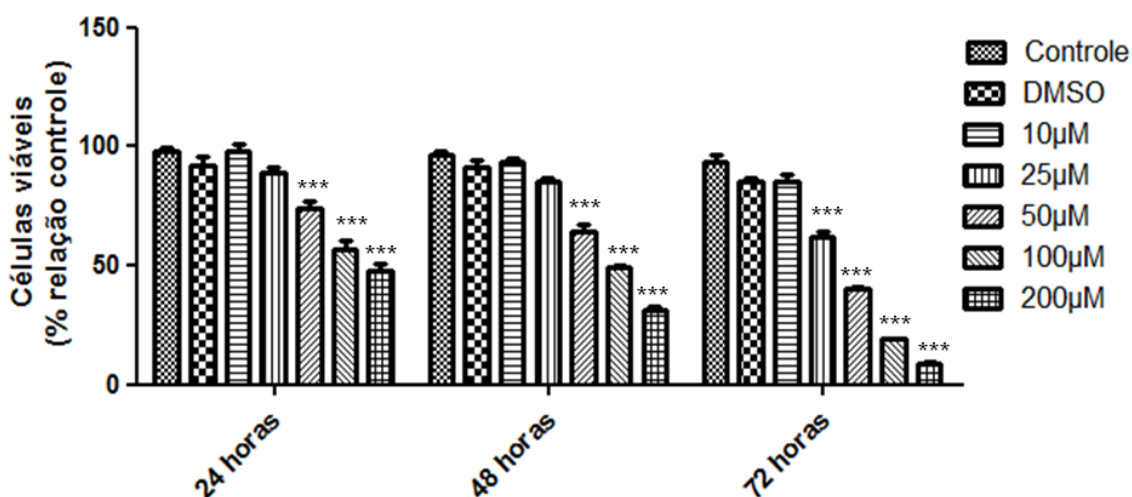


FIGURA 9: EFEITO DA HISPIDULINA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS - MTT

FONTE: O Autor (2011)

NOTA: Os experimentos foram realizados em triplicata conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos no item 5.7.1.1, em volume final de 200 μL em meio DMEM alta glicose completo, no controle somente foi adicionado o meio. A hispidulina foi incubada nas doses indicadas (μM) por 24, 48 e 72 horas a 37°C. O volume de DMSO utilizado foi de 0,1% (v/v). Os resultados estão expressos como porcentagem em relação ao controle com DMSO (100%) e são média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. *** $p < 0,001$.

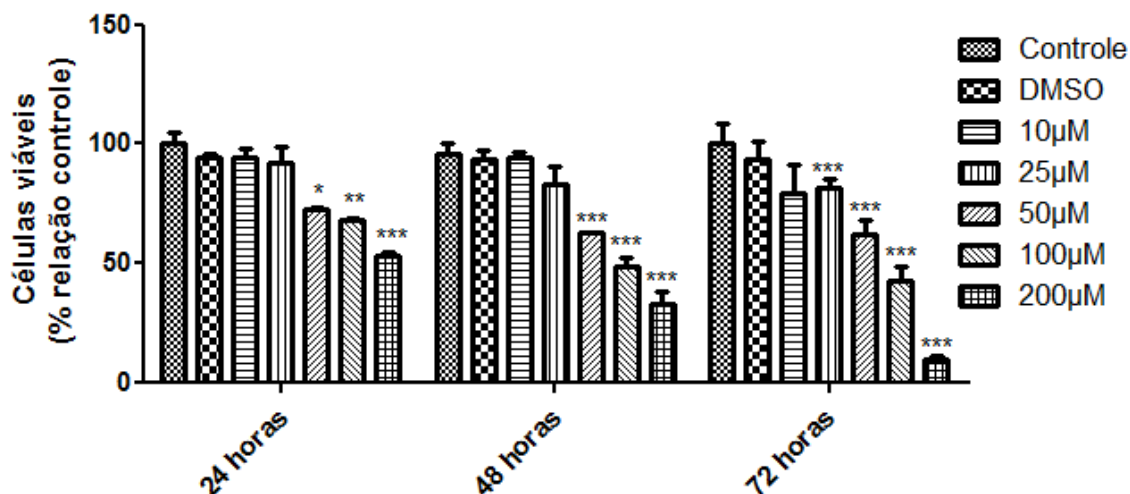


FIGURA 10: EFEITO DA HISPIDULINA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS – CRISTAL VIOLETA

FONTE: O Autor (2011)

NOTA: Os experimentos foram realizados em triplicata conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos no item 5.7.1.2, em volume final de 200µL em meio DMEM alta glucose completo, no controle somente foi adicionado o meio. A hispidulina foi incubada nas doses indicadas (µM) por 24, 48 e 72 horas a 37°C. O volume de DMSO utilizado foi de 0,1% (v/v). Os resultados estão expressos como percentagem em relação ao controle com DMSO (100%) e são média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Na Tabela 2 encontram-se os resultados obtidos na análise dos efeitos da hispidulina sobre a viabilidade celular utilizando as duas metodologias (MTT e Cristal Violeta)

TABELA 2 – COMPARAÇÃO DOS EFEITOS PROMOVIDOS PELA HISPIDULINA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 UTILIZANDO-SE OS MÉTODOS DO MTT E CRISTAL VIOLETA

| Hispidulina (μM) | Método MTT (%) | | | Método Cristal violeta (%) | | |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|--------------------|
| | 24h | 48h | 72h | 24h | 48h | 72h |
| Controle | 98,2 \pm 6,4 | 96,4 \pm 4,8 | 93,8 \pm 8,9 | 99,8 \pm 5,5 | 96,1 \pm 2,3 | 100 \pm 6,7 |
| DMSO | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 10 | 97,8 \pm 8,1 | 93,3 \pm 4,2 | 85,4 \pm 8,6 | 94,1 \pm 6,6 | 94,3 \pm 3,7 | 79 \pm 12,7 |
| 25 | 88,8 \pm 6,8 | 85,3 \pm 4,6 | 62,2 \pm 6,3*** | 91,8 \pm 11,7 | 82,9 \pm 13,4 | 81,1 \pm 7,4 |
| 50 | 74,2 \pm 7,5*** | 64,4 \pm 7,2*** | 40,3 \pm 2,1*** | 72,2 \pm 2,1* | 62,7 \pm 0,2*** | 61,7 \pm 10,5*** |
| 100 | 56,8 \pm 9,7*** | 48,8 \pm 4,1*** | 18,9 \pm 1,5*** | 68,2 \pm 1, ** | 48,1 \pm 6,6*** | 42,4 \pm 10,5*** |
| 200 | 47,5 \pm 9,2*** | 31,6 \pm 3,4*** | 9,1 \pm 1,1*** | 53,3 \pm 2,2*** | 32,8 \pm 8,7*** | 9,3 \pm 3,1*** |

NOTA: Os resultados estão expressos como a quantidade de células viáveis em percentagem em relação ao controle (100%). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Esses resultados demonstraram que a hispidulina é capaz de promover uma redução da viabilidade das células HepG2 dependente tanto da dose quanto do tempo de tratamento pelos dois métodos. Porém, é importante destacar que os mecanismos moleculares que mediam estes efeitos da hispidulina ainda não estão bem elucidados. Nos tempos de 24 e 48 h de tratamento os resultados foram semelhantes nas doses testadas, contudo, nas doses de 50 e 100 μM no tempo de 72 h, os efeitos mostraram-se mais pronunciados com o método do MTT. Estes resultados poderiam ser explicados por possíveis efeitos da hispidulina sobre as desidrogenases mitocondriais que interfeririam com o método do MTT.

Já foi verificado em nosso laboratório que a hispidulina na concentração de 100 μM em 24 horas de tratamento, reduziu em 40% a viabilidade celular da linhagem de células HeLa (BARBOSA *et al.*, 2005; HERRERIAS, 2005), além de reduzir em 20% a proliferação de células de melanoma humano B16-F10 em 48 horas de tratamento na dose de 10 μM utilizando o método do cristal violeta (HERRERIAS, 2009).

Os resultados obtidos estão de acordo também com os observados com outras flavonas que promoveram efeitos dependentes tanto do tempo quanto da dose, como por exemplo, Singh *et al.* (2005) que verificaram, utilizando-se

método do azul de tripan, que o tratamento com a acacetina (5,7-diidroxi-4'-metoxiflavona), uma flavona metoxilada com hidroxilas nas posições 5 e 7, promove inibição do crescimento celular em células de câncer de próstata nas linhagens celulares LNCaP e DU145. Acacetina nas doses de 25, 50 e 100 μM apresentou inibição do crescimento celular que variou entre 30-63% com 24 h de tratamento, 45-77% com 48 horas e 50-80% com 72 horas de tratamento nas células LNCaP acompanhado de morte celular. Acacetina também inibiu a proliferação celular em células de carcinoma gástrico humano (AGS) de forma dose e tempo-dependente (20-100 μM , 4-48 horas) (PAN *et al.*, 2005).

Foi verificado em nosso laboratório que a apigenina (10-100 μM) (Figura 6), que possui as hidroxilas nas mesmas posições que a hispidulina porém não possui o grupo metoxi (na posição 6), é capaz de promover redução da viabilidade das células HepG2 de 16,7% com a menor dose (10 μM) e 40% com a maior dose (100 μM) após tratamento de 24 horas utilizando-se do método do cristal violeta (VALDAMERI *et al.*, 2011). Quando compara-se estes resultados com os obtidos neste trabalho com a hispidulina, pode-se verificar que o grupamento metoxi encontrado na hispidulina promoveu efeitos menores que aqueles observados com a apigenina, já que na dose menor (10 μM) a redução de viabilidade foi de 6% e na dose de 100 μM a redução foi de 32% utilizando-se o mesmo método.

Outra flavona que também promove efeitos dependentes da dose sobre células tumorais é a luteolina (Figura 6), porém a luteolina apresenta anel catecol no anel B (hidroxilas em 3' e 4'), o que confere um maior potencial para os efeitos antiproliferativos, como por exemplo no trabalho de Yee *et al.* (2003), no qual a luteolina reduziu a viabilidade de células HepG2 em aproximadamente 50% na dose de 10 μM e aproximadamente 60% na maior dose (25 μM) com 48 horas de tratamento utilizando-se o método do MTT. A hispidulina neste trabalho apresentou reduções na viabilidade celular de apenas 7% na dose de 10 μM e 15% na dose de 25 μM utilizando-se do mesmo método, indicando então a importância do anel catecol sobre redução da viabilidade de células HepG2. Também pode-se levar em consideração que a hispidulina apresenta o grupamento 6-metoxi, o que também pode ser responsável pela diminuição do efeito antiproliferativo observado quando

comparados seus efeitos aos da luteolina, que não possui esse grupamento (HERRERIAS, 2009).

