



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO**

PAOLA GIMENEZ MATEUS

**RELEVÂNCIA DA AÇÃO PRÓ-OXIDANTE DA QUERCETINA NO SEU
MECANISMO DE AÇÃO COMO FÁRMACO PROMISSOR NO TRATAMENTO DE
CÂNCER**

BAURU

2017

PAOLA GIMENEZ MATEUS

**RELEVÂNCIA DA AÇÃO PRÓ-OXIDANTE DA QUERCETINA NO SEU
MECANISMO DE AÇÃO COMO FÁRMACO PROMISSOR NO TRATAMENTO DE
CÂNCER**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Licenciatura em
Química da Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho, como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

BAURU

2017

Mateus, Paola Gimenez

Relevância da ação pró-oxidante da quercetina no seu mecanismo de ação como fármaco promissor no tratamento de câncer. / Paola Gimenez Mateus, 2017. p. 82.

Orientador: Profº. Dr. Valdecir Farias Ximenes.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual Paulista, Licenciatura em Química. Faculdade de Ciências, Bauru, 2017.

1. Antitumorais naturais 2. Antioxidantes 3. Pró-oxidante 4. Flavonóides 5. Apoptose.

PAOLA GIMENEZ MATEUS

**RELEVÂNCIA DA AÇÃO PRÓ-OXIDANTE DA QUERCETINA NO SEU
MECANISMO DE AÇÃO COMO FÁRMACO PROMISSOR NO TRATAMENTO DE
CÂNCER**

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

Prof. Dr. Alexandre de Oliveira Legendre

Prof. Dr. Aroldo Geraldo Magdalena

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Silvia e Antônio, minha família, ao Felipe e acima de tudo a Deus, que sempre me abençoou e me sustentou em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre ter me abençoado, me dado força e fé para alcançar mais essa vitória.

Agradeço aos meus pais, Antônio e Silvia, e familiares pelo carinho, pela educação, pelo incentivo e pelo apoio de sempre.

Agradeço ao Felipe por ter sido compreensivo, atencioso e ter me apoiado em todos os momentos de dificuldades.

Agradeço a Andreia e ao Paulo pela ajuda e apoio durante todos esses anos.

Agradeço ao meu orientador Valdecir Farias Ximenes pela paciência, atenção e dedicação e confiança depositada em mim para realização desse trabalho.

Agradeço a minha banca examinadora pela oportunidade de poder apresentar esse trabalho que fiz para concluir essa etapa muito importante da minha vida.

Agradeço ao Alexandre O. Legendre por todo apoio que me deu durante a graduação.

Agradeço a UNESP - Bauru pela oportunidade realizar esse curso.

Agradeço a todos meus professores do curso da graduação, ensino médio e fundamental pois foram muito importantes na minha formação.

“Toda glória, toda vitória eu sei, pertence a Ti. Toda honra, todo o louvor entrego a Ti, porque sem Ti eu não estaria aqui.” (Eis-me aqui – Diante do Trono).

RESUMO

Esse trabalho consiste em um levantamento bibliográfico que revela a importância e a necessidade da utilização de novos fármacos, com foco naqueles de origem natural, para o tratamento do câncer, visto que essa doença ainda é um problema sério de saúde pública com milhões de mortes por ano no mundo. Soma-se a isso o fato de que apesar de enormes avanços, os fármacos disponíveis ainda se demonstram não efetivos em muitos casos e não seletivos, resultando em danos às células saudáveis e consequentemente aos pacientes. Em específico, este trabalho destaca a utilização da quercetina, um composto de origem natural, como um potencial agente antitumoral. Temos por objetivo demonstrar, através de um levantamento bibliográfico, que a quercetina é uma droga promissora no tratamento do câncer e que a sua característica pró-oxidante contribui significativamente para o seu mecanismo de ação antitumoral. Os dados apresentados aqui revelam que esse flavonóide foi capaz de inibir a proliferação de várias linhagens celulares de diferentes tumores e induzir essas células à apoptose e que suas características pró-oxidantes estão envolvidas neste processo, que ocorre através da via mitocondrial com a ativação da via das caspases e regulação das proteínas da família Bcl-2.

Palavras chave: *Antitumorais naturais, antioxidantes, pró-oxidante, flavonóides, apoptose.*

ABSTRACT

This work consists of a literature that reveals the importance of the need for new drugs, focusing on those of natural origin for the treatment of cancer, since the disease is still a public health problem, with millions of deaths in the world. Addends to this is a fact that despite huge advances, the available drugs still show not effective in many cases and not selective, resulting in damage to healthy cells and thus to patients. Specifically, this work highlights the use of quercetin, a compound of natural origin, as a potential antitumor agent. We have objective to demonstrate, through a bibliographic survey that quercetin is a promising drug is the treatment of cancer and its pro-oxidant characteristic contributes significantly to its antitumor mechanism of action. The data presented here show that this flavonoid was able to inhibit the proliferation of several cell lines of different tumor and induce these cells to apoptosis and that its pro-oxidant characteristics are involved in this process, which occurs through the mitochondrial pathway with the pathway activation caspases and regulation of Bcl-2 family proteins.

Keywords: *Antitumor Natural antioxidants, pro-oxidant, flavonoids, apoptosis.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação entre o número de publicações e o ano de pesquisas envolvendo flavonóides e câncer	19
Figura 2. Configuração eletrônica e orbitais atômicos e moleculares do átomo de O e da molécula de O ₂ segundo a TOM.....	22
Figura 3. Distribuição eletrônica do O ₂ no estado fundamental e de suas formas excitadas mais (A) e menos estável (B).	23
Figura 4. Redução univalente da molécula de O ₂ com consumo de 4 elétrons formando EROs.....	24
Figura 5. Geração do radical hidroxila através da reação de Fenton e Haber Weiss.	25
Figura 6. Produção de peróxido de hidrogênio através da dismutação do radical ânion superóxido.....	25
Figura 7. Redução do peróxido de hidrogênio pelo GSH catalisada pela GPx	28
Figura 8. Decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio catalisada pela enzima catalase.....	29
Figura 9. Estrutura básica dos flavonoides contendo dois grupos fenil unidos por um grupo pirano.	31
Figura 10. Representantes de grande destaque dos principais grupos dos flavonoides.	32
Figura 11. Arranjos estruturais responsáveis pela potencialização da atividade antioxidante dos flavonoides.	33
Figura 12. Estabilização de ROS através da doação de um próton do anel B dos flavonoides.	34

Figura 13. Estabilização dos radicais flavonoides via deslocalização eletrônica (1) e formação de quinona (2).	35
Figura 14. Fórmula estrutural da quercetina.....	36
Figura 15. Características morfológicas do processo apoptótico (B e C)	38
Figura 16. Mecanismo de indução a apoptose dependente da via das caspases....	43
Figura 17. Mecanismo de sinalização a apoptose mediada por EROs.	46
Figura 18. Geração de EROs a partir de polifenóis.	53
Figura 19. Destaque das configurações estruturais responsáveis pela atividade pró-oxidante dos flavonóides.	56
Figura 20. Papel pró-oxidante da quercetina na indução a apoptose em células tumorais.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características comuns dentre os cânceres que apresentam risco à vida do paciente.....	17
Tabela 2. Principais espécies reativas de oxigênio e sítios de formação.	20
Tabela 3. Sistemas de defesas contra espécies reativas e suas ações.	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 CÂNCER	16
3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	20
3.1 REATIVIDADE DO OXIGÊNIO MOLECULAR E GERAÇÃO DE EROs	21
3.2 GERAÇÃO DO RADICAL ÂNION SUPERÓXIDO, PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E RADICAL HIDROXILA ATRAVÉS DA MITOCÔNDRIA	23
3.3 REATIVIDADE E EFEITOS DELETÉRIOS DAS EROs	25
3.4 MECANISMO DE DEFESA CONTRA EROs	26
3.4.1 DEFESA ENZIMÁTICA	27
4. FLAVONÓIDES	30
4.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS FLAVONÓIDES	33
4.2 QUERCETINA	35
5 APOPTOSE	37
5.1 APOPTOSE E A PROTEÍNA p53	39
5.2 INDUÇÃO A APOPTOSE PELA VIA MITOCONDRIAL	40
5.2.1 PROTEÍNAS DA FAMÍLIAS Bcl-2 E CASPASES	41
5.2.2 SINALIZAÇÃO E INDUÇÃO DO PROGRAMA APOPTÓTICO PELA VIA MITOCONDRIAL	42
5.3 APOPTOSE E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	45
6 INDUÇÃO DA APOPTOSE COMO MECANISMO CITOTÓXICO PARA CÉLULAS TUMORAIS	48
6.1 ATIVIDADE PRÓ-OXIDANTE DA QUERCETINA	52
7 QUERCETINA COMO UM FÁRMACO PROMISSOR NO TRATAMENTO DE TUMORES	59
7.1 AÇÃO DA QUERCETINA SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS LEUCÊMICAS	60
7.2 AÇÃO DA QUERCETINA SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA	63

7.3 AÇÃO DA QUERCETINA SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS DE CÂNCER DO COLO DO ÚTERO HUMANO E CÂNCER DE MAMA	66
7.4 AÇÃO DA QUERCETINA SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS DE CARCINOMA GÁSTRICO E CÂNCER DE TIROIDE.....	68
CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

O câncer, como será discutido nesse trabalho, pode ser definido como uma série de doenças que compartilham entre si a resistência das células em sofrer a apoptose (CAMPBELL, FARREL, 2011). Trata-se de um problema de saúde pública visto que, por ano, aproximadamente 8 milhões de pessoas morrem por conta dessa doença, podendo chegar em até 17 milhões de mortes por ano em 2030, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), caso medidas de prevenção e combate ao câncer não sejam tomadas.

A resistência em sofrer apoptose é considerada a característica mais marcante dos tumores conhecidos como malignos e sendo assim é um dos grandes desafios do combate a essa enfermidade. Logo, o tratamento do câncer se direciona no sentido de tentar reverter a progressão celular descontrolada por meio de estratégias quimioterápicas e radioterápicas, que de alguma maneira sejam capazes de induzir essas células tumorais à morte apoptótica (ALBERTS et al., 2006; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008).

Porém, um dos grandes problemas enfrentados hoje no tratamento tumoral é a utilização de fármacos ainda não eficientes, ou seja, insensíveis a uma série de linhagens de tumores. Além disso, eles são não seletivos a essas células mutadas. Como consequência dessas características, esses fármacos acabam gerando danos oxidativos nas células saudáveis comprometendo a vida dos pacientes portadores dessa doença (LÓPEZ-LÁZARO, 2002; UEDA et al., 2002).

Diante desses fatos fica clara a necessidade de buscar novas estratégias e novos fármacos de preferência de origem natural, visto que os danos secundários podem ser significativamente minimizados ou evitados, que possam atuar de maneira mais seletiva e eficaz contra as células tumorais, induzindo as mesmas a apoptose.

Uma técnica que vem demonstrando-se bastante eficaz e seletiva contra várias linhagens celulares cancerígenas, em diversas pesquisas, é a Terapia de Oxidação. Essa técnica consiste na utilização de substâncias que apresentam atividade pró-oxidante que são capazes de gerar um estresse oxidativo intracelular nas células tumorais, resultando em danos a biomoléculas que procedem na apoptose. A

seletividade entre células tumorais e células saudáveis podem ser alcançada com essa técnica e será discutido como isso ocorre no decorrer desse trabalho.

A busca por substâncias pró-oxidantes de origem natural pode diminuir e/ou evitar danos secundários ao organismo promovendo uma considerável melhoria na qualidade de vida dos pacientes com câncer. Uma classe de substâncias de origem natural que mais vem chamando a atenção de pesquisadores devido suas propriedades biológicas são os flavonóides. Destes, a quercetina, considerada o principal flavonóide presente na dieta humana, ganha destaque por sua atividade citotóxica frente a várias linhagens de células tumorais (GRANADO-SERRANO et al., 2006; BORSKA et al., 2012; ZHAO et al., 2013; LEÓN-GONZÁLEZ, AUGER, SCHINKER, 2015; ALTUNDAG et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2016).

Muitos testes, *in vitro* e *in vivo*, já demonstraram que a quercetina possui atividade pró-oxidante frente aos sistemas biológicos em determinadas condições. Uma vez que tal atividade pode resultar em danos a biomoléculas, como o DNA, e que tais danos, através de uma série de eventos e sinais bioquímicos, podem culminar na morte celular programada, a hipótese desse trabalho é de que tal propriedade pró-oxidante estaria relacionada com seu mecanismo de ação antitumoral (MATSUI et al., 2005; GRANADO-SERRADO et al., 2006; ZHAO et al., 2013; LEÓN-GONZÁLEZ, AUGER, ROHITKUMAR et al., 2015; SRIVASTAVA et al., 2016).

Sendo assim, esse trabalho tem por objetivo compilar evidências bibliográficas que demonstrem a quercetina como um composto fitoquímico promissor no tratamento do câncer e que ela tem em suas características pró-oxidantes uma contribuição importante para o seu mecanismo de ação.

2 CÂNCER

Câncer, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), é o nome designado a um conjunto de mais de cem doenças que compartilham entre si o crescimento desordenado de células que podem invadir tecidos e órgãos, espalhando-se para diversas regiões do corpo. Uma definição alternativa seria classificá-lo como uma doença causada pela aquisição sequencial de mutações em genes. Esses genes estão relacionados com o controle da proliferação e morte celular e uma vez modificados, resultam na característica principal do câncer, que é o crescimento e a divisão celular descontrolada (CAMPBELL, FARREL, 2011).

A causa do câncer, segundo alguns autores, pode estar relacionada com a combinação de agressões as células tornando-as malignas. Fatores hereditários e ambientais, que incluem o estilo de vida sedentário, hábitos alimentares ricos em gordura animal, tabagismo, qualidade precária de ar e água, são responsáveis pelo aumento do número total de desenvolvimento de tumores. Acredita-se que a incidência da maioria dos tumores comuns, como o câncer de pulmão, intestino, estômago e glândula mamária, são causados por fatores ou agentes externos ao corpo, que de alguma maneira, entram no organismo e atacam e comprometem os tecidos (WEINBERG, 2008; CAMPBELL, FARREL, 2011).

De acordo com o grau de agressividade do crescimento, os tumores são classificados em benignos ou malignos. Os tumores benignos são mais inofensivos ao hospedeiro, pois são aqueles que crescem localizados e não invadem tecidos adjacentes. Os tumores malignos são mais agressivos, pois eles são capazes de invadir tecidos próximos e espalhar para outras localidades do corpo, caracterizando a metástase (WEINBERG, 2008; CAMPBELL, FARREL, 2011).

Em alguns casos raros, tumores benignos podem se tornar mais ofensivos ao paciente caso a expansão dessas massas celulares localizadas pressione um órgão ou tecido vital. Esse tipo de tumor, também é responsável por alguns problemas clínicos, como a liberação excessiva do hormônio da tireoide na circulação, resultando em hipertireoidismo, porém a morte causada por esse tipo de tumor não é comum, sendo a maior taxa de mortalidade derivadas de tumores malignos, mais especificamente 90% dos óbitos causados por câncer estão relacionados com o processo de metástase (WEINBERG, 2008; CAMPBELL, FARREL, 2011).

O câncer, também é comumente designado como sendo uma doença do DNA, cuja raiz está nas alterações do DNA presente no interior das células. O dano causado ao DNA pode resultar de processos endógenos ou exógenos, como erros na duplicação do DNA e instabilidade química em certas bases nitrogenadas, ou de interações com radiação ionizante e ultravioleta, agentes químicos e biológicos como os vírus e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (CAMPBELL, FARREL, 2011).

Os cânceres mais agressivos, ou seja, aqueles apresentam elevado risco à vida dos pacientes, possuem pelo menos cinco características em comum que estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Características comuns dentre os cânceres que apresentam risco à vida do paciente.