6.1.3 Análise de ciclo celular

Para avaliar se a redução da viabilidade promovida pela hispidulina poderia ser consequência de alterações no ciclo celular, foi avaliado o efeito desse composto sobre a progressão das células HepG2 pelas diferentes fases do ciclo celular. Os resultados obtidos estão indicados na Figura 11, e mostram que o tratamento das células HepG2 com hispidulina nas doses de 50 e 100 μM promove um aumento da porcentagem de células na fase subG1 de 40% e 62% e uma diminuição de 10% e 14% na porcentagem de células na fase G1 (tempo de 24h) em comparação com a condição controle com DMSO

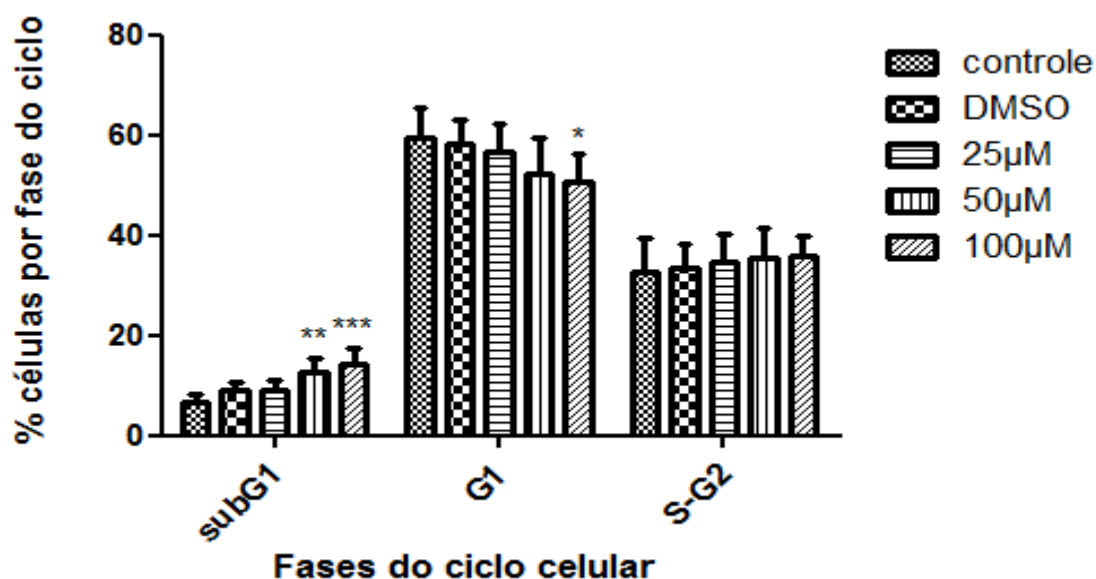


FIGURA 11 – EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE AS FASES DO CICLO CELULAR EM CÉLULAS HepG2

FONTE: O Autor (2011)

NOTA: Os experimentos foram realizados em triplicata conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos no item 5.7.4 em meio DMEM alta glucose completo. A hispidulina foi incubada nas doses indicadas (μM) por 24 horas a 37°C. Os resultados estão expressos como porcentagem em relação ao controle com DMSO (100%) e são média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Esses dados sugerem a ocorrência de morte celular, sendo que observou-se um aumento na porcentagem de células na fase subG1 de maneira dose dependente, indicativo de aumento de número de células com conteúdo de DNA fragmentado.

Vários flavonóides já foram testados em relação a alterações no ciclo celular, entre eles foi estudado o mecanismo de apoptose induzida por acacetina em células de câncer de mama humano MCF-7 (SHIM *et al.*, 2007). Apoptose foi caracterizada pela fragmentação do DNA e um aumento de sub-G1. Quando as células foram tratadas e, posteriormente, marcadas com PI, seus conteúdos de DNA foram analisados por citometria de fluxo. Observou-se um aumento na população de células em sub-G1 em aproximadamente 24, 34 e 40% após incubação com 50, 100 e 150 μM de acacetina, respectivamente.

Pan *et al.* (2005), também observaram que a acacetina na dose de 60 μM apresentou porcentagem de células apoptóticas de aproximadamente 24, 26, 40 e 60% após 6, 9, 12 e 24 h de incubação respectivamente, e 35, 48, 53, 58 e 62% após incubação com 20, 40, 60, 80 e 100 μM de acacetina respectivamente em células de carcinoma gástrico humano (CCRC 60102).

Kilani-jaziri *et al.* (2011) constataram que luteolina e apigenina induziram a apoptose e promoveram discretas perturbações no ciclo celular em células de câncer humano de eritroleucemia (K562) e de bexiga (RT112) tratadas com as flavonas. Quando as células RT112 foram tratadas com luteolina (50 μM) ou apigenina (50 μM) durante 24 horas, um aumento considerável na população de células marcadas com anexina V foi observado. A porcentagem de células apoptóticas aumentou de $3,5 \pm 0$ (controle) para 22 ± 1 e $30 \pm 1\%$, respectivamente. Com células K562 confirmou que após o tratamento durante 24 horas com 100 μM de luteolina ou apigenina, 17 ± 3 e $20 \pm 0,3\%$, respectivamente, de células foram apoptóticas, em comparação às células controle ($3 \pm 0,3 \%$) Em relação as fases do ciclo celular, observou-se um aumento no número de células RT112 na fração sub-G1, um pequeno decréscimo na fração G0/G1, e um ligeiro acúmulo de células na fase G2/M após tratamento com ambas as flavonas (50 μM , 24 h) . Nas células K562 a fração sub-G1 aumentou significativamente após 24 e 48 horas de incubação com as flavonas, porém estes tratamentos não induziram perturbação notável do ciclo celular. Estes autores concluíram que a apigenina e luteolina foram

capazes de desencadear morte celular por apoptose nas duas linhagens celulares.

Alguns mecanismos de indução de morte celular envolvem o aumento de ERO e como já foi observado que a hispidulina pode afetar a atividade de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, os níveis dessas espécies foram analisados a seguir. Também foram realizadas análises para confirmar se a redução da viabilidade celular verificada com a hispidulina (Fig. 6 e 7) estaria relacionada com o aumento de ERO, utilizando-se análise da viabilidade na presença de hispidulina com um tratamento simultâneo com um antioxidante, a N-acetilcisteína (NAC).

6.1.4 Avaliação dos níveis intracelulares de ERO

Nos experimentos para avaliar os níveis intracelulares de ERO, utilizando-se a sonda DCFH-DA, observou-se que a hispidulina promove o aumento dessas espécies de maneira estatisticamente significativa somente nas concentrações mais elevadas avaliadas neste estudo em comparação com a condição controle com DMSO (Figura 12). Após 24 horas de tratamento com a hispidulina nas doses de 50 e 100 μ M (doses que verificamos efeitos tanto na viabilidade quanto sobre o ciclo celular), observou-se um aumento de 49% e 61% respectivamente; após incubação de 48 horas com hispidulina o aumento foi de 55% e 122%. Após 72 horas de tratamento houve um aumento de 37%, 92% e 177% nas concentrações de 25, 50 e 100 μ M respectivamente, não sendo observada formação significativa de ERO nas outras concentrações e tempos estudados.

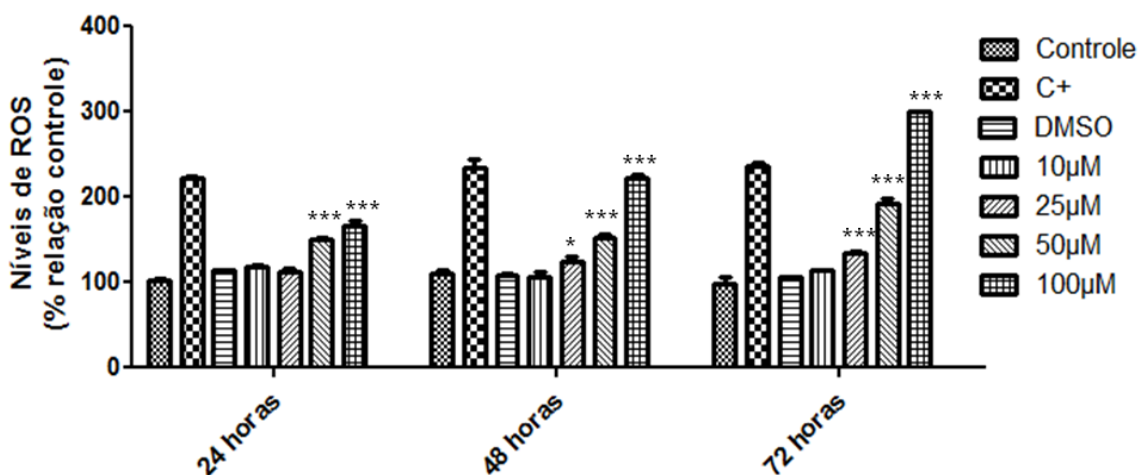


FIGURA 12: EFEITO DA HISPIDULINA SOBRE OS NÍVEIS INTRACELULARES DE ERO EM CÉLULAS HepG2 NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 H

FONTE: O Autor (2011)

NOTA: Os experimentos foram realizados conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos no item 5.7.2 em volume final de 200 µL em meio DMEM alta glucose completo, no controle somente foi adicionado o meio. O volume de DMSO utilizado foi de 0,1% (v/v). Como controle positivo (C+) utilizou-se o H₂O₂ na concentração de 400 µM. Os resultados estão expressos como percentagem em relação ao controle com DMSO (100%) e são média ± desvio padrão de 4 experimentos realizados em triplicata. *p< 0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Estudos anteriores utilizando compostos polifenólicos já demonstraram que o aumento dos níveis de ERO pode gerar um dano oxidativo à membrana mitocondrial e esse dano pode apresentar um papel significativo na indução de morte celular por apoptose (PELED-KAMAR *et al.*, 1995).

Dabagui-Barbosa *et al.* (2005), observaram que a hispidulina é capaz de reduzir as atividades dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial quando utilizou-se mitocôndrias isoladas de fígado de rato. A presença de hispidulina (0,2 mM) nestes sistemas inibiu significativamente as atividades dos componentes da cadeia respiratória entre os complexos I e III, o que poderia levar a um aumento excessivo da produção intracelular de ERO.

Herrerias (2009) constatou que a hispidulina (50 µM) em células de melanoma humano (B16-F10), após 24 h de tratamento, estimulou a atividade de SOD (40%) e inibiu a atividade da catalase (25%), e relacionou esse aumento da atividade de SOD conjuntamente com a inibição da catalase a um

aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio nas células, levando ao aumento de processos oxidativos e geração de danos celulares.

Outras flavonas também alteram a geração intracelular de ERO, como a acacetina, uma flavona metoxilada, que é capaz de induzir a formação dessas espécies em linhagem de células de câncer humano MCF-7 (SHIM *et al.*, 2007). Estes autores utilizaram a sonda DCFH-DA, sendo os tratamentos feitos na presença e ausência de 100 μM de acacetina no tempo de 12 horas, e a análise feita em microscópio de fluorescência. Os autores observaram um aumento de aproximadamente 100% na fluorescência da amostra tratada com a acacetina, indicativo de um aumento na geração de ERO.