Característica	Descrição
1	As células cancerosas têm a capacidade de continuar a crescer e a se dividir mesmo que não receba os sinais químicos essenciais para esses processos. As células normais, necessitam desses sinais para seu crescimento e sua divisão.
2	As células cancerosas continuam a crescer mesmo após receber sinais das células vizinhas para que esse crescimento seja interrompido.
3	As células cancerosas conseguem agregar o sistema vascular do organismo, causando o crescimento de novos vasos sanguíneos para fornecer nutrientes essenciais a elas.
4	As células cancerosas conseguem se dividir mais vezes do que uma célula normal (50-70 vezes), por isso são chamadas de células imortais.
5	As células cancerosas têm a capacidade de se desprender e migrar para outras partes do corpo, criando novos tumores que as tornam letais. Esse processo é chamado metástase e é característico dos tumores malignos. Quando um câncer entra no estágio de metástase, dificilmente é possível detê-lo

FONTE: ADAPTADO DE CAMPBELL, FARREL, 2011

Todas as características apresentadas na tabela 1 são decorrentes das alterações do DNA, citadas anteriormente, que acabam provocando modificações em

proteínas, cuja especificidade é o controle do ciclo celular. As mutações no DNA afetam dois tipos de genes: o oncogene e o gene supressor de tumor. O gene denominado oncogene é aquele no qual o produto proteico estimula o crescimento e divisão celular. Logo, mutações de oncogêneses resultam na ativação permanente desse gene. O supressor de tumor é o gene responsável pela fabricação de proteínas que restringe a capacidade da célula de se dividir. Uma mutação nesse tipo de gene resulta na divisão sem controle da célula (CAMPBEEL, FARREL, 2011).

O tratamento da doença resume-se em processos cirúrgicos, radioterápico e quimioterápicos, sendo os dois primeiros realizados quando os tumores estão localizados em um dado órgão ou tecido do organismo, ou seja, quando trata-se de um tumor benigno. Quando as células cancerígenas encontram-se espalhadas pelo organismo, o procedimento adotado é o uso da quimioterapia (BELIZÁRIO, 2002; LÓPEZ-LÁZARO, 2002; UEDA et al., 2002).

A quimioterapia é uma técnica utilizada por oncologistas para atingir células cancerosas que se baseia na ingestão de fármacos antineoplásicos, porém o problema desse tratamento é que esses fármacos, além de atuarem contra as células tumorais, apresentam efeitos colaterais que comprometem células saudáveis dos pacientes. Por esse motivo, alguns autores defendem que a meta do tratamento com quimioterapia é matar o câncer antes que o tratamento mate o paciente (CAMPBEEL, FARREL, 2007). Os efeitos secundários prejudiciais às células saudáveis, e por consequência aos pacientes, é devido à formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que apresentam efeitos tóxicos aos pacientes por induzirem o estresse oxidativo nessas células “normais” (LÓPEZ-LÁZARO, 2002; UEDA et al., 2002).

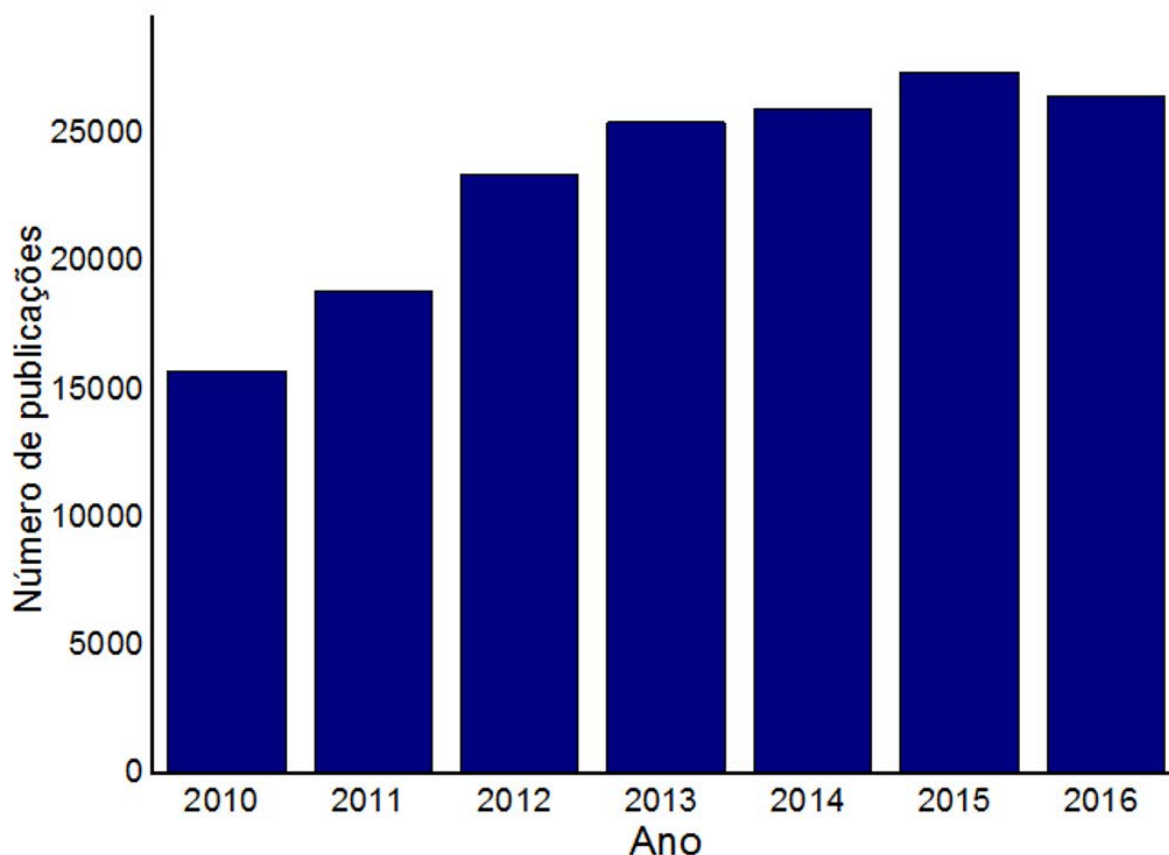
Dados do INCA mostram que, por ano, 12 milhões de pessoas no mundo são diagnosticadas com câncer, e destas, cerca de 8 milhões morrem por conta da doença. Só no Brasil, o INCA estimou cerca de 580 mil casos novos da doença no ano de 2015, e segundo o instituto, caso medidas efetivas de combate e prevenção dessa enfermidade não sejam tomadas, haverá, no ano de 2030, 26 milhões de novos casos e 17 milhões de mortes por ano no mundo.

Com base nisso, pesquisas relacionadas à busca pela fabricação de novos fármacos, combinação de outros já existentes e/ou o desenvolvimento de um tratamento complementar que seja específico para células cancerosas tem se

demostradas crescente. Pois essas descobertas relacionados ao tratamento do câncer possibilitaria um grande avanço para deter tumores e também tornaria a vida do paciente mais confortável durante o tratamento (WEINBERG, 2008).

A utilização de antioxidantes naturais, em particular o uso de flavonoides, é uma das áreas de pesquisa relacionada ao câncer que vem despertando grande interesse científico na área médica, biológica e bioquímica, como é possível observar através da Figura 1 que relaciona o número de publicações referente ao tema, do ano de 2010 até 2016. Diversas pesquisas vêm demonstrando que além de essas moléculas estarem relacionadas com a redução dos efeitos colaterais da quimioterapia, algumas são capazes de induzir células cancerosas a apoptose, sendo consideradas candidatas antitumorais promissoras (BORSKA et al., 2012; ALTUNDAG et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2016). Essas pesquisas e outros estudos serão apresentados e discutidos no decorrer desse trabalho.

Figura 1. Relação entre o número de publicações e o ano de pesquisas envolvendo flavonóides e câncer



A pesquisa foi realizada na base de dados Google Acadêmico com as palavras: flavonoids, antitumor activity e câncer durante o período de 2010 até 2016. Fonte: Autor, 2017.

3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Um radical livre pode ser definido como uma espécie química (moléculas orgânicas, inorgânicas e átomos) que possua pelo menos um elétron desemparelhado em seu orbital mais externo. Tal característica os tornam espécies altamente instáveis, com tempo de meia-vida curto, conferindo a essas moléculas uma reatividade acentuada. Os radicais são constantemente produzidos no organismo, assim como outras moléculas reativas denominadas espécies reativas do oxigênio (EROs) ou do inglês *reactive oxygen species* (ROS) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

As EROs não recebem o nome de radical livre, pois nem todas possuem elétrons de valência desemparelhados, apesar disso, também são potentes oxidantes. Elas são geradas no meio biológico durante o metabolismo de oxigênio. Logo todas as formas de vida aeróbicas estão sujeitas à formação e aos efeitos, bons ou ruins, dessas moléculas. A Tabela 2 traz as principais EROs produzidas no organismo bem como o tempo de meia vida equivalente a cada espécie e seu sítio de formação (FERREIRA et al., 1997; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

Tabela 2. Principais espécies reativas de oxigênio e sítios de formação.

Espécie	Nome	Mecanismo de Formação	Meia vida
$O_2^{\cdot -}$	Radical ânion superóxido	Redução de O_2 por um elétron, vazamento mitocondrial; ciclos redox e reações de autoxidação envolvendo flavoproteínas.	$\sim 5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ em pH 7,0
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio	Redução de O_2 por dois elétrons; superóxido dismutase e vias catalisadas por oxidases.	Decomposição enzimática*
$OH^{\cdot}$	Radical hidroxila	Redução do O_2 por três elétrons/ (Reações de Fenton e Haber-Weiss)	10^{-9} s
$LOO^{\cdot}$	Radical peroxila	Intermediários da peroxidação de lipídios de membrana	10^{-6} s
$LO^{\cdot}$	Radical alcoxila		7 s
$R^{\cdot}$	Radical alquila	Poluentes/drogas	-

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$)	Primeiro estado eletronicamente excitado do O_2 , sem sítios metabólicos definidos	10^{-5} s
----------------	---	---	-------------

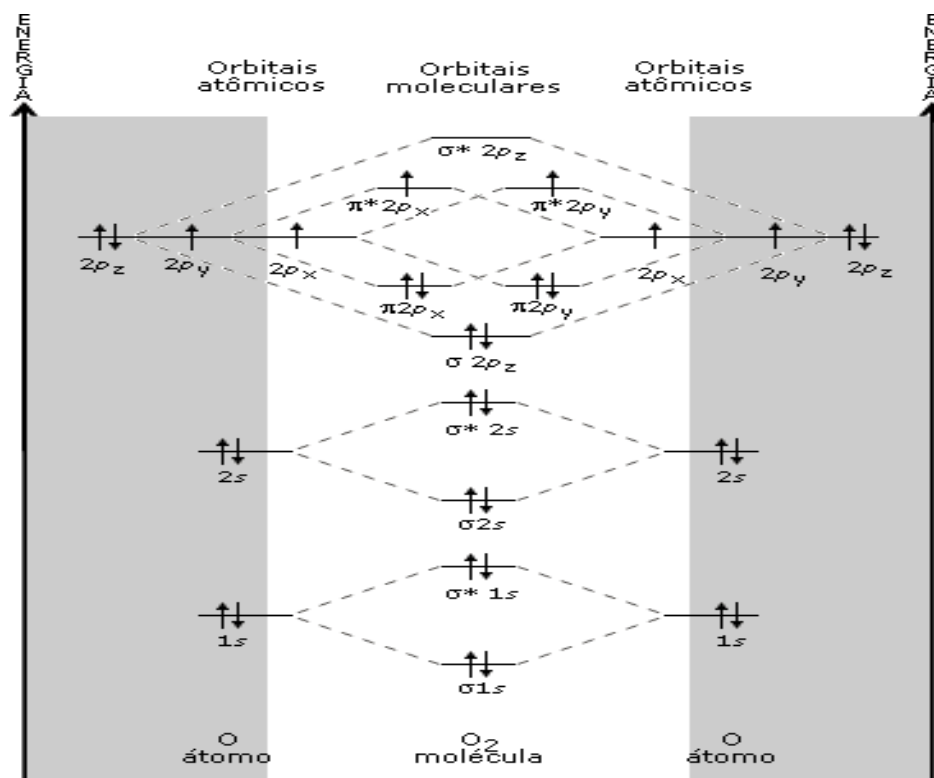
O termo ROS deriva do fato de essas espécies serem centradas no átomo de oxigênio. O H_2O_2 possui tempo de meia vida longo em comparação as outras EROs, o que possibilita sua migração e ataque em lugares diferentes do seu sítio de formação. Fonte: Adaptado de RIBEIRO et al., 2005; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999; AUGUSTO, 2008.

Em condições fisiológicas, as EROs desempenham funções de extrema importância no sistema biológico, atuando como: mediadores para a transferência de elétrons em diversas reações bioquímicas, ativadores de genes e participando do sistema de defesa, etc. Porém, além da produção endógena, fatores externos como radiações de alta intensidade, poluição, drogas e alimentação, contribuem para um excesso de produção dessas espécies. Essa produção excessiva de EROs pode desencadear danos oxidativos caracterizando o estresse oxidativo. Esse fenômeno está relacionado com o desenvolvimento e/ou agravamento de uma série de doenças pulmonares, neurodegenerativas, cânceres, diabetes dentre outras. (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; SHAMI, MOREIRA, 2004; BARBOSA et al., 2010). Esses danos devido a geração descontrolada de EROs é o resultado da capacidade dessas moléculas em reagir com proteínas, carboidratos, DNA e lipídeos, podendo ser caracterizados como danos, às vezes, irreparáveis a tais biomoléculas (BIANCHI, ANTUNES, 1999; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

3.1 REATIVIDADE DO OXIGÊNIO MOLECULAR E GERAÇÃO DE EROs

O oxigênio é um membro da família 6A da tabela periódica, apresentando número atômico igual a 8 e massa atômica equivalente a 16. A distribuição eletrônica, dos oito elétrons desse elemento é $1s^2$, $2s^2$ e $2p^4$, logo, ele possui seis elétrons de valência (Figura 1) (AKTINS, JONES, 2012). Biologicamente, o elemento é importante quando está na forma da molécula de dióxigênio. A Figura 2 ilustra a formação da molécula de O_2 segundo a Teoria do Orbital Molecular.

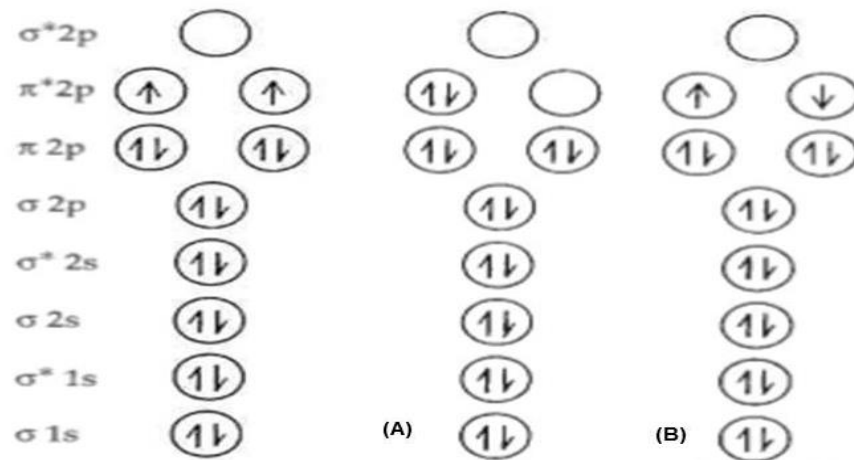
Figura 2. Configuração eletrônica e orbitais atômicos e moleculares do átomo de O e da molécula de O₂ segundo a TOM



O fato do oxigênio apresentar elétrons desemparelhados o classifica como uma molécula paramagnética. Fonte: LEE, 2000.

Conforme é possível observar na Figura 2, o O₂ possui dois elétrons desemparelhados com spins paralelos nos orbitais π^* , ou seja, é um bi-radical. Essa configuração eletrônica é pouco comum dentre as biomoléculas presentes no meio biológico, consequentemente a molécula de O₂, no estado fundamental, fica impedida por restrição de spin de reagir com os diferentes alvos biológicos. Porém, a excitação do O₂ com irradiações no comprimento de onda adequado pode mover um de seus elétrons desemparelhados com a inversão de seu spin possibilitando o emparelhamento desses dois elétrons (Figura 3). A ERO gerada nesse processo é o oxigênio singlete que possui maior poder oxidante em comparação com O₂ (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999; OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008).

Figura 3. Distribuição eletrônica do O₂ no estado fundamental e de suas formas excitadas mais (A) e menos estável (B).



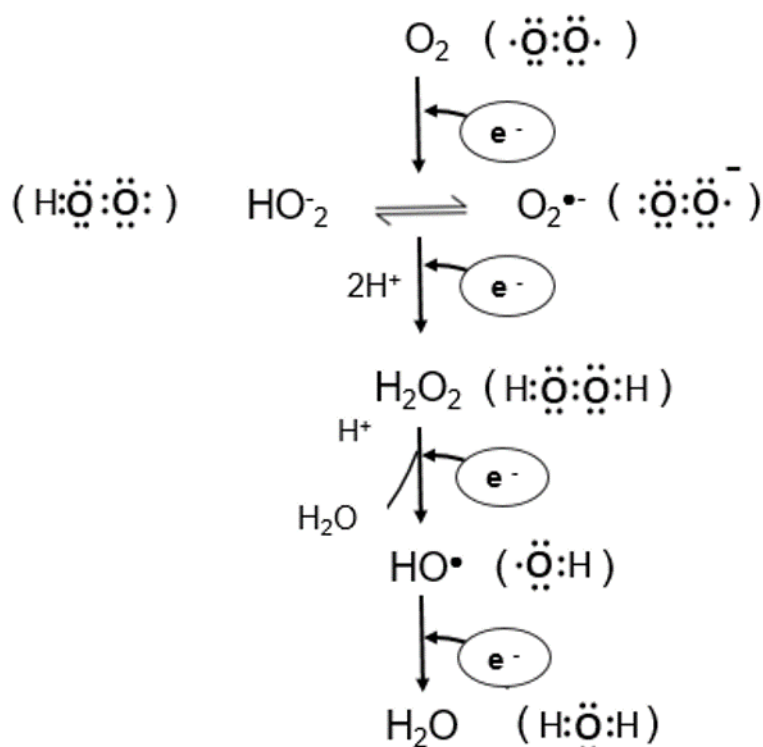
Duas formas de oxigênio singlete podem ser formadas, uma mais estável (A) na qual os dois elétrons se emparelham ocupam o mesmo orbital e a outra muito instável (B), na qual os dois elétrons ocupam orbitais diferentes. Fonte: HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999.

O oxigênio singlete pode ser formado por outras vias e, apesar de não ser considerado um radical, por não apresentar elétrons desemparelhados, o ¹O₂ é bastante reativo e capaz de reagir com a maioria dos compostos celulares, como a membrana plasmática, DNA, proteínas e lipídeos, dependendo se sua formação for dentro ou fora da célula (OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008).

3.2 GERAÇÃO DO RADICAL ÂNION SUPERÓXIDO, PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E RADICAL HIDROXILA ATRAVÉS DA MITOCÔNDRIA

A cadeia respiratória presente nas mitocôndrias é considerada a principal fonte endógena de EROs. O oxigênio desempenha importantes funções durante a respiração celular, pois ele é o aceptor final de elétrons provenientes dos carreadores NADH e FADH₂, reduzindo-se à H₂O. Contudo, os organismos aeróbicos são capazes de metabolizar apenas de 95% a 98% do O₂ consumido através da cadeia transportadora de elétrons dentro da mitocôndria. O restante, cerca de 2% a 5% acaba sofrendo redução univalente, dando origem às espécies reativas de oxigênio (Figura 4) (RIBEIRO et al., 2005; BARBOSA et al., 2010).

Figura 4. Redução univalente da molécula de O_2 com consumo de 4 elétrons formando EROs.

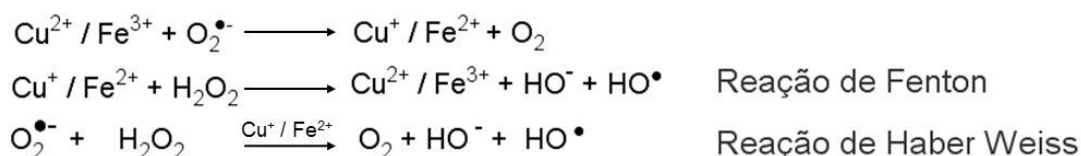


Fonte: Adaptado de FERRERIA, MATSUBARA, 1997.

A primeira ERO formada a partir da redução univalente do O_2 é o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$). A redução unieletrônica desse radical forma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que ao ser reduzido por mais um elétron forma o radical hidroxila ($HO \cdot$), que é considerado o mais reativo das EROs. Por fim, a adição de um elétron à hidroxila leva à formação de H_2O (OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008).

Além da via mitocondrial, as EROs podem ser produzidas por outras vias. O radical hidroxila, por exemplo, pode ser produzido a partir das interações entre metais de transição com o radical superóxido e peróxido de hidrogênio, através da reação de Fenton e Haber Weiss (Figura 5).

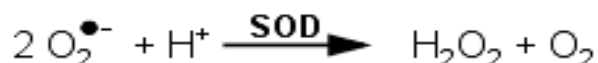
Figura 5. Geração do radical hidroxila através da reação de Fenton e Haber Weiss.



Fonte: Adaptado de GUARATINI, MEDEIROS, COLEPICOLO, 2007

O peróxido de hidrogênio também é produzido no processo de dismutação do radical superóxido (Figura 5), sendo assim, qualquer sistema gerador do radical $\text{O}_2^{\bullet-}$, como a mitocôndria e a microsomas, é capaz de produzir o H_2O_2 através da dismutação (OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008).

Figura 6. Produção de peróxido de hidrogênio através da dismutação do radical ânion superóxido.



A dismutação é uma reação química na qual um mesmo radical é oxidado e reduzido. Um radical transfere elétron para o outro, de forma que o radical que perdeu elétron se transforma em oxigênio molecular, e o que recebeu, vira peróxido de hidrogênio. Fonte: Adaptado de GUARATINI, MEDEIROS, COLEPICOLO, 2007.

3.3 REATIVIDADE E EFEITOS DELETÉRIOS DAS EROS

O radical ânion superóxido se classifica como radical por definição, porém, dentre as EROS é inativo, tendo sua ação como oxidante direto considerada irrelevante. Sua ação deletéria está relacionada com a geração de radicais mais reativos através de reações catalisadas por metais de transição, como o radical hidroxila (FERREIRA et al., 1997; BARREIROS et al., 2006; RIBEIRO et al., 2005).

O radical hidroxila é considerado como sendo a EROS mais reativa em meio biológico. Devido seu tempo de meia vida ser muito curto, a sua combinação é extremamente rápida com metais de transição e outros radicais no próprio sítio onde foi produzido. Sendo assim, se o $\text{HO}^\bullet$ for produzido próximo ao DNA poderá resultar

em modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando a inativação ou mutação do DNA. Esse fato reforça a importância/influência de EROs com o aparecimento de alguns tumores (RIBEIRO et al., 2005; OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008).

O radical hidroxila é capaz de oxidar grupos sulfidrilas (-SH) à pontes dissulfeto (S-S), inativando várias proteínas (enzimas e membrana celular). É também precursor do processo de lipoperoxidação, que consiste na oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana celulares. Todos esses eventos associados ao radical hidroxil, o caracterizam como sendo o radical mais reativo e deletério em sistemas biológicos (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

O H_2O_2 apesar de não ser um radical livre por definição, é extremamente deletério para o organismo, ele apresenta a capacidade de atravessar membranas lipídicas, reagir com membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{+2} , sendo tóxico para as células (OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008).

3.4 MECANISMO DE DEFESA CONTRA EROs

Uma substância antioxidante pode ser definida como sendo aquela capaz de inibir ou diminuir processos de oxidação de biomoléculas quando presente em baixas concentrações em comparação ao substrato oxidável. A oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares resulta em efeitos danosos ao sistema biológico e para evitar ou minimizar tais efeitos, o organismo conta com sistema endógeno de proteção formado por antioxidantes (AUGUSTO, 2006; OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008).

Esses antioxidantes atuam em diferentes níveis e através de diferentes ações, sendo classificados em primário, secundário e terciário, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Sistemas de defesas contra espécies reativas e suas ações.

Sistema de defesa	Ação antioxidante	Exemplos
Primário	Impede a geração de espécies reativas ou sequestram-nas, impedindo sua interação com alvos celulares, bloqueando assim a etapa de iniciação da reação radicalar.	1) Enzimas antioxidantes 2) Proteínas quelantes; 3) Antioxidantes de baixo peso molecular (ascorbato, GSH, etc)
Secundário	Bloqueia a etapa de propagação da reação em cadeia de radicais através do sequestro de intermediários (peroxila, alcoxila)	Tocoferóis (Vitamina E), flavonoides, etc.
Terciário (Sistema de reparo)	Remove lesões oxidativas em DNA, proteínas e lipídeos.	Proteases e fosfolipases

Fonte: Adaptado OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008.

3.4.1 DEFESA ENZIMÁTICA

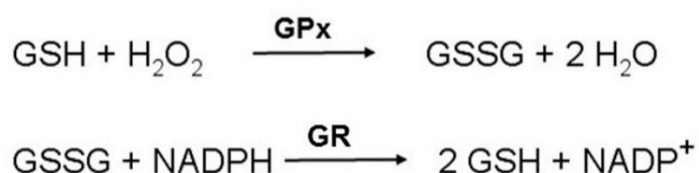
Algumas enzimas apresentam importante atividade antioxidante, como é o caso das enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase. A superóxido dismutase é uma enzima que catalisa a reação de dismutação do radical superóxido mostrada anteriormente (Figura 6). Ela é capaz de “consumir” o radical superóxido através desse processo, oferecendo proteção aos sistemas biológicos. O organismo aeróbico conta com três classes de SOD, a CuZn-SOD, Mn-SOD e Fe-SOD, todas possuem a mesma função diferindo apenas nas suas localizações nos compartimentos celulares (espaço extracelular, citosol e espaço intermembrana das mitocôndria e matriz mitocondrial, respectivamente) (AUGUSTO, 2006; OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008).

A glutathione peroxidase, GPx, é uma enzima responsável pela catálise da reação de redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos. A molécula de GPx é um tetrâmero que possui um átomo de selênio por subunidade. Sua atividade antioxidante ocorre no citoplasma, nas mitocôndrias e em diferentes órgãos como

fígado, rins, cérebro, coração, entre outros (AUGUSTO, 2006; OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008).

O ciclo catalítico da GPx é mostrado na Figura 7 e envolve a reação do peróxido de hidrogênio com a glutathiona reduzida (GSH), formando a glutathiona oxidada (GSSG) e água com posterior redução do GSSG, através da ação da coenzima NADPH e ação catalítica da enzima glutathiona redutase (GR) (AUGUSTO, 2006; OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008).

Figura 7. Redução do peróxido de hidrogênio pelo GSH catalisada pela GPx



Quando a reação ocorre com hidroperóxidos orgânicos ocorre a formação de álcool no lugar de água. Fonte: Adaptado de AUGUSTO, 2006.

O tripeptídeo glutathiona (GSH) é considerado o principal antioxidante do organismo, tal propriedade é devido a presença do grupo sulfidríla do aminoácido cisteína presente em sua composição. Quando há um excesso de produção de EROs, o GSH atua: Seu grupo sulfidríla oxida-se facilmente formando a glutathiona oxidada (GSSG). Porém, graças a atividade de enzima glutathiona peroxidase juntamente com a coenzima NADPH, o GSH é regenerado a sua forma reduzida (AUGUSTO, 2006; OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008).

A catalase, CAT, é uma enzima encontrada nos peroxissomos de fígados e rins e em microperoxissomos de outras células que possui especificidade pela catálise da redução do peróxido de hidrogênio (Figura 8) e não apresenta especificidade por peróxidos orgânicos. Tal enzima apresenta menor afinidade pelo H_2O_2 quando comparada com a glutathiona peroxidase, logo, sua atividade é mais pronunciada em condições de excesso de produção dessa EROs, caso contrário, ocorre uma competição entre a catalase e a GPx, e por questões de afinidade, a GPx acaba atuando (AUGUSTO, 2006; OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008).

Figura 8. Decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio catalisada pela enzima catalase.



Fonte: Adaptado de OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008.

Conforme apresentado, a formação das espécies reativas é constante nos organismos aeróbicos, e em condições fisiológicas o próprio organismo possui mecanismos de evitar danos através de diferentes enzimas como citado acima, porém, fatores externos como tabagismo, álcool, exposição aos raios ultravioleta, atividade física intensa, dieta, dentre outros, contribui para o aumento da produção de EROs tornando necessária a busca por antioxidantes exógenos com intuito de diminuir e ou inibir efeitos deletérios. Dentre a classe de compostos naturais que mais recebem destaque no quesito antioxidante os flavonóides vem recebendo atenção de diferentes pesquisadores (BELING, 2004; ANDERSEN et al. 2006; DORTA, 2007; NIJVELDT et al. 2007) devido as ações biológicas e farmacológicas atribuídas a eles. A seguir discorreremos sobre os flavonóides, os quais são objetos de destaque desse trabalho.

4 FLAVONÓIDES

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural encontrados em diversos vegetais e frutas. Trata-se de uma classe de metabólitos secundários de plantas, derivados da condensação do ácido chiquímico e da coenzima acetil-coA. Os flavonóides apresentam propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre os diversos sistemas biológicos, o que resulta ao considerável interesse científico e terapêutico por esses polifenóis (KANDASWASMI, MIDDLETON, 1994; BEHLING et al., 2004; HURBER, AMAYA-RODRIGUEZ, 2008; LOPES et al., 2010).

Esses compostos, apesar de não serem biossintetizados pelo homem, estão constantemente presentes na dieta humana, sendo obtidos a partir de frutas, verduras, legumes, chás, vinhos, cacau, etc (NIJVELDT, et al., 2001; BEHLING et al., 2004; MENEZES, MEDEIROS, AUGUSTO, 2007; VOLP et al., 2008; BARROS, 2012, PEREIRA, CARDOSO, 2012).

Essas moléculas podem, também, ser encontradas nas partes aéreas de plantas sendo responsáveis pela pigmentação natural dos vegetais, proteção contra oxidantes e contra os raios ultravioleta proveniente da luz solar (LOPES et al., 2010, SILVA et al., 2015). A estrutura básica de um flavonóide (Figura 9) é composta por dois anéis benzênicos (A e B) que estão ligados através de um anel pirano (C) (BEHLING et al., 2004; LOPES et al., 2010).

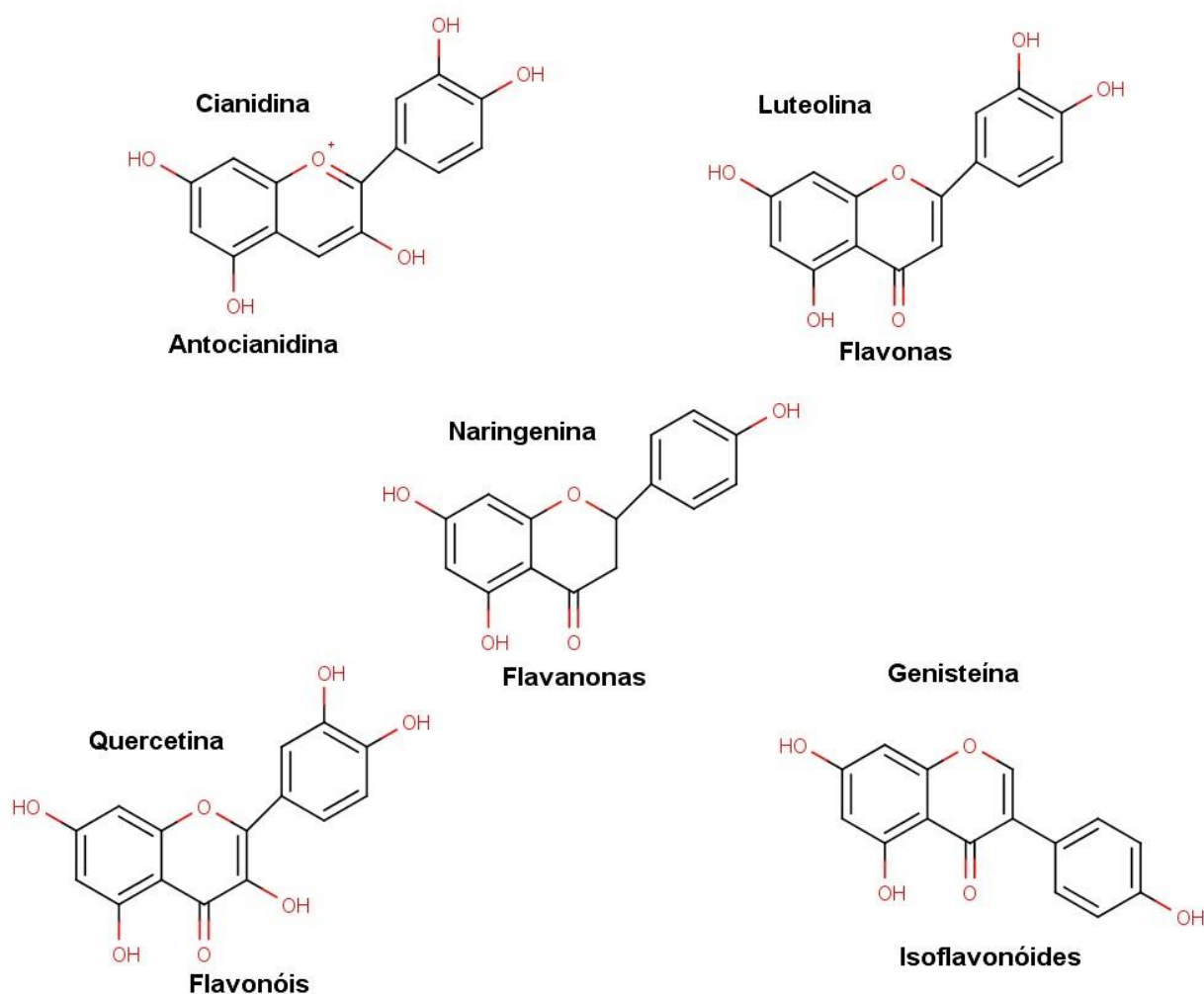
Figura 9. Estrutura básica dos flavonoides contendo dois grupos fenil unidos por um grupo pirano.