Gupta *et al.* (2001), estudaram o efeito da apigenina (1-80 μM) sobre a produção de ERO, utilizando a sonda DCFDA, e observaram um aumento dose-dependente de ERO em relação ao controle no tempo de 3 horas de tratamento em células de câncer de próstata humano 22Rv1. Este aumento de ERO intracelular induzido por apigenina mostrou-se correlacionado positivamente com a indução de apoptose celular.

Contudo, Leung *et al.* (2006) estudaram o papel que desempenham as espécies reativas de oxigênio na apoptose induzida por outra flavona, a luteolina, sendo que a produção de espécies reativas de oxigênio foi examinado por meio de uma sonda fluorescente sensível a espécies oxidantes, CM-H2DCFDA. Os resultados mostraram que o tratamento com luteolina (50 μM) não teve efeito significativo sobre células de câncer de pulmão humano CH27.

Para confirmar a hipótese de que o aumento de ERO induzido pela hispidulina poderia estar influenciando a redução da viabilidade verificada anteriormente, a seguir foram realizadas análises utilizando NAC.

6.1.5 Viabilidade na presença de N-acetilcisteína (NAC)

NAC é um potente antioxidante que pode inibir o estresse oxidativo diretamente através da remoção das espécies reativas de oxigênio pelo reabastecimento dos níveis de GSH intracelular (CHANG *et al.*, 2010). Para comprovar o envolvimento do aumento de espécies reativas de oxigênio no mecanismo de indução de morte celular induzido pela hispidulina (50 e 100 μM) foi realizada a mesma análise de viabilidade celular na presença e na

ausência de NAC (co-tratamento por 24 h) e os resultados estão representados na Figura 13. Quando foi realizada a análise somente na presença de hispidulina (50 μ M) verificou-se uma redução de 28% na viabilidade celular, contudo, quando foi realizada a análise com tratamento simultâneo com NAC (5 mM) esta redução caiu para 22% e quando utilizou-se 10 mM de NAC a redução foi de apenas 14%. Após o tratamento com hispidulina (100 μ M) por 24 h a redução de viabilidade foi de 36%, porém com a adição de NAC (5 mM) essa redução foi de 23% passando para 17% quando o dobro da concentração de NAC (10 mM) foi utilizado (Figura 13).

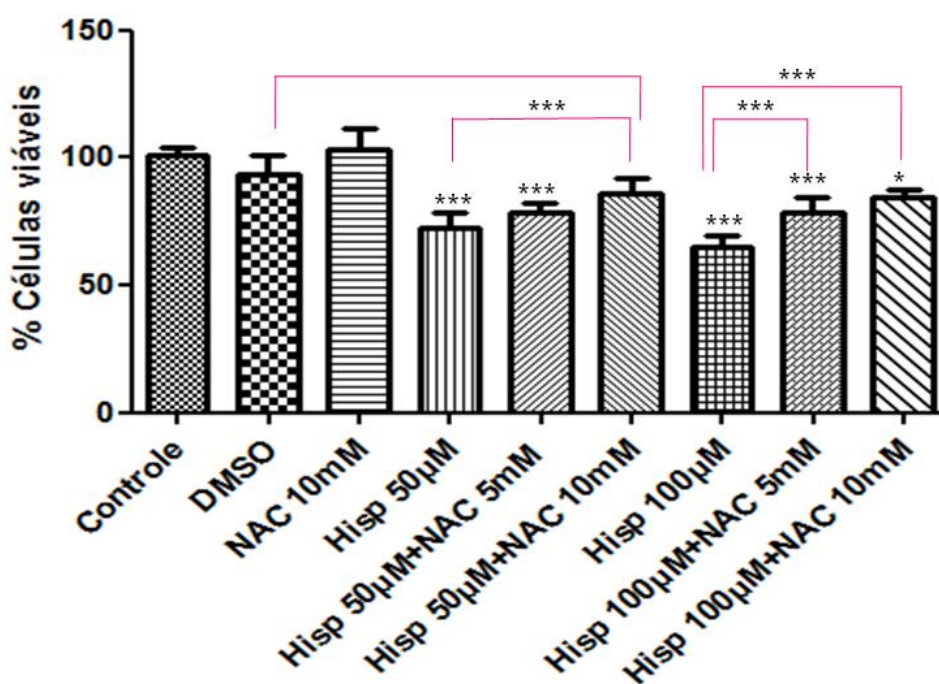


FIGURA 13: EFEITO DA HISPIDULINA E NAC SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2 APÓS DE 24 HORAS DE TRATAMENTO

FONTE: O Autor (2011)

NOTA: Os experimentos foram realizados em triplicata conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos no item 5.4.4, em volume final de 200 μ L em meio DMEM alta glucose completo, no controle somente foi adicionado o meio. A hispidulina foi incubada nas doses indicadas (μ M) por 24 horas a 37°C, com ou sem adição de NAC (5 e 10 mM). O volume de DMSO utilizado foi de 0,1% (v/v). Os resultados estão expressos como porcentagem em relação ao controle com DMSO (100%) e são média \pm desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata. Valores com diferenças estatisticamente significativas do controle * p < 0,05, ** p <0,01, *** p <0,001.

Os resultados observados demonstraram que quando a NAC é adicionada ao meio de cultura, ocorre uma proteção contra a morte celular induzida pela hispidulina, visto que houve um aumento significativo na viabilidade celular quando o co-tratamento foi realizado, este efeito acontece possivelmente pelo aumento dos níveis de GSH intracelular e diminuição dos níveis de ERO.

Os resultados obtidos estão de acordo com os obtidos por Pan *et al.* (2005) que investigaram o mecanismo antitumoral da acacetina verificando a produção intracelular de ERO, como um fator importante na indução de apoptose celular em linhagens de células de carcinoma gástrico humano AGS (CCRC 60102). Fazendo o tratamento das células de carcinoma gástrico por 1 hora com antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), N-acetilcisteína (NAC), catalase (CAT), alopurinol (ALL), e ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC), seguido de tratamento com acacetina (60 $\mu\text{mol/L}$, 24 h) observaram que NAC (2,5 e 5 mM) e CAT (200 unidades/mL) protegeu as células AGS (CCRC 60102) dos efeitos do tratamento com a acacetina de maneira dependente da dose.

Shin *et al.* (2007) estudaram o mecanismo que acacetina induzia apoptose em células câncer de mama humano MCF-7. Após o pré-tratamento (1 h) das células com N-acetilcisteína - NAC (5 mM) e co-tratamento com acacetina (100 μM) observaram uma redução na geração de ERO de aproximadamente 50% e inibição do crescimento celular da linhagem MCF-7 em aproximadamente 30%, já que sem a adição de NAC, a redução de viabilidade era de aproximadamente 60% e com a adição de NAC a redução foi de aproximadamente 30%.

Shukla e Gupta (2008), avaliaram os efeitos da apigenina (20 e 40 μM) na indução de morte celular da linhagem de células de câncer de próstata humano (22Rv1) e observaram que esta pode ser iniciada por espécies reativas de oxigênio, além da ativação da proteína p53. As células foram tratadas ou não com NAC por 3 h e observou-se que o tratamento das células com a flavona antes da exposição ao NAC causou um aumento na geração de ERO em 50 e 100% respectivamente, já com a adição de NAC, houve uma diminuição na quantidade de ERO de aproximadamente 50% em relação as células tratadas somente com apigenina (20 μM), sugerindo que ERO pode

regular o processo apoptótico de células após o tratamento das células com apigenina.

O aumento de espécies reativas de oxigênio induzida pela hispidulina e a redução de viabilidade observada após a adição de NAC pode ser um indicativo dos efeitos desta flavona sobre os níveis de GSH e GSSG. Por este motivo foram realizados a seguir as análises dos efeitos da hispidulina sobre a relação GSH/GSSG.

6.1.6 Efeitos da hispidulina sobre os níveis de glutathiona e sobre a relação GSH/GSSG

Devido à citotoxicidade induzida pela hispidulina provocar um acúmulo de ERO e redução da viabilidade, sendo esta parcialmente revertida pela presença de NAC, foi investigado se a hispidulina é capaz de afetar os níveis de glutathiona total e a relação GSH/GSSG. Os efeitos da hispidulina sobre os níveis de glutathiona total estão colocados na figura 14 A. Observou-se uma diminuição significativa dos níveis de glutathiona intracelular de 43% e 52% após o tratamento das células HepG2 com a hispidulina nas doses de 50 e 100 μM no tempo de 24 horas. Nas mesmas condições de tratamento verificou-se uma diminuição de 36% e 46% respectivamente na relação GSH/GSSG (Figura 14 B).