A configuração $C_6-C_3-C_6$ também é conhecida como flavilium e difenilpropano. A estrutura contém 15 átomos de carbono e o primeiro benzeno da molécula é condensado com o sexto carbono do pirano, que por sua vez, carrega, na posição 2, um grupo fenila. Fonte: Adaptado de BEHLING et al., 2004.

Pequenas modificações químicas ocorridas na estrutura básica desses compostos, como hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, hidrogenação, malonilações e sulfatações, são responsáveis pela existência dos mais de 10.000 derivados já encontrados. Tais diferenças são responsáveis pela separação dos flavonóides em diferentes classes como as flavonas, isoflavonóides e neoflavonóides, que por sua vez são subdivididas em diferentes grupos (MACHADO et al., 2008; DIXON, PASINETTI, 2010). Dentre os grupos dos flavonóides, os principais e mais estudados são: Antocianidinas, flavanonas, flavonas, flavonóis e isoflavonoides. A Figura 10 apresenta a estrutura química de um representante de cada um dos grupos citados anteriormente (LAZARY, 2010).

Figura 10. Representantes de grande destaque dos principais grupos dos flavonoides.



Representantes dos principais grupos dos flavonoides: Na parte superior é indicado o nome dos flavonóides e na inferior a subclasse a qual pertence. Fonte: Adaptado BARROS, 2012.

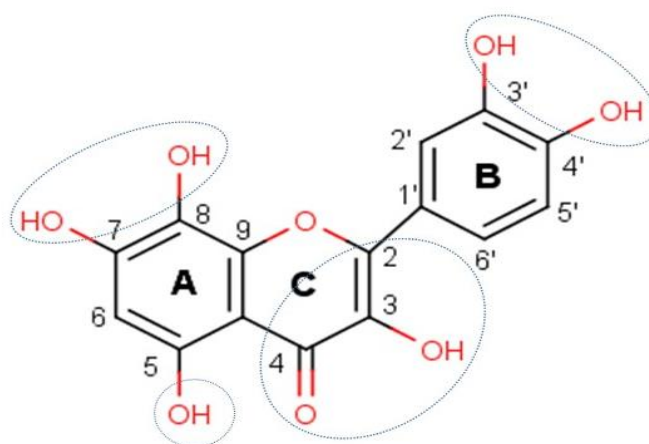
Os flavonoides nem sempre são encontrados na forma simples, denominadas agliconas, mas sim ligados a moléculas de carboidratos na forma de um glicosídeo. A *D*-glicose e a *L*-ramnose são os substituintes mais comuns. Essa ligação ocorre, normalmente, nos anéis A e B e podem ser classificadas com *O*-glicosilação, (ligação na posição 3 e 7), ou *C*-glicosilação, (ligação na posição 6 e 8) (MARTÍNEZ, 2005; BARROS, 2012) .

4.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS FLAVONÓIDES

A atividade antioxidante dos flavonóides é atribuída a combinação de diversos fatores, entre os quais podemos citar: supressão ou neutralização (*scavenging*) de EROs através da doação de um próton e/ou elétron; capacidade quelante de íons metálicos de transição que estão envolvidos na formação de radicais hidroxila (reação de Fenton ou Harber-Weis); e também são capazes de inibir sistemas enzimáticos responsáveis pela geração de radicais livres. As combinações dessas ações fazem com que essas moléculas atuem na proteção dos tecidos contra diversas patologias relacionadas ao excesso de EROs produzidos pelo organismo, inclusive o câncer (BEHLING et al., 2004; ARAUJO et al., 2005; JIMÉNEZ et al., 2009 ; BARROS, 2012).

Arranjos estruturais, como a presença de certos grupos funcionais e sua posição na estrutura básica dos flavonóides, são responsáveis por potencializar a atividade antioxidante desses compostos. Por exemplo, agliconas que possuem grupos hidroxilas (-OH) nas posições 3 e 4 do anel B e 7 e 8 no anel A, e dupla ligação entre o carbono 2 e carbono 3 ($C_2=C_3$) conjugados com uma função cetona e um grupo OH livre na posição 3 apresentam maior atividade antioxidante (WANG, CAO, PRIOR, 1997; SASKIA, VAN, BAST, 1998; PIETTA et al., 2000; HEIM, TAGLIAFERRO, BOBILYA, 2002; KUSKOSKI, GARCÍA-PARILLA, 2004; MARAIS et al., 2006; JIMÉNEZ, MARTÍNEZ, FONSECA, 2009). A Figura 11 destaca os principais fatores (grupos, ligações duplas) que influenciam a atividade antioxidante dos flavonóides.

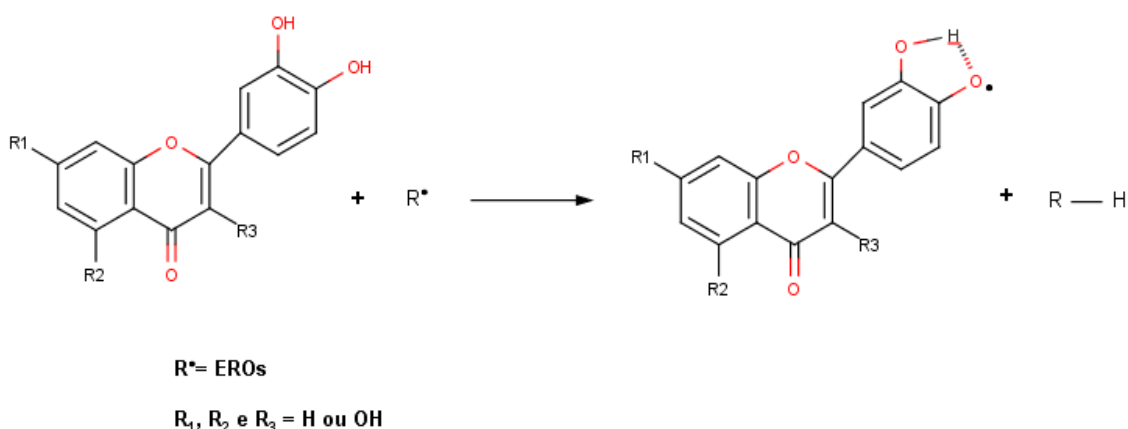
Figura 11. Arranjos estruturais responsáveis pela potencialização da atividade antioxidante dos flavonoides.



Fonte: Adaptado BARROS, 2012

É possível observar a influência desses grupos funcionais através dos mecanismos propostos para a neutralização (redução do ponto de vista químico) de radicais livres. Por exemplo, devido a presença do grupo catecol no anel B, o flavonóide pode doar um átomo de hidrogênio (próton + elétron) para as espécies reativas, reduzindo-as (Figura 12). Neste processo, formar-se-á um radical fenoxila que pode ser estabilizado pela formação da ligação de hidrogênio entre o oxigênio que possui um elétron desemparelhado e o outro grupo hidroxila desse anel (MUSIALIK, 2009 apud BARROS, 2012).

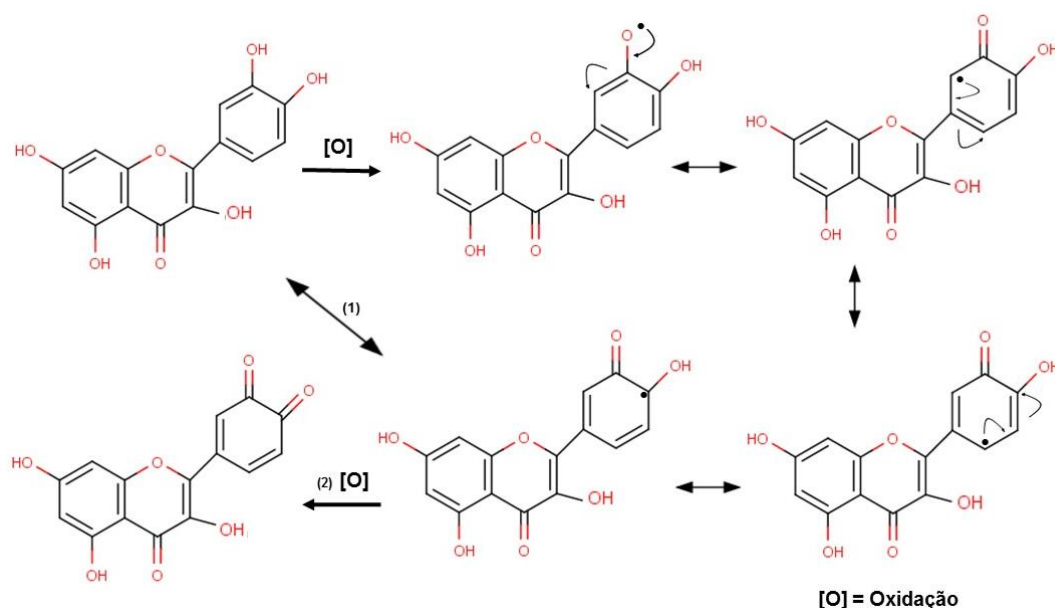
Figura 12. Estabilização de ROS através da doação de um próton do anel B dos flavonoides.



Fonte: Adaptado de MUSIALIK et al., 2009 apud BARROS, 2012.

A importância da configuração discutida do anel C (insaturação $\text{C}_2=\text{C}_3$ conjugada com um grupo hidroxila na posição 3 e um grupo carbonila na posição quatro) é decorrente da possibilidade de deslocalização eletrônica π do anel B que estabiliza, através da ressonância, os radicais formados, Figura 13 (1). O caminho apresentado na Figura 13 (2) demonstra que os radicais dos flavonóides podem ser estabilizados a partir da dismutação radicalar com a formação de quinona (SHUKLA, GUPTA, 2010 apud BARROS, 2012).

Figura 13. Estabilização dos radicais flavonoides via deslocalização eletrônica (1) e formação de quinona (2).

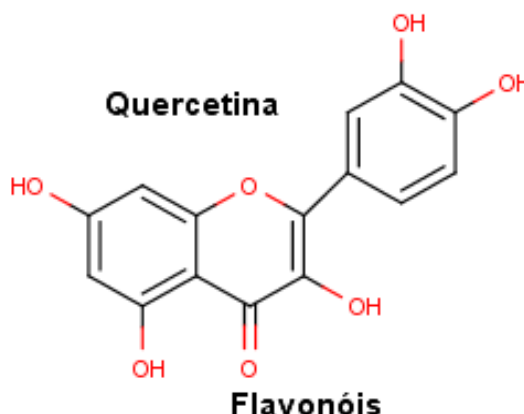


Estabilização dos radicais por ressonância (A) e terminação da reação radicalar com formação de quinona (B) via deslocalização eletrônica pela insaturação do anel C. Fonte: AUTOR, 2017.

4.2 QUERCETINA

A quercetina, (Figura 14) pertencente a subclasse dos flavonóis, é considerada como sendo o flavonóide mais abundante na alimentação diária humana com um consumo diário variando de 50 a 500 mg. Ela representa 95% do total de polifenóis ingeridos por dia, e esse elevado consumo de quercetina, em comparação aos outros flavonoides, é decorrente de sua ampla distribuição dentre os alimentos consumidos pelo homem, como cebolas, maçãs, repolho, tomate, couve, vagem, brócolis, etc. (DESCHENER, et al. 1991; NIJVELDT, et al. 2001; BEHLING et al., 2004).

Figura 14. Fórmula estrutural da quercetina.



Fonte: O nome sistemático da quercetina é 3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona
 Fonte: Adaptado de BARROS, 2012.

Devido suas propriedades terapêuticas, como seu potencial antioxidante, anticarcinogênico e seus efeitos protetores ao sistema renal, cardiovascular e hepático, atribuem a esse flavonóide interesse e destaque científico e terapêutico crescente em diversos países (BEHLING, 2004).

Dentre as propriedades atribuídas a quercetina, sua ação antioxidante é a mais estudada e entendida. Sabe-se que esse polifenol é capaz de quelar íons metálicos envolvidos da reação de Fenton, inibindo a formação do radical hidroxila, como também de interagir com radical ânion superóxido e interferir no processo de peroxidação lipídica, pois reage com os radicais hidroperoxila lipídicos (BEHLING, 2004).

Porém, apesar de os flavonóides serem conhecidos por sua atividade antioxidante, estudos *in vitro* vem demonstrando que, dependendo da concentração e do meio, essas moléculas podem apresentar atividade pró-oxidante, que segundo alguns autores, está relacionada com os efeitos citotóxicos e pró-apoptóticos dos flavonóides (UEDA et al., 2002; BEHLING et al., 2004).

Devido a essa possível capacidade anticancerígena, diversos estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando a quercetina vem sendo realizado para verificar tal propriedade e elucidar um mecanismo pelo qual ela induz a morte de células cancerígenas. Esses estudos são de extrema importância, pois uma vez conhecido esse mecanismo e os efeitos da quercetina frente as células com câncer e sadias, novos fármacos, ou combinação de fármacos, podem ser desenvolvidos para o tratamento do câncer (DORTA, 2007; BORKA et al., 2012; WANG et al., 2012; ALTUNDAG et al., 2016).

5 APOPTOSE

A apoptose, também conhecida como morte celular programada, é um processo extremamente regulado caracterizado por mudanças morfológicas e bioquímicas que diferem tal processo de outros responsáveis pela morte de células nos organismos multicelulares. A morte programada desempenha um papel central muito importante no desenvolvimento dos indivíduos, e quando há uma desregulação nesse processo, esse fenômeno está associado ao desenvolvimento de algumas patologias (CORDEIRO, 1999; ALBERTS et al., 2006; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007).

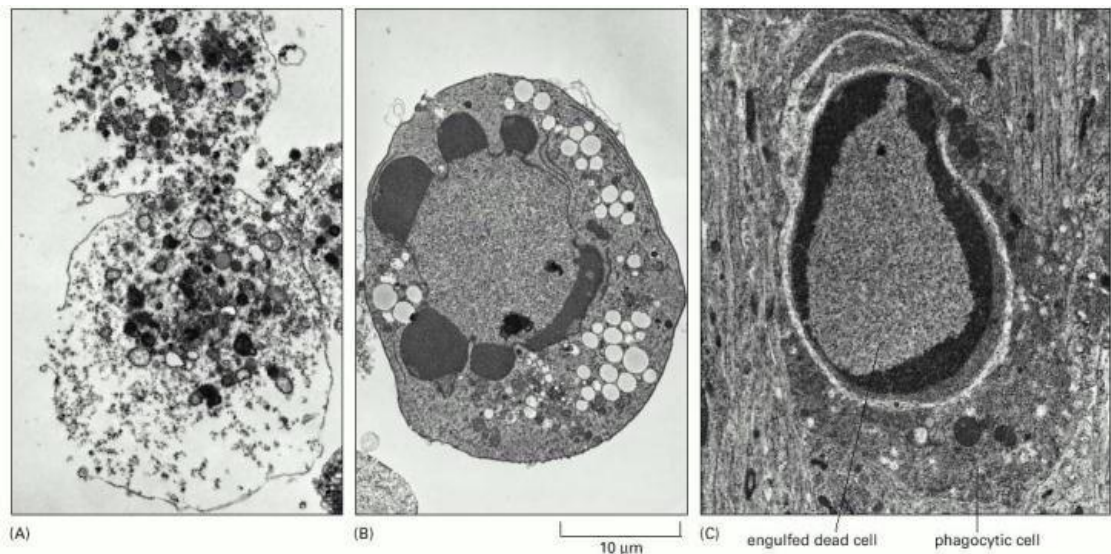
O número de células que compõe os organismos multicelulares é fortemente regulado tanto pelo controle da velocidade de divisão celular quanto pelo controle da morte celular. Sendo assim, a mitose e a apoptose, juntas, desempenham um papel essencial para o desenvolvimento e manutenção da homeostase. A regulação correta entre a divisão e a morte celular garante a reciclagem anual, de um corpo adulto, de aproximadamente 3×10^{14} células. Essa reciclagem se refere ao número de formação de novas células e eliminação das já existentes. A apoptose parece ser responsável pela maioria das mortes celulares durante essa reciclagem e é através desse processo que células infectadas por vírus ou cancerígenas também são eliminadas (CORDEIRO, 1999; ALBERTS et al., 2006; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008).

O processo de morte celular programada é caracterizado por algumas mudanças características desse processo que a diferem da necrose (Figura 15). Durante a apoptose, que em geral é um processo rápido, a célula se retrai e condensa. Essa retração celular é responsável pela perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. O citoesqueleto se colapsa, o núcleo sofre desintegração em fragmentos envoltos pela membrana nuclear e o DNA do núcleo também sofre fragmentação. A membrana celular forma prolongamentos, chamados de *blebs*, que aumentam de número, tamanho e rompem-se originando os corpos apoptóticos (HORTA, YOUNG, 1999; ALBERTS, 2006; ANAZETTI, MELO, 2007; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008).

A superfície da célula sofre uma alteração fazendo com que ela imediatamente atraia células fagocíticas, normalmente os macrófagos, que engolfam, Figura 15(C), a

célula antes que ela derrame o seu conteúdo, esse processo evita uma inflamação local, como ocorre na necrose, e também permite que os componentes orgânicos da célula em apoptose sejam reciclados pela célula que a ingere (HORA, YOUNG, 1999; ALBERTS et al., 2006; ANAZETTI, MELO, 2007; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007, WEINBERG, 2008).

Figura 15. Características morfológicas do processo apoptótico (B e C) .



As imagens referem-se a micrografias eletrônicas de células que sofrem morte por necrose (A) e apoptose (B e C). A célula que sofreu necrose (A) parece ter explodido, enquanto que as células que morreram por apoptose (B e C) se condensaram, porém, parecerem relativamente intactas:
ALBERTS et al., 2006.

A perda do programa apoptótico funcional está relacionada com o desenvolvimento de diversas patologias, incluindo as doenças autoimunes e o câncer. Muitos autores consideram que a marca das células humanas malignas é a perda de controle da apoptose. Já, o processo extremo, ou seja, a apoptose desenfreada está relacionada com doenças neurodegenerativas e AIDS (CORDEIRO, 1999; ALBERTS et al., 2006; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008).

5.1 APOPTOSE E A PROTEÍNA p53

A ordem dos componentes celulares dos mamíferos é mantida graças a presença, na maioria das células, da proteína p53 que é produzida via transcrição do gene supressor de tumor p53. Em condições normais, quando alguma célula sofre algum dano genético intracelular ou alguma desordem no metabolismo, a p53 é responsável pela parada desta durante o ciclo celular e pode decidir, caso os danos forem passíveis de reparo, se essa célula pode ser reparada e, assim, retornar ao ciclo, ou quando essa desordem/dano é muito grave, a proteína “opta” por emitir sinais que irão resultar na apoptose celular. Esta resposta drástica que desencadeia a morte celular programada de células, ocorre quando há um dano genômico irreparável, desequilíbrios graves de sinalização e privação extrema de oxigênio (anoxia) (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008).

Quando é necessário o reparo das células ocorre uma superexpressão e ativação da p53, antes inativada pela proteína mdm-2, do inglês *murine double minute 2*. Após realizado o reparo, a própria p53 é responsável por aumentar a transcrição da proteína mdm-2, sua inibidora, que ao se ligar a p53 é responsável por mantê-la inativada no citosol. A apoptose iniciada pela p53 ocorre, em partes, pela habilidade da proteína em promover a expressão de genes que codificam um grupo de proteínas pró-apoptóticas. Dentre essas proteínas encontram-se a Bax que pertence à família Bcl-2. Ao mesmo tempo, a p53 tem capacidade de reprimir a expressão de genes que especificam proteínas ditas anti-apoptóticas (SHER, 2000; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008).

A síntese da proteína p53 em células normais ocorre em altas taxas, porém, da mesma maneira que é formada, é também rapidamente degradada, logo, num balanço final, o nível em estado estacionário dessa proteína é baixo dentro das células. Alguns estudos indicam que a indução de apoptose via p53 não parece estar relacionada com as situações de rotina, mas parece estar limitada nas situações emergenciais que podem ameaçar e comprometer células e tecidos (SHER, 2000; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008). Um exemplo é o fato do organismo utilizar a sinalização da proteína p53 para induzir a apoptose e com isso eliminar células que apresentem potencial para se tornarem tumorais e outras que sustentam alguns tipos de mutações que podem desregular o crescimento. Como consequência,

se o gene p53 sofrer mutações, essa capacidade é comprometida (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008).

Quando a proteína p53 tem sua função comprometida, devido a mutações, ela não consegue realizar a parada no ciclo celular para análise e reparos, e como isso, células “defeituosas” acabam prosseguindo no ciclo celular e “escapando” da apoptose e/ou reparos necessários. A análise de uma série de genes examinados em células cancerosas humanas revelou que a p53 é o gene frequentemente mais encontrado com mutações e essa forma mutante é encontrada em quase a metade de todos os tumores humanos (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008).

A perda da função da p53 e o desenvolvimento de células tumorais também está relacionada ao gene Tsp-1. A p53 aumenta a expressão do gene Tsp-1, que especifica trombospondina-1. A Tsp-1 é uma proteína secretada que atua no espaço extracelular cuja função é o bloqueio do desenvolvimento de vasos sanguíneos. Logo, a diminuição da expressão de Tsp-1, decorrente da perda de p53, remove um obstáculo importante que poderia prevenir a sobrevivência dessas células, que é a falta de oxigênio carregado pelo sangue (WEINERBG, 2008).

Como foi possível observar, as ações biológicas da p53 podem ocorrer de duas maneiras: primeiro, ela pode frear o ciclo celular e segundo, ela pode induzir a apoptose através da ativação da “maquinaria” apoptótica. A busca por fármacos e moléculas que estimulem, de alguma maneira, a produção da p53 em células tumorais é uma alternativa para o tratamento de tumores, porém, para isso é necessário conhecer bem os mecanismos envolvidos nesse processo. Em nível bioquímico, a maneira como a p53 decide entre a apreensão do ciclo celular ou a apoptose, ainda não é compreendida (WEINBERG, 2008).

5.2 INDUÇÃO A APOPTOSE PELA VIA MITOCONDRIAL

A mitocôndria é uma organela, localizada no citoplasma celular, que desempenha funções essenciais para manutenção e sobrevivência de células e, conseqüentemente, do homem. Essa organela é responsável pela síntese de energia (ATP), pela produção de calor e também é uma via importante para indução da morte de células por apoptose (ALBERTS et al., 2006; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008; NELSON, COX, 2011). Uma série de proteínas e enzimas

estão envolvidas na sinalização e indução da morte celular programada pela via mitocondrial, portanto, antes de discorrer sobre como ocorre esse processo, é importante conhecer as biomoléculas que o regulam.

5.2.1 PROTEÍNAS DA FAMÍLIA Bcl-2 E CASPASES.

A proteína p53 não é a única participante da apoptose. Outro componente importante são os genes e proteínas, por eles codificadas, pertencentes a família Bcl-2. Essa família é composta tanto por membros pró-apoptóticos, como a Bax, Bad, Bak e Bid, quanto membros anti-apoptóticos, como a Bcl-2 e Bcl-xL. Ao todo, sabe-se que o genoma humano é capaz de codificar 24 proteínas dessa família (PETROS, OLEJNICZAK, FESIK, 2004; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008).

A homeostasia celular é mantida através de um rigoroso controle da quantidade dessas duas classes de proteínas da família Bcl-2, porém, um desequilíbrio decorrente de estímulos, como danificações no DNA, aumenta a expressão das proteínas pró-apoptóticas, resultando na morte celular. O mecanismo apoptótico em questão é dependente da mitocôndria e envolve a ativação de diferentes caspases. (PETROS, OLEJNICZAK, FESIK, 2004; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008).

As caspases são enzimas pertencentes à família das cisteína proteases. Essas enzimas possuem uma cisteína no sítio ativo, que apresentam especificidade em clivar ligações peptídicas próximas à resíduos de aspartato. Essas enzimas são sintetizadas pelos seus precursores inativos, denominados procaspases, presentes no citosol da célula. Porém, em resposta a sinais apoptóticos, as procaspases são clivadas proteoliticamente nos resíduos de ácido aspártico pela cisteína, tornando-se ativas. Uma vez ativadas, as caspases clivam e ativam outros membros da família de proteases, resultando no aumento do número de espécies ativas e de clivagens, caracterizando a cascata proteolítica (ALBERTS et al., 2006; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008).

As caspases se classificam em iniciadoras, que são aquelas que desencadeiam a ativação da cascata de caspases, e executoras, as quais são aquelas que realizam o trabalho de destruir componentes críticos da célula. A cascata proteolítica é um

processo destrutivo, auto-estimulado e irreversível, assim, como consequência desses fatores, quando a célula entra no caminho de sua destruição, não há como reverter esse processo, portanto, é evidente que a precisa regulação da ativação das procaspases é essencial para que a indução da morte celular por apoptose seja realizada apenas quando necessário. É nesse ponto de regulação que as proteínas, apoptóticas e antiapoptóticas, da família Bcl-2 atuam. (ALBERTS et al., 2006; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008).

5.2.2 SINALIZAÇÃO E INDUÇÃO DO PROGRAMA APOPTÓTICO PELA VIA MITOCONDRIAL

As mitocôndrias possuem, entre a membrana interna e externa, uma pequena proteína, conhecida como citocromo c, que é considerada como sendo a autora central do processo apoptótico. O citocromo é um dos componentes da cadeia transportadora de elétrons e atua na transferência de elétrons durante a fosforilação oxidativa (WEINBERG, 2008; NELSON, COX, 2011).

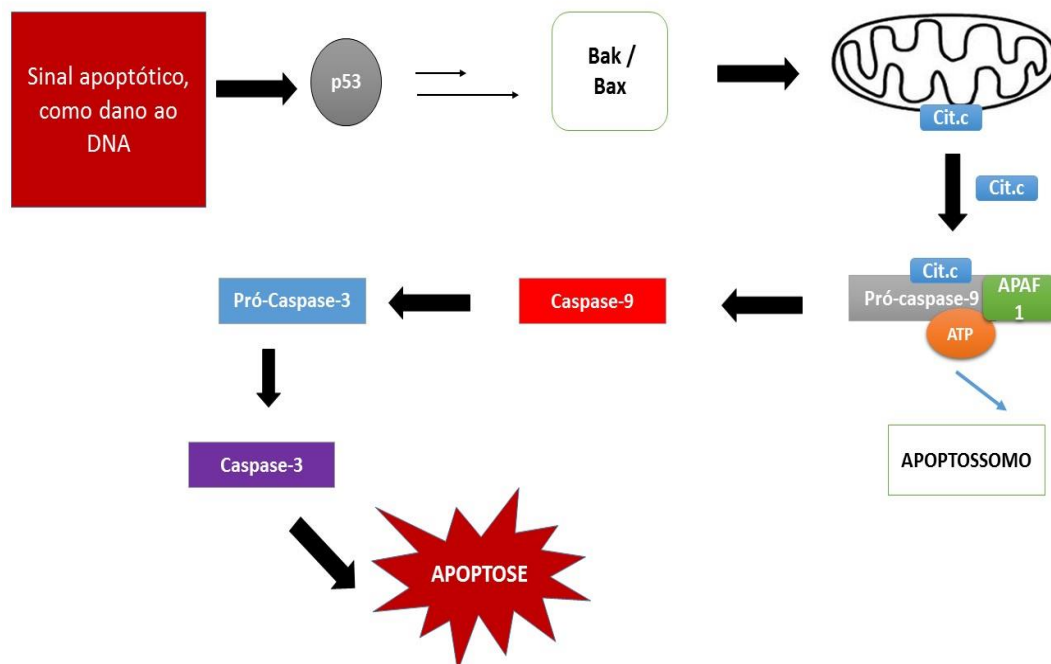
Em resposta a certos sinais que iniciam o processo apoptótico, a proteína citocromo c é secretada da mitocôndria para o citosol, e uma vez presente no citosol, ela se associa a outras proteínas desencadeando uma cascata de eventos que resultam na apoptose. A passagem do citocromo c para o citosol ocorre por meio de canais, controlados pelos membros da família Bcl-2, que regulam se ela e outras proteínas localizadas entre as membranas interna e externa serão liberadas de dentro da mitocôndria para o citosol (WEINBERG, 2008; NELSON, COX, 2011).

As proteínas Bcl-2 e Bcl2-xL são responsáveis por manter os canais de passagem do citocromo c fechado, evitando a apoptose. Já as proteínas Bax, Bad, Bak e Bid trabalham para manter esse canal aberto, possibilitando a liberação do citocromo c para o citosol, com isso favorecendo a apoptose. Com base nessas funções, é possível entender a classificação das proteínas em anti-apoptóticas e pró-apoptóticas. Os níveis relativos entre essas duas classes de proteínas é um fator determinante para liberação ou não do citocromo-c (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008).

Uma vez no citoplasma, a molécula de citocromo c se associa a proteína fator de ativação da apoptose 1 (APAF-1), resultando na formação do apoptossomo. Uma

vez formado, o apoptossomo promove a auto-clivagem da pró-caspase-9 em caspase-9 ativada. A caspase-9 cliva a procaspase-3 em sua forma ativa, a caspase-3. A caspase 3 é responsável pela clivagem de outra procaspase, tornando-a ativa, que por sua vez, clivará e ativará outra procaspase, e assim sucessivamente. Esse processo de clivagem e ativação de procaspase e caspase, respectivamente, é denominada cascata proteolítica das caspases, e ele ocorre até que as caspases finais clivem proteínas, denominadas substratos de morte, cuja degradação cria mudanças celulares associadas a apoptose (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008). A Figura 16 esquematiza esse mecanismo de sinalização.

Figura 16. Mecanismo de indução a apoptose dependente da via das caspases.



Estudos indicam que a associação da Bax com a Bak é responsável pela liberação de APAF-1 e como é possível observar, a apoptose depende de ATP. Fonte: Adaptado de DORTA, 2007.

Estudos indicam que as proteínas Bax e Bak se agregam na superfície externa da mitocôndria, e essa agregação é responsável, de alguma maneira ainda não esclarecida, pela fragmentação dessa organela. Esse processo parece resultar na liberação adicional de algumas proteínas pró-apoptóticas para o citosol, como a SMAC/DIABLO (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008).

A função da SMAC/DIABLO é inativar proteínas bloqueadoras da ativação das caspases, denominadas proteínas inibidoras da apoptose (IAPs). O mecanismo de inibição da IAPs é executado de duas maneiras distintas: 1) elas podem se ligar diretamente às caspases, promovendo sua inativação; e/ou 2) elas podem marcar essas enzimas para ubiquitinação e degradação. Sendo assim, a liberação da SMAC/DIABLO e do citocromo c favorece a morte celular programada (DORTA, 2007; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008).

Agora é possível esclarecer um pouco mais o mecanismo de sinalização da p53 e sua relação com Bax. Como citado anteriormente, a p53 encontra-se ligada e inibida pela mdm-2 no citosol, e assim ela permanece até que seja necessária. Dentre os diversos substratos das caspases já citados, é a proteína mdm-2. Quando essa proteína é clivada pelas caspases ela libera a p53 que agora, na forma ativada, transloca-se para o núcleo e ativa a transcrição de genes pró-apoptóticos, como a Bax (SCHULER, MAURER, GOLDSTEIN, 2003; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008).