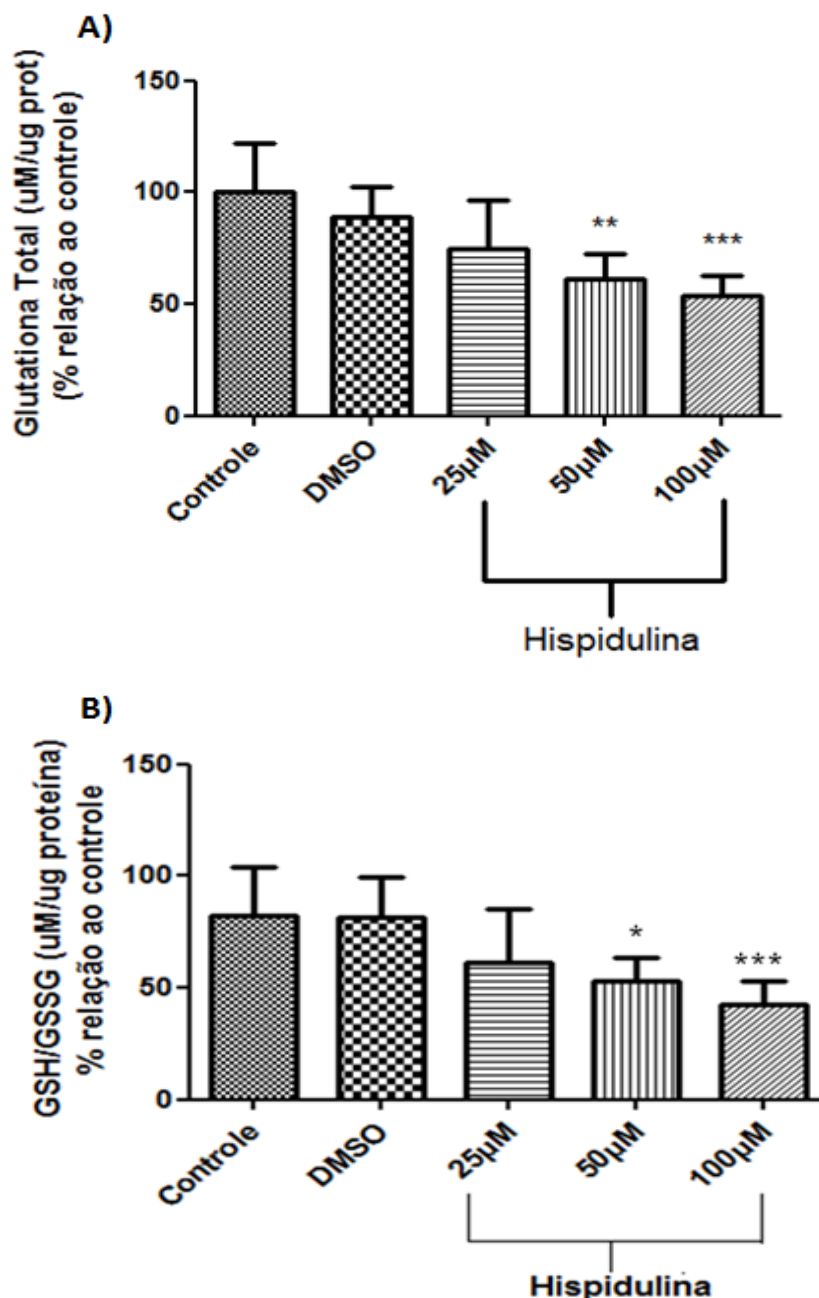


FIGURA 14 – EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE A) OS NÍVEIS DE GLUTATIONA TOTAL E B) SOBRE A RELAÇÃO GSH/GSSG NAS CÉLULAS HepG2

FONTE: O Autor (2011)

NOTA: Os experimentos foram realizados em triplicata conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos no item 5.4.7 em meio DMEM alta glucose completo, no controle somente foi adicionado o meio. A hispidulina foi incubada nas doses indicadas (μM) por 24 horas a 37°C . O volume de DMSO utilizado no controle foi de 0,1% (v/v). Os resultados estão expressos como porcentagem em relação ao controle (100%) e são média \pm desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Anteriormente foi verificado em nosso laboratório que os níveis de glutathiona total e oxidada com outros flavonóides como a flavona, a quercetina, a apigenina e a luteolina em células de melanoma B16-F10. Com a flavona e a quercetina não houve diferença significativa nos níveis de glutathiona, porém com a apigenina e luteolina os resultados indicaram uma diminuição de glutathiona total (GSx) em células tratadas com as drogas em diferentes doses. Observou-se uma redução significativa nas com a apigenina doses de 10, 25 e 50 μM em aproximadamente 50% em relação ao controle nas doses testadas durante tratamento com as flavonas por 24 horas. A luteolina também reduziu em aproximadamente 50% os níveis de glutathiona total nas mesmas doses e reduziu ainda mais na dose de 50 μM (WORFEL, 2009), o que está de acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, já que houve uma redução de aproximadamente 25 e 40% respectivamente para as concentrações de 25 e 50 μM de hispidulina e de 48% para a concentração de 100 μM .

Shukla e Gupta (2008) verificaram que o tratamento com a apigenina na dose 40 μM por 1h promoveu uma redução de 67% nos níveis de glutathiona em células de câncer de próstata humano 22Rv1, chegando a 81% de redução nos níveis de glutathiona após 3h de tratamento

Segundo os estudos de Kachadourian *et al.* (2006), as flavonas crisina e apigenina foram as mais eficazes em diminuir os níveis de GSH intracelular em células de câncer de próstata humano PC-3. Os autores demonstraram uma diminuição de 50% nos níveis de GSH intracelular no prazo de 24 horas de exposição a 25 μM de crisina e de aproximadamente 70% com a apigenina nas mesmas condições de tratamento. A crisina também diminuiu em 50% os níveis de glutathiona nas células de câncer mielóide HL-60 na dose de 50 μM em 24 horas de tratamento.

Apigenina e naringenina (4',5,7-trihidroxi-flavanona) (5, 10 e 25 μM) promovem a oxidação da GSH intracelular, catalisada pela peroxidase e peróxido de hidrogênio, com uma eficiência muito alta (50-80%). A taxa de oxidação de GSH foi dependente da concentração das flavonas (GALATI, *et al.*, 1999).

Nossos resultados sugerem que a hispidulina é capaz de aumentar os níveis de ERO por diminuir os níveis de glutathiona total e reduzir a relação GSH/GSSG. Entretanto, os níveis de ERO também podem ser afetados pelas atividades de enzimas antioxidantes e não são conhecidos os efeitos da

hispidulina sobre a expressão dessas enzimas. Para verificar a hipótese de a hispidulina poder induzir o aumento de ERO por afetar as enzimas antioxidantes foram realizadas as análises a seguir.

6.1.7 Avaliação da expressão das enzimas antioxidantes

Os níveis de expressão das enzimas catalase (CAT), Cu/Zn-superóxido dismutase (CuZnSOD), Mn-superóxido dismutase (MnSOD), glutathiona peroxidase (GPx1), e glutathiona redutase (Gred) foram avaliados por RT-PCR em células HepG2 após o tratamento com hispidulina (25, 50 e 100 μM) por 24 h. Os resultados obtidos estão representados na Figura 16 e mostram os dados de expressão relativa de mRNA normalizados pelo programa geNorm 3,4 software, utilizando três genes normalizadores HPRT, HMBS e GAPDH. Pode-se observar que as células HepG2 tratadas com hispidulina nas doses de 50 e 100 μM apresentaram níveis significativamente mais baixos (38 – 40%) de expressão de mRNA da enzima CAT. Os níveis de expressão de mRNA de MnSOD, CuZnSOD, GPx1, e Gred não foram alterados significativamente nestas condições (Figura 16).

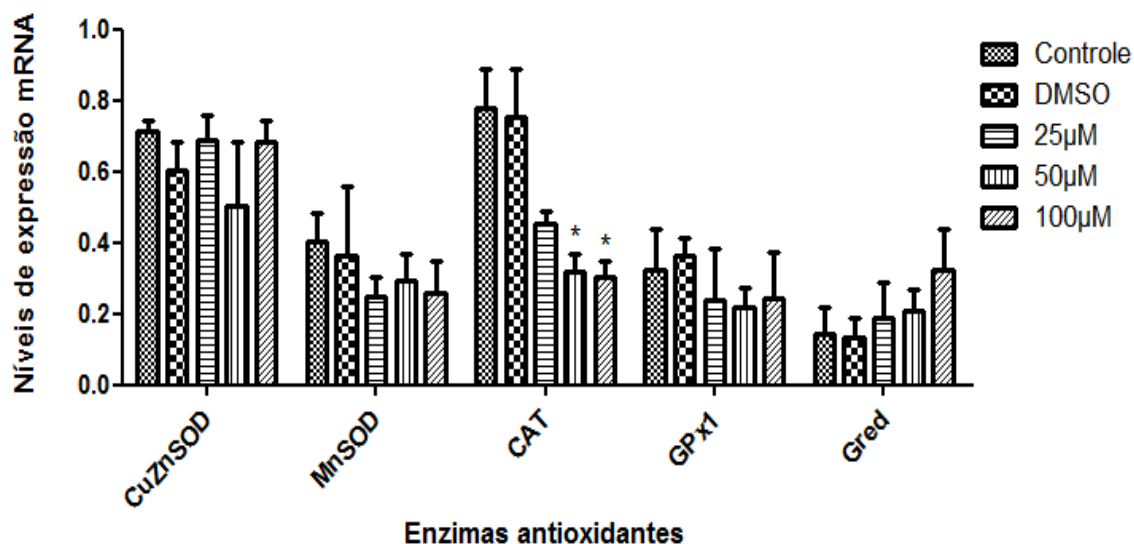


FIGURA 16 – EFEITOS DA HISPIDULINA NOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE mRNA DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM CÉLULAS HEPG2

FONTE: O Autor (2011)

NOTA: Os experimentos foram realizados em triplicata conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos no item 5.4.6 em meio DMEM alta glucose completo, no controle somente foi adicionado o meio DMEM alta glucose completo. A hispidulina foi incubada nas doses indicadas (μM) por 24 horas a 37°C . O volume de DMSO utilizado foi de 0,1% (v/v). Os resultados estão expressos como porcentagem em relação ao controle com DMSO (100%). *Valores com diferenças estatisticamente significativas do controle com DMSO ($p < 0,05$). Os dados representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes em triplicata.

A geração intracelular de H_2O_2 é um importante mediador de apoptose e sabe-se que diferentes enzimas como peroxidases, catalase, superóxido dismutase estão envolvidas na modulação de H_2O_2 .

Herrerias (2009) constatou que o tratamento de células de melanoma murino (B16-F10) com hispidulina ($50 \mu\text{M}$ por 24 h) estimulou a atividade de SOD total em aproximadamente 40% e inibiu em 25% a atividade da catalase. Os autores relacionaram esse aumento da atividade de SOD conjuntamente com a inibição da catalase a um aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio nas células B16-F10, levando ao aumento de processos oxidativos e geração de danos celulares.

Outras flavonas também foram estudadas em relação à atividade e expressão das enzimas antioxidantes. Herrerias (2009) observou que o tratamento de células de melanoma murino B16F10 com a flavona luteolina inibe a atividade da SOD em aproximadamente 40% e o tratamento com

eupafolina, apigenina e luteolina inibiram respectivamente 45, 40 e 35% a atividade da catalase (50 μM) após 24 horas de tratamento.

Também em nosso laboratório, Valdameri *et al* (2011), observaram que o tratamento de células de hepatoma humano (HepG2) com apigenina promove diminuição da expressão da enzima catalase em aproximadamente 40% (100 μM), sugerindo que o aumento dos níveis de H_2O_2 poderiam estar envolvidos na morte celular de células HepG2 induzida por apigenina.

7. DISCUSSÃO FINAL

O carcinoma hepatocelular (CHC) é a mais comum neoplasia maligna primária do fígado em todo o mundo (NOWAK; CHOW, 2004), apresentando altos índices de mortalidade, sendo que atualmente ainda não existem tratamentos eficazes para essa anomalia. Desta forma, os produtos naturais representam uma excelente fonte de substâncias que possuem uma grande variedade de atividades biológicas incluindo antitumorais (CRAGG *et al.*, 2000). Nesse contexto inserem-se os flavonóides que possuem importantes efeitos citotóxicos já relatados em diversas linhagens celulares (ATTOUB *et al.*, 2011; VALDEMERI *et al.*, 2011; HERRERIAS, 2009; CHIANG *et al.*, 2006; PAN *et al.*, 2005; YEE *et al.*, 2003).

Neste trabalho foram avaliados os efeitos da hispidulina sobre a viabilidade celular, o ciclo celular, os Níveis intracelulares de ERO, a viabilidade na presença de N-acetilcisteína (NAC), os níveis de glutathione e a expressão das enzimas antioxidantes

Com os experimentos de viabilidade celular, podemos verificar que a hispidulina diminui o número de células HepG2 viáveis de maneira dependente do tempo e da dose. Já foi visto na literatura que a hispidulina apresenta este mesmo efeito com outros tipos de células tumorais, como já foi visto em nosso laboratório, onde a hispidulina (100 μM) reduziu em 40% a viabilidade celular da linhagem de células HeLa e esta citotoxicidade pode, pelo menos em parte, ser explicada pelas alterações nos parâmetros respiratórios (BARBOSA *et al.*, 2005; HERRERIAS, 2005).

Além disso, LIN *et al.* (2010), observaram que o tratamento com a hispidulina (0-80 μM , 48 horas) promoveu uma inibição da viabilidade celular dependente da dose em duas linhagens de células de glioblastoma multiforme humano, além de bloquear a progressão do ciclo celular na fase G1 e induzir a apoptose (60 e 40 μM , por 12, 24 e 48 h).

Com outras flavonas também encontram-se os mesmos efeitos na literatura, por exemplo Attoub *et al.* (2011) verificaram que o tratamento com a flavona luteolina nas doses de 1-200 μM reduziu a viabilidade de linhagens celulares de câncer humano de pulmão (LNM35), cólon (HT29), fígado (HepG2) e mama (MCF7 / 6 e MDA-MB231-1833) de maneira

dose-dependente no tempo de 24 de tratamento. Especificamente, com a linhagem de câncer de fígado (HepG2) este trabalho mostrou que o tratamento com luteolina, nas doses de 50, 100 e 200 μM , promove uma redução de viabilidade em aproximadamente 45, 60 e 70% respectivamente. Em nossos estudos, essa redução com a hispidulina foi de aproximadamente 24, 45 e 53% respectivamente nas mesmas condições experimentais.

As diferenças obtidas nos resultados podem ser relacionadas à estrutura da luteolina (Figura 6) e da hispidulina (Figura 7), observando-se que a luteolina apresenta o anel catecol e não apresenta o grupamento 6-metoxil, sendo que já foi visto em trabalhos anteriores em nosso laboratório (HERRERIAS, 2009) que a eupafolina e a luteolina (Figura 6), que possuem hidroxilas nas posições 3' e 4' formando uma anel catecol na sua estrutura, foram os compostos testados com maior efeito citotóxico em modelo murino de melanoma, além de observar que o grupamento 6-metoxil presente nas estruturas da hispidulina e eupafolina reduz o efeito antiproliferativo quando comparados seus efeitos aos das flavonas apigenina e luteolina.

Mecanismos de indução de morte celular envolvendo o aumento de ERO já foram observados com a hispidulina em nosso laboratório, visto que ela pode afetar a atividade de enzimas mitocondriais em modelo de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, sendo assim, tornou-se importante avaliar se a redução da viabilidade celular verificada com a hispidulina estaria relacionada com o aumento de ERO. Nos resultados obtidos neste trabalho, foi observado um aumento tempo e dose dependente nos níveis dessas espécies após tratamento com a hispidulina, sendo que os resultados mais significativos foram nas doses de 50, 100 e 200 μM , podendo ser um indicativo de que a morte celular pode estar ocorrendo devido ao aumento nos níveis dessas espécies. Foi possível observar também um aumento na porcentagem de células na fase subG1 de maneira dose dependente, indicativo de aumento de número de células contendo DNA fragmentado. Também já foi verificado um aumento nos níveis de ERO promovido por outras flavonas como nos estudos de Shim *et al.* (2007) onde observaram que a acacetina, outra flavona metoxilada, é capaz de induzir a geração de ERO intracelular em linhagem de células de câncer de mama humano (MCF-7) e Gupta *et al.* (2001), que viram que a apigenina (nas doses de 1-80 μM) aumentou os níveis de ERO de maneira dependente da

dose após 3 horas de tratamento em células de câncer de próstata humano (22Rv1).

Sabe-se que a hispidulina possui efeitos inibitórios sobre o transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial e, portanto, pode colaborar para o aumento da geração de ERO (DABAGUI-BARBOSA *et al.*, 2005; HERRERIAS *et al.*, 2008). Para comprovar o envolvimento do aumento dos níveis intracelulares de ERO no mecanismo de indução de morte celular induzido pela hispidulina (50 e 100 μ M) foi realizada a mesma análise de viabilidade celular na presença e na ausência de NAC (co-tratamento por 24 h), sabendo-se que NAC é um potente antioxidante que pode inibir o estresse oxidativo diretamente pelo reabastecimento dos níveis de GSH intracelular (CHANG *et al.*, 2010). Observou-se que quando a NAC é adicionada concomitantemente com a hispidulina ao meio de cultura ocorre uma proteção contra a morte das células HepG2, visto que observou-se um aumento na viabilidade celular nessa condição de cultivo, demonstrando que a adição de NAC protege contra a morte celular induzida pela hispidulina. Pan *et al.* (2005) observaram esse mesmo efeito em linhagens de células de carcinoma gástrico humano AGS (CCRC 60102) utilizando-se da flavona acacetina. Após o tratamento por 1 h com NAC (2,5 e 5 mM) observaram uma proteção das células AGS dos efeitos do tratamento com a acacetina de maneira dependente da dose.

Como foi observado que a hispidulina provoca um acúmulo de ERO e uma diminuição na viabilidade celular, sendo este último efeito parcialmente revertido pela presença de NAC, investigou-se se a hispidulina é capaz de afetar os níveis de glutathiona total e a relação GSH/GSSG, já que a GSH é um importante antioxidante celular e a sua depleção resultaria na geração de ERO excessiva, que poderia levar as células danificadas à morte. Com os resultados obtidos, foi demonstrado que o tratamento das células HepG2 com a hispidulina promove diminuição dos níveis de glutathiona total e redução da relação GSH/GSSG, o que pode estar contribuindo para o aumento de ERO e, conseqüentemente, levando à morte das células.

Entretanto, os níveis de ERO também podem ser afetados pelas atividades de enzimas antioxidantes, por isso foi avaliada a expressão dessas enzimas e constatou-se que o tratamento das células HepG2 com a hispidulina promoveu uma diminuição nos níveis de expressão de mRNA da catalase, sugerindo que o aumento dos níveis de H_2O_2 poderiam estar envolvidos no

mecanismo de morte celular promovido pela hispidulina. Recentemente, tem-se observado que os níveis de expressão de mRNA de enzimas antioxidantes são regulados pelo complexo Nrf2-Keap1. Nrf2, uma proteína ubíqua, um membro da subfamília de fatores de transcrição, é sequestrado no citoplasma em virtude de sua ligação com o Keap1, sendo levado a ubiquitinação e degradação proteossomal. No entanto, quando ERO são gerados, o complexo Nrf2-Keap1 dissocia-se e Nrf2 transloca-se para o núcleo, onde ativa a transcrição de genes de enzimas de desintoxicação por ligar-se a AREs (elemento de resposta antioxidante). Recentemente, alguns flavonóides demonstraram favorecer a translocação do Nrf2 e, eventualmente, a ativação de AREs em algumas linhagens celulares, aumentando a expressão de algumas enzimas antioxidantes (ZHAO, *et al.*, 2010; HAYES, *et al.*, 2009; ZHANG, *et al.*, 2006; NGUYEN, *et al.*, 2000). Foi visto que o flavonol quercetina (5 - 40 μ M, 12 h) aumentou a atividade de AREs pela *upregulação* da expressão de Nrf2, impedindo a sua ubiquitinação e degradação proteossomal, e acelerando a degradação de Keap1 de maneira proteossoma-independente em células de carcinoma hepatocelular (HepG2). Estes resultados forneceram a primeira base molecular para as propriedades quimiopreventivas da quercetina (TANIGAWA *et al.*, 2007).

Sabe-se que Nrf2 protege as células normais contra a carcinogênese, porém, a sua ativação constitutiva em certos tumores aparentemente contribui para a sobrevivência e crescimento das células cancerosas. Nrf2 também é visto, então, como um alvo farmacológico para superar a resistência terapêutica de vários tipos de câncer (TANG, *et al.*, 2011; ITOH *et al.*, 2010; HAYES *et al.*, 2009, LAU *et al.*, 2008). Deste modo, luteolina (0-10 μ M) demonstrou-se um potente inibidor de Nrf2 (reduz os níveis de mRNA e proteína), e promoveu a depleção de glutathiona reduzida GSH (0-20 μ M) em células de câncer de pulmão A549, desse modo, a luteolina pode melhorar a capacidade de resposta das células cancerosas para medicamentos quimioterápicos e indica o potencial de aplicação de luteolina como um sensibilizador natural em quimioterapia (TANG, *et al.*, 2011). Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento com hispidulina promoveu uma diminuição nos níveis de expressão de mRNA da catalase, além de promover também a depleção da glutathiona reduzida, sugerindo que também pode estar havendo uma interferência no sistema Nrf2-KEAP1.

Conjuntamente, os resultados sugerem que a hispidulina tem um potencial para ser utilizada no tratamento do carcinoma hepatocelular. Apesar dos resultados promissores, são necessários mais estudos sobre o mecanismo molecular da ação dessa flavona em células de carcinoma hepatocelular, assim como em células de hepatócitos para avaliar o perfil citotóxico da hispidulina também em células normais.

8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com este trabalho nos permitem concluir que a hispidulina:

- É capaz de reduzir a viabilidade de células HepG2 de forma dependente do tempo e da dose, e que com o tratamento simultâneo com NAC esta redução é menor e dependente da concentração de NAC;
- Promove a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) também de maneira dependente da dose e do tempo;
- Aumenta o número de células na fase sub-G1 e diminui o número de células em G1 do ciclo celular, sendo um indicativo de morte celular;
- Diminui os níveis de glutathiona intracelular e a relação GSH/GSSG, possivelmente como consequência da indução de aumento da quantidade de ERO intracelular e estresse oxidativo;
- Diminui os níveis de expressão de mRNA da catalase, sugerindo que este efeito colabora para o aumento dos níveis de ERO em especial de H_2O_2 que poderiam estar envolvidos no mecanismo de morte celular promovido pela hispidulina.

As evidências experimentais sugerem que o mecanismo de morte celular promovido pela hispidulina está relacionado com o aumento de ERO e com a diminuição das defesas antioxidantes (diminuição do nível de expressão da enzima catalase, dos níveis de GSH e da relação GSH/GSSG).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 105, p. 121–126, 1984.

AGARWAL, M. L.; TAYLOR, W. R.; CHERNOV, M. V.; CHERNOVA, O. B.; STARK, G. R. The p53 network. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 1, 1998.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.