As características morfológicas típicas da apoptose, apresentadas anteriormente nesse trabalho, são resultantes da cascata de clivagem proteolítica das caspases. Vários componentes chave das células sofrem clivagem pelas caspases executoras (3, 6 e 7). Como exemplo é possível citar a clivagem do inibidor da enzima desoxirribonuclease (DNase). O inibidor da DNase impede que a enzima desempenhe sua função que é digerir DNA cromossomal. Após ser clivado pelas caspases, o inibidor libera a DNase, que é responsável pela fragmentação do DNA observada em células que sofreram apoptose (WEINBERG, 2008).

Outro exemplo é a clivagem de proteínas constituintes do citoesqueleto celular. A clivagem dessas proteínas resulta num colapso do citoesqueleto que está envolvido na formação de corpos apoptóticos. A condensação da cromatina e encolhimento nuclear é resultante da clivagem, pelas caspases, de lâminas da superfície interna da membrana celular (WEINBERG, 2008).

O alcance das caspases executoras estende-se de volta ao interior da mitocôndria, onde a apoptose foi iniciada. A clivagem de substratos internos dessa organela leva a interrupção do transporte de elétrons, liberação de EROs, perda da produção de ATP e da integridade estrutural da mitocôndria (WEINBERG, 2008).

5.3 APOPTOSE E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Uma série de estímulos podem desencadear a apoptose, como visto até aqui, e dentre eles podemos citar o estresse oxidativo. Como já explicado nesse trabalho, o estresse oxidativo é caracterizado pelo excesso de produção de oxidantes, EROs, que podem reagir, danificar e comprometer a função do DNA, RNA, lipídeos e proteínas. Em resposta a esses eventos a célula pode ser induzida ao processo apoptótico (ANAZETTI, MELO, 2007; HUSSAIN et.al., 2010; KIM et.al., 2010; LOPES et.al., 2011; REIS, 2012).

Sabe-se que as vias apoptóticas clássicas estão envolvidas com um acúmulo modesto de EROs. Além disso, uma série de dados revelam que a exposição de células ao H_2O_2 e outras espécies reativas de oxigênio é um mecanismo indutor da apoptose. O H_2O_2 tem se demonstrado capaz induzir a apoptose em células endoteliais, células de hepatócitos humanos, células epiteliais e neutrófilos (ANAZETTI, MELO, 2007; FANG et.al., 2010; HUSSAIN et.al., 2010; KIM et.al., 2010; LOPES et.al., 2011; REIS, 2012).

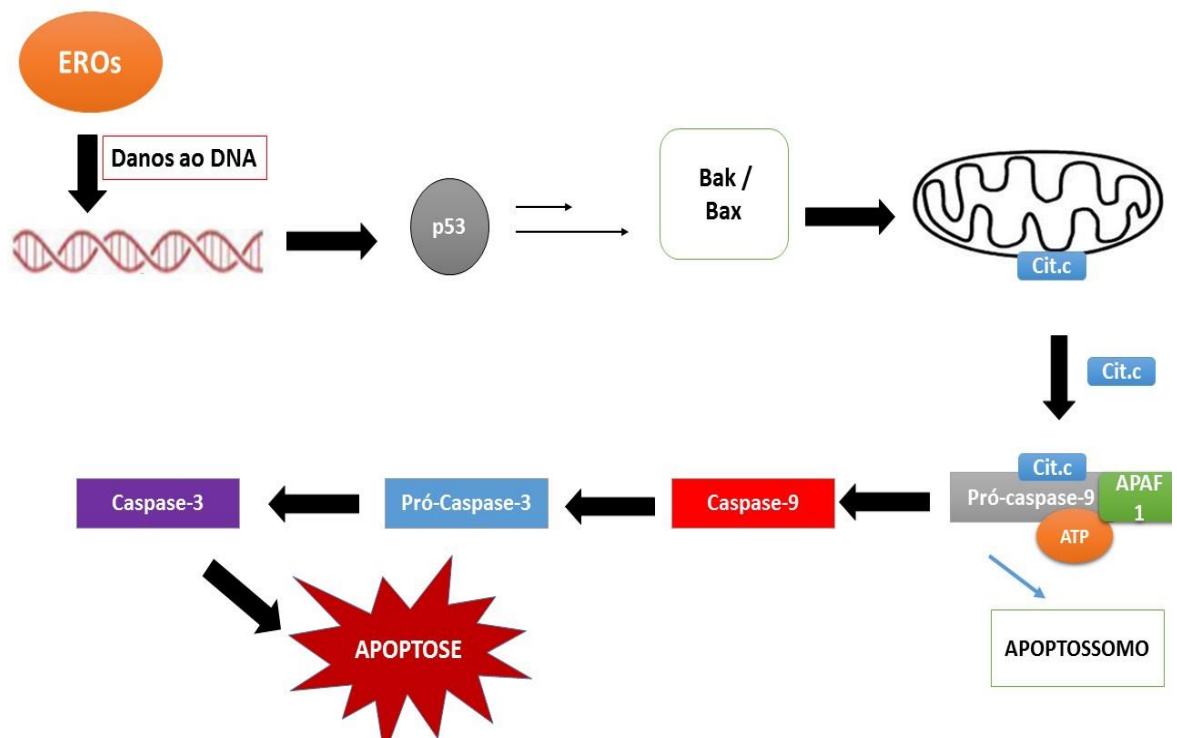
A função mitocondrial também é comprometida pela ação de agentes oxidantes, pois essa organela é muito sensível a alterações no estado de oxidação e redução da célula. Em condições normais a célula encontra-se em um ambiente redutor, a coenzima GSH intracelular está predominantemente (95%) na forma reduzida. Porém, vários estudos revelam que ocorre uma diminuição simultânea da GSH intracelular com o aumento de EROs, tornando o meio intracelular oxidante durante a apoptose. Esse fato suporta a ideia de que as EROs podem atuar como via de indução à morte celular programada (CHANDRA, SAMALI, ORRENIUS, 2000; KANNAN, JAIN, 2000; MATÉS, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 2000; TAKAHASHI et al., 2003; ANAZETTI, MELO, 2007; KIM et.al., 2010; LOPES et.al., 2011; REIS, 2012).

O mecanismo pelo qual as EROs são capazes de induzir a morte celular ainda não é muito compreendido, entretanto, sabe-se que essas variações redox decorrentes do aumento de EROs, juntamente com o ataque, por parte dessas moléculas, às proteínas internas da mitocôndria e lipídeos de membrana podem ser responsáveis pela perda da função mitocondrial, o que resulta na redução dos níveis

de ATP, assim, conseqüentemente há uma diminuição na produção de energia, liberação do citocromo c e na transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). Além disso, como já foi explicado, danos ao DNA servem como uma via de sinalização para ativação da proteína p53. (KIM et.al., 2010; LOPES et.al., 2011; REIS, 2012).

Como visto, a liberação do citocromo c é um sinal para a ativação da cascata proteolítica da via das caspases, sendo assim, acredita-se que EROs são capazes de induzir células a apoptose através da via mitocondrial. Somado a isso, alguns autores mostraram, através de suas pesquisas, que as EROs são capazes de induzir a ativação das caspases iniciadora e executora -9 e -3, respectivamente (Figura 17) (CHANDRA, SAMALI, ORRENIUS, 2000; KANNAN, JAIN, 2000; MATÉS, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 2000; TAKAHASHI et al., 2003; KIM et.al., 2010; LOPES et.al., 2011; REIS, 2012).

Figura 17. Mecanismo de sinalização a apoptose mediada por EROs.



Pesquisas revelam que as alterações no estado redox celular para um ambiente mais oxidante ocorrem antes da ativação da fase final da cascata das caspases, indicando que as EROs atuam como uma via de sinalização. Fonte: Adaptado de DORTA, 2007.

Conforme é possível perceber, através dos mecanismos apresentados, os diferentes estímulos responsáveis pela ativação do processo apoptótico parecem convergir para uma mesma sequência de eventos no qual as caspases são os componentes centrais desse processo de morte (CHANDRA, SAMALI, ORRENIUS, 2000; KANNAN, JAIN, 2000; MATÉS, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 2000; TAKAHASHI et al.,2003).

6 INDUÇÃO DA APOPTOSE COMO MECANISMO CITOTÓXICO PARA CÉLULAS TUMORAIS

Como explicado nesse trabalho, o câncer surge quando as células apresentam mutações simultâneas em genes que são responsáveis pelo controle de seu crescimento e de sua sobrevivência. Também foi apresentado que o gene supressor de tumor p53, que é responsável pela indução da apoptose celular em condições específicas, está na forma mutante na maioria dos tumores, por isso as células cancerígenas escapam da morte celular programada e acabam sobrevivendo por mais tempo, acumulando mais mutações e multiplicando-se sem controle (ANAZETTI, MELO, 2007; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008; CAMPBELL, FARREL, 2011).

Foi visto que essa capacidade de resistência a apoptose é considerada a característica mais marcante de tumores malignos, logo o tratamento do câncer caminha na direção de tentar reverter esse quadro de progressão celular através de estratégias, quimioterápicas e radioterápicas, que de alguma maneira induza tais células à morte. Inicialmente acreditava-se que essas terapias destruíam células tumorais através da necrose, porém, uma série de dados e ensaios experimentais revelaram que a apoptose é o principal meio pelo qual as células mutantes são induzidas a morte (ANAZETTI, MELO, 2007; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WEINBERG, 2008; CAMPBELL, FARREL, 2011).

Essas estratégias de tratamento se baseiam em utilizar métodos que são capazes de induzir células tumorais à morte celular programada e/ou promover uma maior resposta aos tratamentos com radiação e agentes citotóxicos. O estudo e ensaios clínicos com muitas drogas terapêuticas tem sido explorado e desenvolvido, dentre os agentes mais potentes e utilizados hoje está aqueles a base de platina, a cisplatina em específico (HE et al., 2015; ONG et al., 2015).

Como exemplo da relevância da indução de apoptose e mecanismo de ação de drogas, pode-se citar o seguinte problema relacionado a utilização da cisplatina como estratégia quimioterápica: insensibilidade à indução da apoptose, por parte desse fármaco, em diferentes células de tumor e na recaída constante de pacientes em tratamento devido o desenvolvimento de resistência ao fármaco, mesmo que de início a resposta ao tratamento seja relevante (GALUZZI et al., 2014; QU et al., 2014; HE et al., 2015; ONG et al., 2015).

A falta de sensibilidade de muitos tipos de células cancerosas frente a cisplatina se dá por vários mecanismos, como por exemplo a superexpressão de proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2. Frente a esse problema, pacientes são submetidos a dose mais elevadas desse fármaco e estão expostos a riscos, ainda mais elevados, decorrentes dos efeitos tóxicos secundários, como neurotoxicidade, e comprometimento de células sadias (RUDIN et al., 2003; CHO et al., 2006; RUDIN et al., 2006; SPRAUTEN et al., 2012 apud HE et al., 2015; GALUZZI et al., 2014; ONG et al., 2015)

A cisplatina, embora muito potente e muito utilizada, ainda é ineficaz com relação em alguns tipos de tumores devido apresentar insensibilidade frente a algumas linhagens celulares cancerosas e também devido a não seletividade de células de tumor. Sendo assim, torna-se necessária a busca por novas estratégias, com a utilização de novos fármacos, ou melhoria dos já existentes, e vias que venham colaborar tanto com a eficácia do tratamento, quanto com o bem-estar do paciente com câncer. Uma estratégia terapêutica que vem crescendo e se mostrando promissora na terapia contra câncer é a chamada “terapia de oxidação”. Essa estratégia utiliza agentes pró-oxidantes, que são capazes de oxidar moléculas-alvo, como indutores a apoptose em células cancerígenas. A busca por substâncias naturais que apresentem tal propriedade é cada vez mais crescente (ZERAİK et al., 2014; HE et al., 2015; LEÓN-GONZÁLEZ, AUGER, SCHINI-KERTH, 2015; ONG et al., 2015).

É bem estabelecido que células cancerígenas apresentam níveis intrínsecos de EROs maiores do que as células normais e que esses níveis, apesar de elevados, não são letais. Nessas concentrações, as EROs acabam atuando como segundo mensageiros responsáveis pela alteração de vias de sinalizações, promovendo assim a sobrevivência de células de tumores. Um fármaco pró-oxidante produz EROs e induz, seletivamente, célula cancerígenas à apoptose, sem causar danos significativos nas células sadias (SZATROWSKI, NATHAN, 1991; HE et al., 2015; LEÓN-GONZÁLEZ, AUGER, SCHINI-KERTH, 2015; YE et al., 2015; ONG et al., 2015).

Isso acontece devido a célula de tumor já possuir esse nível mais elevado de EROs em comparação com as células normais. Esse fato já foi descrito em vários

estudos, *in vitro* e em modelos de câncer, no quais foi verificada a capacidade de produção excessiva de H_2O_2 em linhagens de câncer do tipo melanoma, carcinoma pancreático, de mama e câncer de ovário. Logo, o aumento de EROs, induzido por agentes exógenos utilizados na terapia de oxidação, resulta no estresse oxidativo dessas células tumorais e não em células normais. O aumento exuberante de EROs resultante no estresse oxidativo, seletivo, nas células cancerígenas resulta no comprometimento da defesa intracelular, ocasionando os danos oxidativos, já discutidos nesse trabalho, de biomoléculas como o DNA, que pode atuar como sinalização para apoptose (SZATROWSKII, NATHAN, 1991; GIBELLINI et al., 2011; HE et al., 2015; LEÓN-GONZÁLEZ, AUGER, SCHINI-KERTH, 2015; ONG et al., 2015).

As células normais são pouco afetadas porque o aumento de EROs induzida pelos agentes exógenos pode ser contrabalanceado pelos agentes antioxidantes intracelular, pois diferentemente das células cancerígenas, os níveis de EROs estão controlados. Desse modo, é possível afirmar que as células de tumor se tornam mais vulneráveis e seletivas ao tratamento com pró-oxidantes e devido a esse fato, essa técnica tem sido relatada como um método quimioterápico eficaz (HE et al., 2015; LEÓN-GONZÁLEZ, AUGER, SCHINI-KERTH, 2015; ONG et al., 2015).

A importância das EROs no desencadeamento a apoptose em diferentes células tumorais já foi demonstrada em vários trabalhos. Diferentes componentes naturais, como o resveratrol, curcumina, *shikonin*, polifenóis e quinonas, mostraram-se capazes de eliminar, seletivamente, células tumorais através da produção de EROs e induzir tais células à apoptose (LOPEZ-LAZARO 2007; LEE, HUANG, SHYUR, 2013; LEÓN-GONZÁLEZ, AUGER, SCHINI-KERTH, 2015; HE et al., 2015; ONG et al., 2015).

Além de serem testados na forma isolada, esses compostos naturais vêm se demonstrando capazes de agir sinergicamente com agentes quimioterápicos utilizados clinicamente, melhorando sua ação, diminuindo a dosagem e consequentemente efeitos secundários e atuando como quimiossensibilizador de tumores frente a esses agentes (HE et al., 2015).

O *shikonin*, por exemplo, é um composto natural extraído de raízes de plantas chinesas. Estudos recentes revelaram que essa molécula atua contra células cancerígenas tanto isoladamente, quanto sinergicamente com a cisplatina

aumentando sua eficácia e seletividade entre células tumorais e normais. A combinação do shikonin e cisplatina foi capaz de induzir nas células mutantes a um estresse oxidativo intracelular que resultou em danos no DNA seguida pela ativação da apoptose via mitocondrial. Somado a esses resultados promissores, também foi verificado que ação sinérgica desses compostos, frente a xenoinxerto de tumor de colorretal HCT116 em ratos, inibiu de forma eficaz o crescimento de tumores sólidos (CHEN et al., 2002; DUAN et al., 2014; HE et al., 2015).

Estudos semelhantes foram realizados por Lopez-Lazaro et al (2011) e Chang et al (2014). Nesses estudos, os autores verificaram que o ácido ascórbico, em alta dosagem, é capaz de eliminar, seletivamente, várias linhagens de células de câncer via geração de H_2O_2 além de reduzir diferentes tumores xenoinxertados em ratos, não apresentando toxicidade para os tecidos comuns. Os autores ainda verificaram que a ação dessas substâncias contra células normais é desprezível.

Ong et al (2015) verificaram que a quinona 2-metoxi-1,4-naftoquinona (MNQ) demonstrou-se citotóxica contra células de adenocarcinoma de pulmão A549 e que o mecanismo de ação dessa molécula é devido estimulação de vias de sinalização a apoptose que são ativadas pelo estresse oxidativo. Estudos prévios a este, demonstraram que a MNQ apresenta citotoxicidade frente a uma série de outras linhagens de câncer.