ANTELMANN, H.; HELMANN, J.D. Thiol-based redox switches and gene regulation, Antioxid. **Redox Signaling**, v.14, p. 1049–1063, 2011

ANVISA, portal.anvisa.gov.br, acesso em 03/02/2012.

ARON, P.M.; KENNEDY, J.A. Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, p. 79–104, 2008.

ARORA A.; NAIR M. G.; STRASBURG G. M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a serie of flavonoids in a lipossomal system. **Free Radicals in Biology & Medicine**, New York, v. 24, n. 9, p. 1355-1363, 1998.

ATTOUB S.; HASSAN A. H.; VANHOECKE B. *et al.* Inhibition of cell survival, invasion, tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin in human epithelioid cancer cells. **European Journal of Pharmacology**. Paris, v. 651(1-3), p. 18-25, 2011.

BARNETT, Y.A.; KING, C.M. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 338, n. 1/6, p. 115-128, 1995.

BATIST, G.; SCHECTER, R. L.; ALAOUI-JAMALI, M. A. The glutathione system and drug resistance. **Principles of antineoplastic drug development and pharmacology**. New York: Dekker; p. 503–521, 1996

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L. STRYER, L. **Bioquímica**, 5 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara-Koogan S.A., 2004.

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

BLAKE, D.; WINYARD, P. G.; Immunopharmacology of Free Radical Species. **Academic Press**, New York, p 301, 1995.

BOHLER, T., WAISER, J., HEPBURN, H., GAEDEKE, J., LEHMANN, C., HAMBACH, P., BUDDE, K.; AND NEUMAYER, H. H. TNF- α and IL-1 induce apoptosis in subconfluent rat mesangial cells. **Cytokine**, v. 12, n. 7, p. 986-991,

2000

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 186, p. 343-355, 1990.

BORS, W.; MICHEL, C.; STETTMAIER, K. Antioxidant effects of flavonoids. **BioFactors**, v. 6, p. 399–402, 1997.

BOSCH, F. X.; RIBES, J.; CLRIES, R.; DIAZ, M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. **Clinical Liver Disease**, v. 9, p. 19, 2005.

BOURDILLAT, B.; DELAUTIER, D.; LABAT, C.; BENVENISTE, J.; POTIER, P.; BRINK, C. Hispidulin, a natural flavone, inhibits human platelet aggregation by increasing cAMP levels. *European Journal of Pharmacology*, v. 147, p. 1-6, 1988 .

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDI, M. L. Flavonoids: Biochemical effects and therapeutic applications. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v.19, p. 3-14; 1992

BRAVO L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 11, p. 317–33, 1998.

BRONSTEIN, M. D and PINTO, E. M. Aspectos moleculares da tumorigênese hipofisária. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, vol.52, n.4, pp. 599-610, 2008

BRUNO, S.; SILINI, E.; CERO IGNANI, A. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. **Hepatology**. V. 25, p. 754–758, 1997.

BURDA, S.; OLESZEK W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 2774-2779, 2001

CAO, G.H.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure–activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 22, p. 749– 760, 1977.

CERUTTI, P.A. Prooxidant states and tumor promotion. **Science**, Washington, v. 227, p. 375–81, 1985.

CHA, C.H.; SAIF, M.W.; YAMANE, B.H.; WEBER, S.M. Hepatocellular carcinoma: current management, **Curr. Probl. Surg.**, v. 47, p. 10–67, 2010.

CHABNER, B.A.; ALLEGRA, C.J.; CURT, G.A.; CALABRESI, P. Antineoplastic agents. In: Molinoff P.B. and Ruddon R.W. eds. **The pharmacological basis of therapeutics**. (9 ed.). New York, p. 1233-1287, 1996.

CHANG, H.; LIN, H.; YI, L.; ZHU, J.; ZHOU, Y.; MI, M.; ZHANG, Q. 3,6-Dihydroxyflavone induces apoptosis in leukemia HL-60 cell via reactive oxygen species-mediated p38 MAPK/JNK pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 648, p. 31–38, 2010.

CHIANG, L.C.; NG, L.T.; LIN, I.C.; KUO, P.L.; LIN, C.C. Anti-proliferative effect of apigenin and its apoptotic induction in human Hep G2 cells. **Cancer Letters**, Oxford, v. 237, p. 207–214, 2006.

CHULASIRI, M.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; MOONGKANDI, P. Mutagenicity and antimutagenicity of hispidulin and hortensin, the flavonoids from *Millingtonia hortensis* L. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 20, p. 307-312, 1992.

CIRCU, M. L.; RODRIGUEZ, C.; MALONEY, R.; MOYER, M. P.; AW, T. Y. Contribution of mitochondrial GSH transport to matrix GSH status and colonic epithelial cell apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, p.768–778, 2008.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 7, p. 66–76, 1996.

COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J.P.; CIMANGA, K.; VAN POEL, B.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D. Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 71-76, 1998

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9, p. 2783, 2000.

DABAGUI-BARBOSA, P. D.; ROCHA, A.M.; LIMA, A.F.C.; OLIVEIRA, B.H.; OLIVEIRA, M.B.M.; CARNIERI, E.G.S.; CADENA, S.M.S.C.; ROCHA, M.E.M. Hispidulin: Antioxidant properties and effect on mitochondrial energy metabolism. **Free Radical Research**, Oxon, v. 39 (12), p. 1305-1315, 2005.

DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, New York, v. 55, n. 11, p. 396-407, 1997.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A; CAPASSO, F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**, v. 65, p. 337–353, 1999.

DINI, L. Apoptosis induction in DU-145 human prostate carcinoma cells. **Tissue Cell**, v. 37, p. 379–384; 2005

DOHERTY, G.O.P., HAYNES, N.B., WHALLEY, W.B. 5,7,4'-Trihidroxi-6-metoxiflavona, a minor pigment from *Digitalis lanata*, L. **Journal of the Chemical Society**, p. 5577–5578, 1963.

DOROSHOW, J.H. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. **Cancer Research**, Baltimore, v. 43, n. 2, p. 460-472, 1983.

DRÖDGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 82, p. 47-95, 2002

DU, Y. U.; GUO, H.; LOU, H. Grape Seed Polyphenols Protect Cardiac Cells from Apoptosis via Induction of Endogenous Antioxidant Enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1695–1701, 2007

ELBENDARY, A. A.; CIRISANO, F. D.; EVANS, A. C. JR.; DAVIS, P. L.; IGLEHART, J. D.; MARKS, J. R.; BERCHUCK, A. Relationship between p21 expression and mutation of the p53 tumor suppressor gene in normal and malignant ovarian epithelial cells. **Clinical Cancer Research**, v. 2(9), p.1571-5, 1996.

EL DEIRY, W. S.; TOKINO, T.; VELCULESCU, V. E.; LEVY, D. B.; PARSONS, R.; TRENT, J. M.; LIN, D.; MERCER, W. E.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. **Cell**, v. 75, p. 817, 1993.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperitin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**, Oxford, v. 24, p. 851-874, 2004.

ESTRABOOK, R. W. **Methods in Enzymology**, v. 10, p. 41-47, 1967.

FATTOVICH, G.; STROFFOLINI, T; ZAGNI, I. ; DONATO, F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. **Gastroenterology**, vol. 127, p. S35–S50, 2004.

FERRÁNDIZ, M. L.; BUSTOS, G.; PAYÁ, M.; GUNASEGARAN, R.; ALCARAZ, M. J. Hispidulin protection against hepatotoxicity induced by bromobenzene in mice. **Life Sciences**, v. 55, n. 8, p. 145.-150, 1994

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n.1, p.1-16, 1997.

FESTJENS, N., VANDEN BERGHE, T., VANDENABEELE, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochim Biophys Acta**. V. 1757, p.1371–1387, 2006.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 64, p. 97-112, 1995.

FUKAI, T.; MARUMO, A.; KAITOU, K.; KANDA, T.; TERADA, S.; NOMURA, T. Anti-helicobacter pylori flavonoids from licorice extract. **Life Sciences**, Oxford, v. 71, p. 1449–1463, 2002.

GALATI, G.; MORIDANI, M.Y.; CHAN, T. S.; O'BRIEN, P.J. Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione

oxidation and conjugation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, p. 370-382, 2001

GALLUZZI L, MAIURI MC, VITALE I, *et al.* Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ**; v. 14, p. 1237-43, 2007

GOLSTEIN P, KROEMER G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends Biochem Sci.** V. 32, p. 37-43, 2007

GRIFFITH, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine, **Analytical Biochemistry**. v. 106, p. 207–212, 1980

GUPTA, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 287, p. 914–920, 2001.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLINGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M .C.; **Free Radicals in Biology and Medicine**, Clarendon Press, Oxford, p 543, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2007.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, Oxford, v. 55, p. 481–504, 2000.

HARBORNE, J.B. Comparative Biochemistry of the Flavonoids. **Academic Press**; London and New York, 1967

HARTWELL LH, WEINERT T: Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, p. 629-634, 1989.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemistry Pharmacology**, Oxford, v. 32, p. 1141 – 1148, 1983.

HAYES, J. D.; MCMAHON, M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 34, p.176–188, 2009.

HAZEKAMP, A., VERPOORTE, R., PANTHONG, A. Isolation of a bronchodilator flavonoid from the Thai medicinal plant *Clerodendrum petasites*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 45–49, 2001.

HAYES, J. D.; MCMAHON, M. Nrf2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 34, p. 176–188; 2009.

HAYES, J. D.; MCMAHON, M. Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention. **Cancer Letters**, v. 174, p.103–113; 2001.

HE, L.; WU, Y; LIN, L. *et al.* Hispidulin, a small flavonoid molecule, suppresses the angiogenesis and growth of human pancreatic cancer by targeting vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Cancer Science**, v. 102, n. 1, p. 219–225, 2011.

HEIM K. E.; TAGLIAFERRO A. R.; BOBILYA D. J. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 13, p. 572-584, 2002.

HEPATOCENTRO, <http://www.hepcentro.com.br/hepatocarcinoma.htm>, acesso em 15 de agosto de 2010

HERNANDEZ-MIJARES, A.; ROCHA M.; APOSTOLOVA, N.; BORRAS, C.; JOVER, A.; BAÑULS, C.; SOLA, E.; VICTOR, V. M. Mitochondrial complex I impairment in leukocytes from type 2 diabetic patients. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50(10), p. 1215-21, 2011

HERRERIAS, T. **Estudo do mecanismo de ação da eupafolina sobre o metabolismo energético mitocondrial e viabilidade celular de células Hela** Curitiba, 2005. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

HERRERIAS, T. **Efeitos de flavonóides sobre o metabolismo mitocondrial e suas implicações na viabilidade e apoptose de células de melanoma.** Curitiba, 2009. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

HSU, YA-LIN; KUO, PO-LIN; LIU, CHI-FENG; LIN, CHUN-CHING. Acacetin induced cell cycle arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. **Cancer Letters**, Oxford, v. 212, p. 53-60, 2004.