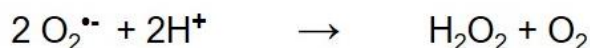
Conforme é possível observar, a estratégia da terapia de oxidação é crescente e promissora no tratamento de tumores. Uma série de compostos naturais vem se demonstrando citotóxicos seletivos a tumores, tornando a busca, estudos e ensaios clínicos com agentes pró-oxidantes naturais crescente devido ser uma alternativa promissora no avanço do combate ao câncer. Dentre esses compostos naturais que apresentam atividade citotóxica para células cancerígenas destacam-se os flavonóides. Diversas pesquisas caracterizam vários representantes pertencente a essa classe de polifenóis como fortes candidatos quimioterápicos (MATSUI et al., 2005; GRANADO-SERRADDO et al., 2006; ZHAO et al., 2013; LEÓN-GONZÁLEZ, AUGER, SCHINI-KERTH, 2015; SRIVASTAVA et al., 2016) e como será discutido e defendido nos próximos capítulos, a atividade pró-oxidante apresentada por tais representantes parece ter papel fundamental e relevante nesse processo.

6.1 ATIVIDADE PRÓ-OXIDANTE DA QUERCETINA

Moléculas pró-oxidante são aquelas capazes de oxidar moléculas-alvo, como as biomoléculas do sistema biológico, resultando em um desequilíbrio redox. O efeito pró-oxidante pode estar diretamente ou indiretamente relacionado com a geração de EROs e também com a inibição ou comprometimento do sistema antioxidante protetor endógeno. Como o nome indica, os efeitos antioxidante e pró-oxidante são o oposto um do outro, porém é importante ressaltar que este último não está necessariamente relacionado a patologias e efeitos deletérios (CERQUEIRA, MEDEIROS, AUGUSTO, 2007; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007; ZERAIK et al., 2014).

Evidências experimentais vem demonstrando que os polifenóis apresentam atividade pro-oxidante e ela está, geralmente, relacionada com a geração de EROs, principalmente na forma de H_2O_2 , $\text{LOO}^\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{OH}^\cdot$. Os mecanismos de produção dessas espécies envolve a oxidação direta dos polifenóis pelo oxigênio molecular e a capacidade desses compostos fenólicos em reduzir o $\text{Fe(III)} / \text{Cu(II)}$ à $\text{Fe(II)} / \text{Cu(I)}$, se auto-oxidando e formando as EROs (MIURA et al., 1998; KESSLER, UBEAUD, JUNG, 2003; CHOI, CHEE, LEE, 2003; WATJEN et al., 2005; LÓPEZ-LÁZARO, 2007; CERQUEIRA, MEDEIROS, AUGUSTO, 2007; LÓPEZ-LÁZARO et al., 2011; ZERAIK et al., 2014; LEÓN-GONZÁLEZ et al., 2015). A Figura 18 esquematiza essas reações pró-oxidantes dos flavonoides.

A distinção entre os efeitos antioxidantes e pró-oxidantes pode estar relacionada com a estabilidade e reatividade dos radicais livres fenóxila gerados durante a oxidação dos polifenóis, conforme é possível observar na primeira reação da Figura 17, caso a oxidação do polifenol resulte na formação de intermediários instáveis que possam reagir e gerar produtos nocivos, considera-se que tal substância apresenta atividade pró-oxidante (ZERAIK et al., 2014).

Figura 18. Geração de EROs a partir de polifenóis.

Ph – OH = polifenóis

As duas primeiras reações correspondem a formação do radical ânion superóxido e peróxido de hidrogênio e as últimas correspondem a geração do radical hidroxil. Fonte: Adaptado de ZERAIK et al., 2014.

Os flavonóides são popularmente conhecidos pela sua atividade antioxidante acentuada frente espécies reativas de oxigênio e outros radicais. Porém, sua atividade pró-oxidante vem despertando grande interesse científico e clínico devido ao fato de estar relacionada com o efeito citotóxico seletivo desses polifenóis frente a diferentes linhagens de células tumorais (UEDA et al., 2001; CHENG et al., 2004; LU et al., 2007; CHENG et al., 2008; CHENG et al., 2010; GIBELLINI et al., 2011; BISHAYEE et al., 2012). A determinação da atividade exercida pelo flavonóide, ou seja, antioxidante ou pró-oxidante, dependerá de um conjunto de fatores como a concentração do flavonóide, as características estruturais desse polifenol, o meio reacional e o íon do metal de transição ao qual irá interagir (KESSLER, UBEAUD, JUNG, 2003; YANG et al., 2011).

A quercetina é muito conhecida por suas propriedades antioxidantes, mas nas últimas décadas sua ação pró-oxidante vem sendo relatada em uma série de estudos, *in vivo* e *in vitro* (MATSUI et al., 2005; GRANADO-SERRADDO et al., 2006; ZHAO et al., 2013; LEÓN-GONZÁLEZ, AUGER, ROHITKUMAR et al., 2015; SRIVASTAVA et al., 2016) e essa propriedade, segundo a hipótese desse trabalho, está intimamente relacionada com sua atividade anticancerígena.

A ação pró-oxidante da quercetina foi verificada em ratos machos Sprague-Dawley. Nesse trabalho foi realizada a avaliação dos efeitos da administração crônica de quercetina na concentração de glutathione presente no fígado desses roedores (CHOI, CHEE, LEE, 2003). Os autores verificaram que o flavonóide contribuiu com a diminuição da concentração da glutathione redutase (de 34% a 40%) no fígado dos roedores analisados. Sabe-se que a diminuição da concentração da glutathione redutase compromete o mecanismo de defesa antioxidante do organismo, esse fato evidencia tal atividade da quercetina. Estudos prévios a estes também mostraram resultados parecidos.

Sahu e Gray (1996) observaram que a quercetina, e também a miricetina, foram capazes de diminuir a concentração de glutathione em fígados isolados de ratos. Ramos e Aller (2008) desmostraram que a quercetina atuou sinergicamente com trióxido de arsênio (ATO), uma droga antitumoral, e induziu células de leucemia humana à apoptose via diminuição dos níveis de GSH.

O mecanismo pela qual a concentração da glutathione diminui em resposta a quercetina ainda não é totalmente claro, porém sugere-se que a formação de seus metabolitos, do tipo quinona e semiquinona, colabore para esse fato. Esses radicais intermediários formados a partir da oxidação da quercetina são extremamente reativos com grupos tióis. O GSH possui tais grupos e por fazer parte do sistema antioxidante endógeno, reagiria com a quercetina e atuaria na remoção desses metabolitos resultando na diminuição de sua concentração (MONKS, LAU, 1998; AWAD et al., 2001, BOERSMA et al., 2000 apud CHOI, CHEE, LEE, 2003; GIBELLINI et al., 2011).

Além desses estudos a atividade pró-oxidante da quercetina também foi verificada por Yang et al (2011). Esses autores avaliaram a atividade pró-oxidante da quercetina, e de outros compostos fenólicos como a rutina e o ácido ferúlico, no sistema NADPH/peroxidase e verificaram a clivagem do DNA por parte dessas substâncias. Todos os compostos analisados nesse trabalho apresentaram atividade pró-oxidante frente ao sistema NADPH/peroxidase e esse comportamento ocorreu, segundo os autores, devido a capacidade oxidante dos radicais livres gerados.

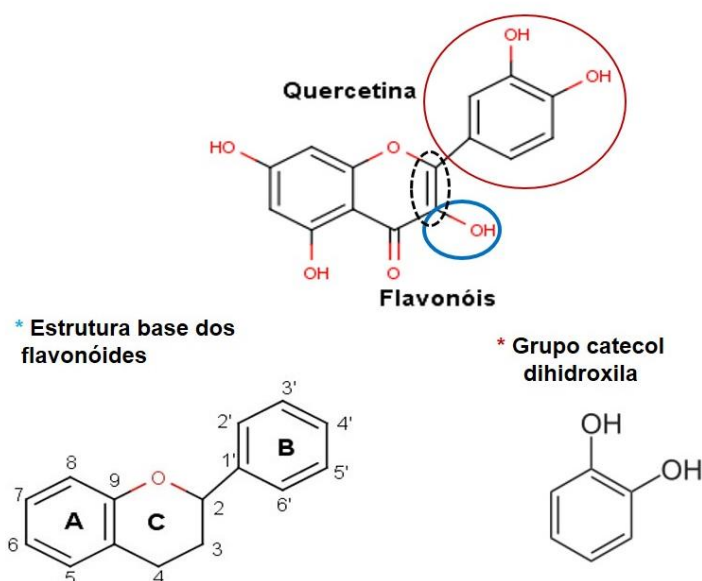
Com relação aos danos ao DNA, Yang et al (2011) mostraram que a quercetina provocou efeitos destrutivos nessa biomolécula e em concordância com os resultados apresentados por Hsu e Li (2002), verificaram que a concentração é um parâmetro

influenciador ao dano ao DNA. A utilização da quercetina na concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ aumentou significativamente o nível das lesões ao DNA, enquanto que os danos na concentração de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ equivalia a metade.

Características estruturais também foram investigadas no trabalho de Yang et al (2011), foi observado que os compostos fenólicos que não possuíam substituições -OH na posição 3 não mostraram atividade antioxidante e nem pró-oxidante, evidenciando que as características estruturais parecem desempenhar papel importante com relação ao comportamento dos flavonóides. Em concordância com essa observação, KESSLER, UBEAUD e JUNG (2003) propuseram que o grupo hidroxila livre na posição 3 e ligação dupla $C_2 = C_3$ favorece o comportamento pró-oxidante dos compostos fenólicos, pois permitem a auto-oxidação do flavonoide e a propagação de reações em cadeia.

Tem sido sugerido que a presença da configuração catecol no anel B também favorece a geração do radical ânion superóxido e peróxido de hidrogênio pelos flavonoides através da reação de Fenton devido sua auto-oxidação, a Figura 19 evidencia as configurações estruturais relacionadas a atividade pró-oxidante dos flavonóides e mostra que a quercetina apresenta tais características estruturais.

Figura 19. Destaque das configurações estruturais responsáveis pela atividade pró-oxidante dos flavonóides.



Miurda et al (1998) defende que a presença do grupo piragolol também favorece a atividade pró-oxidante dos flavonoides. Fonte: Autor, 2017.

A produção de EROs pela quercetina, além de outros flavonoides como a miricetina e baicaleína (MIURA et al, 1998; UEDA et al., 2001), através da reação de Fenton em pH fisiológico, 7,4, foi demonstrada por diversos pesquisadores (KESSLER, UBEAUD, JUNG, 2003; TRUEBA, 2003; ZHENG et al., 2006; AZMI, SARKAR, HADI, 2013). O mecanismo reacional já foi apresentado na Figura 18.

Muitos pesquisadores verificaram que a quercetina pode também reagir com Cu (II) e que a presença desse íon exposto na cromatina de DNA foi responsável pela ruptura dessa biomolécula pelo flavonóide. Esse mecanismo de ação não foi verificado apenas para a quercetina, mas também para a rutina, apigenina, miricetina, baicaleína, resveratrol, luteolina, campferol dentre outros compostos fenólicos. Análises detalhadas de fragmentos obtidos do gene p53 revelaram que a quercetina induziu danos oxidativos ao DNA na presença desse íon e que houve ataque aos resíduos de timina e citosina (RAHMAN et al., 1989; TRUEBA, 2003, ZHENG et al., 2006).

Essa capacidade dos compostos fenólicos em reagir com DNA na presença de Cu pode ser responsável pela indução de células tumorais a apoptose. Estudos

realizados por Azmi, Sarkar e Hadi (2013) em tumores sólidos revelaram uma dependência preferencial de células tumorais por glicose, o que conduz a uma diminuição do pH nessas células. A diminuição do pH interfere na estrutura do DNA resultando na exposição do Cu (II) ligado a cromatina, que estava antes escondido. Uma vez exposto, ele se torna mais propenso ao ataque pelo resveratrol, resultando nos danos oxidativos a molécula de DNA, que por sua vez, pode sinalizar para apoptose (SHAMIM et al., 2012). Existe essa seletividade do resveratrol por células cancerígenas devido o pH fisiológico das células normais não sofrer alterações, mantendo a integridade do DNA normal.

As células cancerosas apresentam aumento da atividade metabólica, em comparação com células normais, requerendo níveis mais elevados de energia, aminoácidos, nucleotídeos e lipídeos para manutenção da elevada taxa de crescimento e proliferação celular. Nessas condições e com a finalidade de assegurar a sobrevivência de células tumorais, ocorre uma alteração no metabolismo celular afim de promover a glicólise e aumentar a fosforilação oxidativa. O processo de glicólise é capaz de produzir ATP em uma taxa maior do que a fosforilação oxidativa, porém o rendimento energético é menor. Tal fato poderia explicar a vantagem seletiva das células tumorais pelos recursos energéticos, como a glicose, que resulta na alteração do pH intracelular e suas consequências. Nas células sadias a principal fonte de geração de ATP é através do ciclo do ácido cítrico (PFEIFFER, SCHUSTER, BONHOEFFER, 2001; TENNANT et al., 2009 apud GIBELLINI et al., 2011; CAMPBEEL, FARREL, 2011).

Somado a essa exposição de Cu devido à alteração de pH, as células cancerígenas apresentam níveis de metais de transição mais elevado do que células normais devido, dentre outros fatores, a superexpressão de receptor de transferrina e transportador de cobre (I) na maioria dessas células (HADI et al., 2007 apud LEÓNZ-GONZALEZ, 2015).

Essas evidências mostradas nesse capítulo são bases fundamentais e motivadoras para o desenvolvimento de novos estudos e pesquisas envolvendo a relação entre atividade pró-oxidante dos compostos naturais, como os flavonóides, e sua atividade anticancerígena eficiente e seletiva. Fica evidente também, com base no que foi exposto até o momento, que os flavonóides apresentam atividade pró-

oxidante e essa propriedade pode apresentar alguns efeitos benéficos para o organismo uma vez que tal propriedade vem sendo defendida, por muitos autores e inclusive nós, como sendo um mecanismo importante para a indução seletiva e eficaz de células tumorais a apoptose.

7 QUERCETINA COMO UM FÁRMACO PROMISSOR NO TRATAMENTO DE TUMORES

Com base no que foi apresentado até o momento os flavonóides, muito conhecidos por sua atividade antioxidante, dependendo das condições do meio podem desempenhar um papel pró-oxidante que não necessariamente pode ser ruim e prejudicial ao organismo humano. Aqui será defendido o papel dessa atividade pró-oxidante da quercetina, o principal flavonóide encontrado na dieta humana, na indução seletiva de diferentes linhagens de células de tumor à apoptose, processo que envolve o aumento dos níveis de EROs ou modulação de enzimas antioxidantes e ocorre através da via mitocondrial e ativação das caspases.

A participação da via mitocondrial na morte de células tumorais, através da apoptose, é considerada a principal estratégia quimioterápica e envolve a busca por fármacos que possam promover a regulação das proteínas da família Bcl-2. Tal processo envolve a diminuição da transição da permeabilidade mitocondrial com diminuição, não drástica, da concentração de ATP e liberação de citocromo c e outras proteínas pró-apoptóticas da mitocôndria para o citosol. Em seguida ocorre a ativação da via das caspases culminando na morte da célula cancerígena. Esse processo também é acompanhado pela dissipação do potencial da membrana (MATSUI et al., 2005).

Os flavonóides possuem a capacidade de interagir com a membrana mitocondrial, através de sua dissolução na parte hidrofóbica da mesma, modulando sua fluidez. Estudos realizados por Dorta (2007) nas mitocôndrias isoladas de fígado de ratos revelaram que a quercetina, além de outros flavonoides, foi capaz de diminuir a fluidez da membrana e inibir a cadeia respiratória. A interação de flavonóides com a membrana mitocondrial pode propiciar a produção excessiva de EROs por essa organela que pode resultar em modificações a molécula de DNA (SALVI et al., 2002).

Alterações conformacionais na molécula de DNA também pode ser resultante da intercalação de suas bases, porém independente da via promotora, essas alterações afetam sua função de reparação, replicação entre outras. Esses danos podem resultar em estímulos que induzem a apoptose. A intercalação de DNA é uma das vias de atuação de diversos fármacos antitumorais, uma variedade de artigos tem demonstrado que a quercetina, além de outros flavonóides, é capaz de provocar tais

intercalações, que podem estar relacionada com a indução de células tumorais à apoptose (BISHAYEE et al., 2013; SRIVASTAVA et al., 2016).