INCA (Instituto Nacional do Cancer) - Ministério da Saúde. Estimativas da Incidência e Mortalidade por Cancer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em 28 de agosto de 2010.

ITOH, K.; MIMURA, J.; YAMAMOTO, M. Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, p. 1665–1678; 2010.

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9 e 10, 2006

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6. Ed., 2000.

KANDASWAMI, C.; LEE, L.T.; LEE, P.P., HWANG, J.J.; KE, F.C.; HUANG, Y.T.; LEE, M.T. The antitumor activities of flavonoids. **Journal In Vivo**, New York, v. 19, n. 5, p. 895-909, 2005.

KAJIMOTO, S.; TAKANASHI, N.; KAJIMOTO, T.; XU, M.; CAO, J.; MASUDA, Y.; AIUCHI, T.; NAKAJO, S.; IDA, Y.; NAKAYA, K. Sophoranone, extracted from a traditional Chinese medicine Shan Dou Gen, induces apoptosis in human leukemia U937 cells via formation of reactive oxygen species and opening of mitochondrial permeability transition pores. **International Journal of Cancer**, New York, v. 99, p. 879–890, 2002.

KACHADOURIAN, R.; DAY, B. J. Flavonoid-induced glutathione depletion: potential implications for cancer treatment. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 41, p. 65-76, 2006.

KENSLER, T.W.; WAKABAYASHI N.; BISWAL, S. Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, p. 89–11, 2007.

KERR, J. F., WYLLIE, A.H., CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239–257, 1972.

KHALID, O.; BOUNEVA, I. Management of hepatocellular carcinoma: treatment options and indications for orthotopic liver transplantation. **Missouri Medicine**, v. 108(4), p. 264-8, 2011.

KHAN, N.,; AFAQ, F.; SYED, D.N. Fisetin, a novel dietary flavonoid, causes apoptosis and cell cycle arrest in human prostate cancer LNCaP cells. **Carcinogenesis: Integrative Cancer Research**, Oxford, v. 29 , p. 1049–1056, 2008.

KILANI-JAZIRI, S.; FRACHE, V.; BHOURI, W.,; GHEDIRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA, L.; RONOT X. Flavones inhibit the proliferation of human tumor cancer cell lines by inducing apoptosis. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 35(1), p. 1-10, 2012

KININGHAM, K.K.; ST CLAIR, D.K. Overexpression of manganese superoxide dismutase selectively modulates the activity of Jun-associated transcription factors in fibrosarcoma cells. **Cancer Research**, Philadelphia, v.57, p. 5265–5271, 1997.

KNOWLES, D.M. II; CASARELLA, W.I.; JOHNSON, P.M. *et al*: The clinical, radiologic. and pathologic characterization of benign hepatic neoplasms: Alleged association with oral contraceptives. **Medicine**, Baltimore, v. 57, p. 223-257, 1978.

KO, L. J.; PRIVES, C. p53: puzzle and paradigm. **Genes & Development**, v. 10, p.1054, 1996.

KOHRLE, J., AUL'MKOLK, M., SPANKA, M., IRMSCHER, K., CODY, V.; HESCH, R.D. Iodothyronine deiodinase is inhibited by plant flavonoids. **Plant flavonoids in biology and medicine**. New York: Liss, 1986;359-372.

KROEMER G, GALLUZZI L, VANDENABEELE P, *et al*. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ** 2009;16:3-11.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical Biochemistry*, Bethesda, v. 182, p. 16-19, 1989.
KUO, S. M.. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. **Cancer Letter**, Oxford, v. 110, p. 41–48, 1996.

KWEON, M. H.; ADHAMI, V. M.; LEE, J. S.; MUKHTAR, H. Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 33761–33772; 2006.

LABEL, C. P.; ISCHIOPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 5, p. 227-231, 1992.

LAFLEUR, M.V.; HOORWEG, KEHRER, J.P.; Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Criticals Reviews in Toxicology**. New York, v. 23(1),p.21-48,1993.

LAU, A.; VILLENEUVE, N.F.; SUN, Z.; WONG, P.K.; ZHANG, D. D. Dual roles of Nrf2 in cancer. **Pharmacological Research**, v. 58(5-6), p. 262-70, 2008

LE MARCHAND, L. Cancer preventive effects of flavonoids-A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Paris, v. 56, p. 296–301, 2002.

LEE, K. H.; ANUFORO, D. C.; HUANG, E. S.; PIANTADOSI, C. Antitumor agents. I. Augustibalin, a new cytotoxic sesquiterpene lactone from *Balduina angustifolia* (Pursh.) Robins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61(4), p. 626-8, 1972.

LEONARDUZZI, G.; SOTTERO, B.; POLI, G. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 128, 3p. 36–374, 2010.

LEUNG, H.W.C.; KUO, C.L.; YANG, W.H.; LIN, C.H.; LEE, H.Z. Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v.534, p. 12-18, 2006.

LIMA, C.F.; FERNANDES-FERREIRA, M.; PEREIRA-WILSON, C. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. **Life Sciences**, v. 79, p. 2056-2068, 2006.

LIN, Y. C.; HUNG, C. M.; TSAI, J. C.; LEE, J. C.; CHEN, S. Y. L.; WEI, C. W.; KAO, J. Y.; WAY, T. D. Hispidulin Potently Inhibits Human Glioblastoma Multiforme Cells through Activation of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK). **J. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9511–9517, 2010

LUI, H. F. Screening for Hepatocellular Carcinoma. **International Journal of Hepatology**, v. 2011, p. 363151, 2011.

MA, J.; LI, Q.; ZHAO, J.; GUO, Y.; SU, Q.; JI, Z. Effects of apigenin on cell proliferation of human pancreatic carcinoma cell line BxPC-3 in vitro. **Journal of Nanjing Medical University**, v. 21, p. 94-98, 2007

MAJNO G, JORIS I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. **American Journal of Pathology**, v. 146, p. 3-15, 1995.

MARTÍN, M.; SERRANO, A.B.G.; RAMOS, S.; PULIDO, M.I.; BRAVO, L.; GOYA, L. Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 21, n. 3, p. 196-205, 2010

MARTINEZ-FLORES, S., GONZALEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUNON M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **NUTRICION HOSPITALARIA**, v.17, p. 271-8, 2002.

MATES, J.M.; SANCHEZ-JIMENEZ, F.M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int. J. Biochemistry and Cell Biology*, New York, v. 32, p. 157–170, 2000

MCDONALD, E. R. III, EL DEIRY, W. S. Cell cycle control as a basis for cancer drug development. **International Journal of Oncology**, v. 16, p. 871, 2000.

MCGLYNN, K. A.; LONDON, W.T. The global epidemiology of hepatocellular carcinoma: present and future. **Clinics In Liver Disease**, v.15(2), p. 223-43, 2011.

MCLEAN, L; SOTO, U; AGAMA, K; FRANCIS, J; JIMENEZ, R; POMMIER, Y; SOWERS, L; BRANTLEY, L. Aminoflavone induces oxidative DNA damage and reactive oxidative species-mediated apoptosis in breast cancer cells. **International Journal of Cancer**, v.122, p. 1665–1674, 2008.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and Cancer. **Pharmacological Reviews**, Washington, v.52, p. 673–751, 2000

MIODINI, P.; FIORAVANTIO, L.; DI FRONZO, G.; CAPPELLETTI, V. The two phyto-oestrogens genistein and quercetin exert different effects on oestrogen receptor function. **British Journal of Cancer**, UK, v. 80, p. 1150–5, 1999.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-60, 1983

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 24(1), p.105-111, 2001.

MORA, A.; PAYA, M; RIOS, J. L.; ALCAZAR, M.J. Structure-activity relationship of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non enzymic lipid peroxydation. **Biochemistry Pharmacology**, Oxford, v. 40, p. 793-797, 1990.

MORGAN, D. O. Principles of cdk regulation. **Nature**, v. 374, p. 131, 1995.

MURRAY, A. W. Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. **Nature**, v. 359, p. 599 – 604, 1992

NAKANOMA, T.; UENO, M.; IIDA, M.; HIRATA, R.; DEGUCHI, N. Effects of quercetin on the heat-induced cytotoxicity of prostate cancer cells. **International Journal of Urology**; v. 8, p. 623–630, 2001.

NAKASUGI, T.; KOMAI, K. Antimutagens in the Brazilian Folk Medicinal Plant Carqueja (*Baccharis trimera* Less.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 2560-2564, 1998.

NGUYEN, T.; HUANG, H. C.; PICKETT, C. B. Transcriptional regulation of the antioxidant response element: activation by Nrf2 and repression by MafK. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p.15466–15473; 2000

NICOTERA P, BERNASSOLA F, MELINO G. Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul. **Cell Death & Differentiation**, v. 6, p. 931–933, 1999.

NICOTERA P, MELINO G. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. **Oncogene**, v. 23, p. 2757–2765, 2004.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 31, n.11, p. 1287-1312, 2001.

NOVIELLO, E.; ALUIGI, M.G.; CIMOLI, G.; ROVINI, E.; MAZZONI, A.; PARODI, S.; SESSA, F.; RUSSO, P. Sister-chromatid exchanges, chromosomal aberrations and cytotoxicity produced by topoisomerase II-targeted drugs in sensitive (A2780) and resistant (A2780-DX3) human ovarian cancer cells: correlations with the formation of DNA double-strand breaks. **Mutation Research**, v. 311, p. 21-29, 1994.

NOWAK, A.K., CHOW, P.K.; FINDLAY, M. Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: a review. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 40, n.10, p. 1474–1484, 2004.

PAN, M.H., LAI, C.S., HSU, P.C.; WANG, Y.J. Acacetin induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by activation of caspase cascades and production of reactive oxygen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 620–630, 2005.

PARK, M. T.; LEE, S. J. Cell Cycle and Cancer. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 1, p. 60-65, 2003.

PELED-KAMAR, M.; LOTEM, J.; OKON, E.; SACHS, L.; GRONER, Y. Thymic abnormalities and enhanced apoptosis of thymocytes and bone marrow cells in transgenic mice overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase: implications for Down syndrome. **EMBO Journal**, v. 14 (20), p. 4985-4993, 1995.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v.63(7), p. 1035-42, 2000.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, **Nucleic Acids Res.** V. 29, p.45, 2001.

PLAUMANN B, FRITSCH M, RIMPLER H, BRANDNER G, HESS RD. Flavonoids activate wild-type p53. **Oncogene**, London, v. 13, p. 1605–14, 1996.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, Bern, v. 67, n. 5, p. 289-297, 1997.

OSBURN, W.O.; KENSLER, T.W. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults, **Mutation Research**, v. 659 p. 31–39, 2008.

OZEKI T, NATORI T. The specific inhibition of HepG2 cells proliferation by apoptosis induced by gabexate mesilate. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, Madson, v. 15;3(7), p. 710-7, 2010.

QANUNGO, S., DAS, M., HALDAR, S., BASU, A. Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells. **Carcinogenesis: Integrative Cancer Research**, Oxford, v. 26, p. 958–967, 2005.

REILLY, M. L. Comparison of the *In Vitro* Cytotoxicity of Hydroxylamine Metabolites of Sulfamethoxazole and Dapsone. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 6, p. 803-10, 1998.

REN, W.Y., QIAO, Z.H., WANG, H.W., ZHU, L.; ZHANG, L. Flavonoids: promising anticancer agents. **Medicinal Research Reviews**, v. 23, n. 4, p.519–534, 2003.

REN, H. Y.; TANG, X. W. Anti-proliferation and chemo-sensitization effects of apigenin on human lung cancer cells. **Journal of Zhejiang University**, v. 40(5), p. 508-14, 2011.

RICHARD S. HOTCHKISS, M.D. ANDREAS STRASSER, PH.D., JONATHAN E. MCDUNN, PH.D., PAUL E. SWANSON, M.D. Cell Death, a review article. **The New England Journal of Medicine**, England, v. 361, p. 1570-1583, 2003.

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S.K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method, **Nature Protocols**, v.1, p. 3159–3165, 2007

ROYAIE, S.; SCHWARTZ, J. D.; SUNG, M. W.; EMRE, S. H.; MILLER, C. M.; GONDOLESI, G. E.; KRIEGER N. R.; SCHWARTZ, M.E. Recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplant.patterns and prognosis. **Liver Transplant**, v. 10, p.534-540, 2004

RUSAK, GORDANA; GUTZEIT, HERWIG O.; MULLER, JUTTA LUDWIG. Structurally related flavonoids with antioxidative properties differentially affect cell cycle progression and apoptosis of human acute leukemia cells. **Nutrition Research**. V. 25, p.141-153, 2005.

RUSTGI, V. K. Epidemiology of hepatocellular carcinoma, in Di Bisceglie AM: **Hepatocellular carcinoma**. *Annals of Internal Medicine*, v. 108, p. 390-401,1988.

SANZ, M. J.; FERRANDIZ, M. L.; CEJUDO, M.; TERCENIO, M. C.; BUSTOS, G.; GIL, B.; UBEDA, A.; GUNASEGARAN, R.; ALCARAZ, M. J. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. **Xenobiotica**. V. 24, n. 7, pp. 689-699, 1994.

SCHIAFFONATI, L.; TIBERIO, L. Gene expression in liver after toxic injury: analysis of heat shock response and oxidative stress-inducible genes. **Liver**, v. 17, p. 183-191, 1997.

SCHNELLDORFER, T.; GANSAUGE, S.; GANSAUGE, F.; SCHLOSSER, S.; BEGER, H. G.; NUSSLER, A. K. Glutathione depletion causes cell growth inhibition and enhanced apoptosis in pancreatic cancer cells. **Cancer**, 89:1440–1447; 2000

SESA/PR (Secretaria de Saúde do Estado do Paraná). Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/>>, acesso em 03/02/2012

SHEN, H. M.; SHI, C. Y.; ONG, C. N. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 21, p.139-146, 1996.

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

SHUKLA, S.; GUPTA, S. Apigenin-induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53 activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, p. 1833-1845, 2008.

SHULL, S.; HEINTZ, N.H.; PERIASAMY, M.; MANOHAR, M.; *et al.* Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 266, p. 24398-24403, 1991.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie International Edition**, Ed. Engl., v. 25, p. 1058-1071, 1986.

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

SINGH, R.P.; AGRAWAL, P.; YIM, D.; AGARWAL, C.; AGARWAL, R. Acacetin inhibits cell growth and cell cycle progression, and induces apoptosis in human prostate cancer cells: structure--activity relationship with linarin and linarin acetate **Carcinogenesis: Integrative Cancer Research**, Oxford, v. 26 n.4 p. 845-854, 2005.

SO, F. V; GUTHRIE, N.; CHAMBERS, A. F.; MOUSSA, M.; CARROLL, K. K. Inhibition human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. **Nutrition and Cancer**, v. 26, p. 167–81, 1996.

SOICKE, H.; LENG-PESCHLOW, E. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Medica**, v. 53, p. 37-39, 1987.

SUZUKAWA, K.; MIURA, K.; MITSUSHITA, J.; RESAU, J.; HIERO E, K.; CRYSTAL, R.; KAMATA, T. Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, p. 13175- 13178, 2000.

TAGUCHI, K.; MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. **Genes to Cells**, v.16, p. 123–140, 2011.

TANAKA, M.; KATAYAMA, F.; KATO, H.; TANAKA, H.; WANG, J.; QIAO, Y.L.; INOUE, M. J. Hepatitis B and C virus infection and hepatocellular carcinoma in china: a review of epidemiology and control measures. **Journal of Epidemiology**, 2011 Nov 5;21(6):401-16.

TANAKA, Y.; HANADA, K.; MIZOKAMI, M. Inaugural article: a comparison of the molecular clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts that hepatocellular carcinoma incidence in the United States will increase over the next two decades. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 15584–15589, 2002.

TANG, X; WANG, H.; FAN, L.; WU, X.; XIN, A.; REN, H.; WANG, X. J. Luteolin Inhibits NRF2 Leading to Negative Regulation of the NRF2/ARE Pathway and Sensitization of Human Lung Carcinoma A549 Cells to Therapeutic Drugs. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, p. 1599–1609, 2011.

TANIGAWA, S.; FUJII, M.; HOU, D.X. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin, **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, p. 1690–1703, 2007.

TAYLOR, W. R.; STARK, G. R. Regulation of the G2/M transition by p53. **Oncogene**, v. 20(15), p. 1803-15, 2001.

THOMPSON, N.W.; AMERIKS, IA.; FREY, C.F. *et al*: Hepatic cell adenomas, spontaneous liver rupture, and oral contraceptives. **Archives of Surgery**, v. 110, p. 548-557, 1975

VALDAMERI, G.; TROMBETTA-LIMA, M.; WORFEL, P. R.; PIRES, A. R. A.; MARTINEZ, G. R.; NOLETO, G. R.; CADENA, S. M. S. C.; SOGAYAR, M. C.; WINNISCHOFER, S. M. B.; ROCHA, M. E. M. Involvement of catalase in the apoptotic mechanism induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells. **Chemico-Biological Interactions**, v.193, p. 180–189, 2011.

VALENTAO, P.; ANDRADE, P. B.; AREIAS, F.; FERRERES, F.; SEABRA, R. M. Analysis of vervain flavonoids by HPLC/diode array detector method. Its application to quality control. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4579-4582 , 1999

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160(1), p. 1-40, 2006

VALKO M.; IZAKOVIC M.; MAZUR M.; RHODES, C.J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 266, p. 37–56, 2004.

VAN ACKER S.A.; VAN DEN BERG D.J.; TROMP M.N., *et al.* Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v.3, p. 1-12, 2002.

VERMEULEN, K.; BOCKSTAELE, D. R. V.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, p.131–149, 2003

VINDELOV, L.L., CHRISTENSEN, I.J. AND NISSEN, N.I. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. **Cytometry**, v. 3, p. 323-327, 1993

VOSS, O. D.; Campelo, A. P.; Bacila, M. The respiration chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 4, p. 48-51, 1961.

WANG, H. K. The therapeutic potential of flavonoids. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, New York, v. 9, p. 2103–2119, 2000.

WANG, W.; HEIDEMAN, L.; CHUNG, C.S.; PELLING, J.C.; KOEHLER, K.J.; BIRT, D.F. Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines, **Molecular Carcinogenesis**, v.28, p. 102–110, 2000.

WEIJL, N.I., CLETON, F.J., OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, London, v. 23, n. 4, p. 209-240, 1997.

WESTMIJZE, J. J.; RETEL, E. J. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. **Free Radical Research**, v. 21, p. 9-17, 1994.

WISEMAN, S.; NULDER, T.; RIETVELD, A. Tea flavonoids: bioavailability in vivo and effects on cell signaling pathways in vitro. **Antioxidants Redox Signaling**, New York, v. 3, p. 1009–21, 2001

WORFEL, P. R. **Análise da viabilidade e níveis de glutatona de células de melanoma murino tratadas com flavonóides e oxigênio singlete**. Curitiba, 2009. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

WYLLIE, A. H. “Where, o death, is thy sting?” a brief review of apoptosis biology, **Molecular Neurobiology**, v. 42, p. 4–9, 2010

YANG, J. M.; HUNG, C. M.; FU, C. N.; LEE, J. C.; HUANG, C. H.; YANG, M. H.; LIN, C. L.; KAO, J. Y.; WAY, T. D. Hispidulin Sensitizes Human Ovarian Cancer Cells to TRAIL-Induced Apoptosis by AMPK Activation Leading to Mcl-1 Block in Translation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 10020–10026, 2010

YANG, H. I.; LU, S.N.; LIAW, Y. F. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 347(3), p. 168–174, 2002

YAO, Y.; DAI, W. Mitotic checkpoint control and chromatin remodeling. **Frontiers in Bioscience**, v. 17, p. 976-983, 2012

YEE, S.B.; LEE, J.H.; CHUNG, H.Y.; IM, K.S.; BAE, S.J.; CHOI, J.S. *et al.* Inhibitory effects of luteolin isolated from *Ixeris sonchifolia* Hance on the proliferation of HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. **Archives of Pharmacal Research**, Korea, v. 26, p. 151–156, 2003.

YIN, F.; GIULIANO, A.E.; LAW, R.E.; VAN HERLE, A.J. Apigenin inhibits growth and induces G2/M arrest by modulating cyclinCDK regulators and ERK MAP kinase activation in breast carcinoma cells, **Anticancer Research**, v. 21, p. 413–420, 2001.

YIN, Y.; SOLOMON, G.; DENG, C.; BARRETT, J. C. Differential Regulation of p21 by p53 and Rb in Cellular Response to Oxidative Stress. **Molecular Carcinogenesis**, v. 24, p.15–24, 1999.

YU, B. P.; Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 74, p. 139-162, 1994.

YUTING C.; RONGLIANG Z.; ZHONG JIAN J. & YONG J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 9, p. 19-21, 1990.

ZAFARULLAHA, M.; LIA, W. Q.; SYLVESTERA, J.; AHMAD, M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 6–20, 2003

ZHANG, D. D. Mechanistic studies of the Nrf2–Keap1 signaling pathway. **Drug Metabolism Reviews**, v. 38, p. 769–789; 2006.

ZHAO, C. R.; GAO, Z. H.; QU, X. J. Nrf2–ARE signaling pathway and natural products for cancer chemoprevention, **Cancer Epidemiology**, v. 34, p. 523–533, 2010.

ZONG, W. X., THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. **Genes and Development**, v. 20, p. 1-15, 2006.