Com base nessas informações e todas aquelas já apresentadas nesse trabalho, serão apresentados alguns artigos que mostram a atividade anticancerígena da quercetina, na forma isolada ou combinada, frente a várias linhagens de células tumorais, como células leucêmicas, hepatoma humano, câncer do cólon de útero, câncer de mama, câncer de estômago e câncer de tireoide, com a finalidade de apresentar a quercetina como um promissor fármaco no tratamento de tumores e evidenciando o papel relevante, porém não exclusivo, da sua atividade pró-oxidante no processo de indução a morte celular.

7.1 AÇÃO DA QUERCETINA SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS LEUCÊMICAS

Segundo o INCA, a leucemia é uma doença classificada como maligna dos leucócitos (glóbulos brancos) que possui como principal característica o acúmulo de células jovens anormais na medula óssea que acabam substituindo as células normais do sangue. A estimativa, segundo esse instituto, de novos casos para o ano de 2016 foi de 10.070 novos casos, sendo os homens (5.540) os mais afetados.

A leucemia mielóide aguda é considerada o tipo mais comum de leucemia e um dos tipos de tumores mais agressivos e que apresenta uma das menores taxas de sobrevivência dentre os pacientes. O tratamento atual contra esse tipo de tumor se baseia em quimioterapia, radioterapia, imunoterapia dentre outras técnicas, porém a busca por fármacos de origem natural vem crescendo muito devido à alta seletividade e eficiência apresentada por essas substâncias associada com sua baixa toxicidade às células sadias. Esse fato motiva a busca por fármacos capazes de atuarem contra essas células tumorais, além de aumentar e melhorar a qualidade de vida do paciente (RATES, 2001; LEE et al., 2014).

Matsui et al (2005) avaliaram a atividade da quercetina, nas concentrações de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$, frente várias linhagens de células leucêmicas, BV-173, KU-812, linfoma L-937 e leucemia monocítica aguda THP. Todas as células testadas apresentaram sensibilidade a apoptose induzida pelo flavonóide. Os autores verificaram que a quercetina induziu a morte celular programada nas linhagens estudadas acompanhada da ruptura e queda do potencial de membrana mitocondrial,

ativação da caspase-3 e também caspase-9 sendo essas evidências experimentais um indicativo da morte pela via mitocondrial.

A quercetina também se demonstrou eficiente na inibição do crescimento e indução a apoptose em células de leucemia aguda, HL-60 nos estudos realizados por vários autores (WANG, LIN-SHAU, LIN, 2001; SAKAO, FUJI, HOU, 2009; NIU et al., 2011; LEE et al., 2013; SRIVASTAVA et al., 2016).

Niu et al (2011) realizaram a incubação de células HL-60 com a quercetina de $12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ até $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ por um período de 48 horas, nesse estudo foi verificado a dependência da concentração para realização de tal processo de morte celular. O IC_{50} , ou seja, a concentração na qual houve 50% de inibição da proliferação celular, foi de $61,11 \mu\text{mol.L}^{-1}$. As características morfológicas típicas de apoptose, como células irregulares e encolhidas, citoplasma contendo bolhas ocas, conteúdos celulares liberados e condensação do núcleo, foram encontradas, confirmando a morte celular por essa via.

Semelhantemente aos resultados de Matsui et al (2005), Niu et al (2011) verificaram a ativação das caspase-3 e -9 e evidências complementares, como a diminuição na proteína Bcl-2 e aumento na expressão de Bax, serviram como reforço para a comprovação da instalação da via mitocondrial. Sakao, Fuji e Hou (2009) ao tratar células de HL-60 com a quercetina nas concentrações de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ por um período de 48 horas também verificaram a capacidade de inibição da proliferação celular com um valor de IC_{50} equivalente a $58 \mu\text{mol.L}^{-1}$, que é próximo ao encontrado por Niu et al (2011).

A apoptose foi acompanhada pela fragmentação do DNA, após 8 horas de tratamento com quercetina na concentração de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$, ativação da caspase-3 e clivagem da poli (ADP-ribose) polimerase, PARP, que responde a quebra na cadeia de DNA. A PARP corresponde a uma família de proteínas envolvidas em processos de reparo do DNA e programa de morte celular. O tratamento das células com a quercetina resultou num aumento intracelular de $\text{O}_2^{\cdot-}$ que pode ser responsável pela indução das células a apoptose (SAKAO, FUJI, HOU 2009). WANG, LIN-SHAU, LIN (2001) reforçam essa hipótese, ao observarem que a apigenina, miricetina e

caempferol também foram capazes de gerar $O_2^{\cdot-}$ e induzir células de HL-60 a apoptose.

Lee et al (2013) também verificaram um aumento no nível de EROs induzida pela quercetina em diferentes células leucêmicas. As linhagens de leucemia aguda mióctica testadas foram THP-1, U937, HL-60 E MV4-11. A concentração de quercetina utilizada durante o tratamento celular variou de 0-100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ por um período de 6 a 24 horas. Todas as células testadas apresentaram sensibilidade a apoptose induzida pela quercetina que ocorreu de maneira dependente da dose e da ativação das caspases-9, caspase-8 e por fim caspase-3. Houve uma inibição significativa do crescimento do tumor HL-60, previamente xenoenxertado em ratos, acompanhado do aumento dos níveis de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ intracelular com posterior indução à apoptose (LEE et al., 2013). Esse fato evidencia o papel do estresse oxidativo induzido pela quercetina como via de sinalização para a apoptose defendido por nós.

A morte celular foi acompanhada do aumento das proteínas proapoptóticas Bax e Bak e decréscimo das proteínas Bcl-xl nas células de HL-60 após o tratamento com 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Em concordância com esses resultados, Srivastava et al (2016) verificaram que a quercetina, nas concentrações de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ a 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, foi capaz de induzir outras linhagens de células leucêmicas, CEM, K562 e Nalm 6, a apoptose após 48 horas de tratamento.

Dentre as linhagens estudadas, a Nalm 6 exibiu sensibilidade máxima a quercetina apresentando redução da viabilidade celular na concentração mais baixa utilizada (10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) com IC_{50} de 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Os valores de IC_{50} para K562 e CEM foram 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 55 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. As características morfológicas encontradas por Matsui et al (2005) também foram encontradas nesse trabalho e para complementar as evidências de que a morte celular ocorreu pela apoptose, os autores verificaram um aumento da proteína pró-apoptótica Bax, ativação de caspase-3 e caspase-9, aumento da p53 e diminuição de BCL-2, uma proteína antiapoptótica (SRIVASTAVA et al., 2016).

Mais um resultado complementar foi apresentado pelos autores, eles verificaram que a quercetina foi responsável pela intercalação do DNA, ou seja, ela foi capaz de provocar modificações na estrutura do DNA e como discutido nos tópicos

anteriores desse trabalho, tais modificações podem atuar como sinalização da apoptose. Somado a isso, é importante ressaltar que danos ao DNA são resultantes da atividade pró-oxidante da quercetina, reforçando mais uma vez nossa hipótese.

Conforme foi possível observar várias linhagens de células leucêmicas foram testadas com a quercetina e todas apresentaram sensibilidade a apoptose desempenhada pelo flavonoide, evidenciando que se trata de um fármaco promissor no tratamento de leucemia. Os níveis elevados de EROs apresentados por vários trabalhos reforçam a hipótese defendida nesse trabalho de que a atividade pró-oxidante da quercetina também desempenha um papel importante na indução da apoptose em células de leucemia.

7.2 AÇÃO DA QUERCETINA SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA

O hepatocarcinoma, também conhecido como câncer de fígado, é um tipo de câncer de grande incidência no sudeste da Ásia, África do Sul e no Japão e ocorre com maior incidência nos homens do que em mulheres. Esse tipo de tumor é geralmente muito difícil de detecção precoce, o que resulta num elevado índice de morte de pacientes portadores de tal tumor. O número de mortes confirmadas no ano de 2013, segundo o INCA, foi de 8.772 mortes, desse total 5.012 eram homens e 3.759 mulheres. Logo a busca por quimioterápicos eficientes frente a esse tipo de câncer torna-se extremamente importante e necessária. A quercetina foi testada em células de HepG2 humano e também de fígados de ratos, em ambas linhagens celulares ela vem demonstrando resultados interessantes e promissores (ROBERTS, GORES 2005; GRANADO-SERRANO et al., 2006; INCA 2016).

Estudos sobre a investigação do efeito da quercetina frente células de HepG2 humano realizados por Granado-Serrano et al (2006) relevaram que essa linhagem celular é sensível a indução a apoptose pela quercetina. As células de HepG2 humano foram incubadas com o flavonóide em diferentes concentrações, de 10 a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com IC_{50} equivalente a 87 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, e tempo de teste total foi de 18 horas. O processo apoptótico foi confirmado devido as evidências experimentais observadas: houve a ativação das caspase-9 e caspase-3 acompanhada da regulação negativa das proteínas antiapoptóticas Bcl-xl e Bcl-xS simultânea com a regulação positiva e

translocação para a membrana mitocondrial da proteína pró-apoptótica Bax, ou seja, a via mitocondrial foi ativada pela quercetina.

Os autores verificaram que a quercetina, nas concentrações de 10-75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, reforçou a geração de EROs após 4 horas de tratamento, porém na concentração máxima não houve nenhum efeito sobre esse processo. Foi verificado, também, que após um período de 18 horas de tratamento a concentração dessas espécies intracelular diminui de maneira dependente da dose (GRANADO-SERRANO et al., 2006).

Os danos celulares causados pela quercetina nas células de hepatoma humano foram observados a partir da liberação da desidrogenase de lactato intracelular, LDH, um indicador citotóxico, para o meio de cultura (Granado-Serrano, 2006). Em concordância com esses resultados, Dorta (2007) avaliou a ação da quercetina, de 20 a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, sobre a viabilidade da indução à apoptose em células HepG2 de ratos.

Novamente a quercetina foi capaz de induzir as células de HepG2 a morte programa celular e também foi capaz de inibir a proliferação celular após um período de 48 e 24 horas, respectivamente, de encubação com a concentração igual a 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. O processo de morte celular foi acompanhado pela diminuição da capacidade energética celular e ativação das caspase-9 e caspase-3, dando indicativos, mais uma vez, de morte pela via mitocondrial (DORTA, 2007).

Segundo Brookes (2005) a inibição da cadeia respiratória pode aumentar a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ mitocondrial, Dorta (2007) verificou que a quercetina foi capaz de causar uma inibição substancial da respiração mitocondrial devido a sua capacidade de reagir com a parte hidrofóbica da membrana. Esse fato evidencia mais uma vez a atividade pró-oxidante da quercetina frente células HepG2 e relaciona a produção de EROs como via de sinalização para morte via mitocondrial.

Apesar de Dorta (2007) propor que essas espécies reativas tenham sido sequestradas pela quercetina assim que formadas, ou seja, que o efeito antioxidante apresentado por ela tenha se sobreposto ao efeito pró-oxidante, devemos enfatizar que a concentração poderia ter sido responsável por essa observação. Nesse ensaio a quercetina foi utilizada nas concentrações de 1-50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Conforme explicado, a

atividade pró-oxidante é dependente da concentração sendo necessário verificar a atividade do flavonóide sobre as mitocôndrias em concentrações maiores.

Somado a esses resultados, Zhao et al (2014) verificaram que a quercetina, 0,25-50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, reduziu a proliferação das células HepG2 humano já na concentração de 24 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (IC_{50}). A porcentagem de redução da viabilidade celular variou de 34% até 52% até a concentração de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Novamente o processo de morte por apoptose foi verificado com aumento da permeabilidade da membrana celular e condensação nuclear de maneira dependente da dose utilizada.

Chang, Chi e Wang (2006) também avaliaram a ação da quercetina frente as células de HepG2 e em uma outra linhagem de hepatoma humano, as células HA22T/VGH. Os resultados obtidos pelos autores revelaram que a apoptose induzida pela quercetina nas linhagens de hepatoma analisadas foi acompanhada do aumento dos níveis de H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$, após 72 horas de tratamento com a quercetina na concentração de 80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. A acumulação de $\text{O}_2^{\cdot-}$ é citotóxico para a célula e é caracterizada como indutor a apoptose vários tipos celulares. Os autores também verificarão que a quercetina foi capaz de induzir a peroxidação lipídica nessas células, evidenciando sua atividade pró-oxidante.

Nesse mesmo estudo foi verificada a ação sinérgica da quercetina com o paclitaxel. O paclitaxel é um agente quimioterápico utilizado contra alguns tumores, inclusive hepáticos. Já é bem estabelecido que seu mecanismo de ação envolve o aumento de EROs, como $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 e alteração da permeabilidade mitocôndrial (VARBIRO et al.,2001). Para verificação da influência na atividade desse agente quimioterápico pela quercetina as células HA22T/VGH foram previamente tratadas com o flavonóide, 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 60 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, e em seguida com paclitaxel (100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), por mais 48 horas. Esse experimento revelou que a quercetina aumentou o efeito citotóxico e a indução a apoptose pelo paclitaxel devido à elevação de EROs causada pela quercetina nas células de hepatoma humano durante a apoptose (CHANG, CHI, WANG., 2006).

Esse flavonol também se mostrou capaz de alterar o sistema antioxidante enzimático em células de hepatoma H4IIE em ratos. A concentração de (Mn-SOD), (CuZn-SOD e glutathiona peroxidase diminui após o tratamento das células com a

quercetina em diferentes concentrações, de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ até $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$. A diminuição das enzimas antioxidantes resultam no aumento nos níveis de EROs intracelular que pode causar danos as biomoléculas e atuar como via de sinalização para apoptose (ROHRDANZ et al., 2003).

7.3 AÇÃO DA QUERCETINA SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS DE CÂNCER DO COLO DO ÚTERO HUMANO E CÂNCER DE MAMA

O câncer do colo do útero (HeLa), conhecido também como câncer cervical, é derivado das alterações celulares que podem ocorrer durante a infecção genital persistente pelo vírus Papilomavírus Humano – HPV. Esse tipo de tumor é considerado, segundo dados do INCA, o terceiro dentre a lista dos mais frequentes em mulheres, estando atrás apenas do câncer de mama e do colorretal. No Brasil, estatísticas mostram que dentre as causas de morte feminina por câncer, ele se encontra na quarta posição de vítimas fatais e as estimativas de novos casos para o ano de 2016 foi de 16.340 novos casos (INCA-2016).

O câncer de mama é considerado o tipo de câncer mais comum dentro da população feminina no mundo e no Brasil, depois do câncer de pele, porém não é exclusivo das mulheres. Esse tipo de tumor também acomete homens em casos mais raros e normalmente ocorre acima dos 35 anos. A estimativa de novos casos para o ano de 2016 é de 57.960 novos casos (INCA, 2016). Diante desses dados e números crescentes fica evidente a motivação da busca por novos fármacos e tratamentos que sejam capazes de reverter ou retardar o câncer e a relevância desse trabalho em mostrar nos flavonoides uma possível alternativa para atingir tal objetivo.

O efeito da quercetina sobre a viabilidade celular em células de HeLa foi estudada por Priyadarsini et al (2010). Nesses estudos foi utilizada a quercetina nas concentrações de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ com um valor de IC_{50} igual a $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Os resultados obtidos por esses autores mostraram que a quercetina diminui significativamente a sobrevivência celular de modo dependente da dose utilizada e induziu, consideravelmente, as células tumorais a apoptose sem afetar as células saudáveis. Foi observado um aumento significativo na expressão da proteína p53 acompanhada da regulação positiva das proteínas pró-apoptóticas e regulação negativa das anti-apoptóticas da família Bcl-2. Foi verificada a liberação de citocromo

c e apaf-1, além da ativação das caspases-3 e caspase-9. Essas evidências experimentais somada com as características morfológicas como externalização de fosfatidilserina, despolarização da membrana mitocondrial, encolhimento celular, condensação cromossômica, fragmentação nuclear, foram importantes para determinação de morte via mitocondrial.

Resultados semelhantes foram obtidos por Bishayee et al (2013) ao verificarem que a quercetina foi capaz de provocar mudanças conformacionais na molécula de DNA de células de HeLa, acompanhada de liberação de citocromo-c, despolarização da membrana mitocondrial, superexpressão de p53, ativação da caspase-3, e um aumento de espécies reativas de oxigênio no meio de cultura. Essas evidências destacam o importante papel da ação pró-oxidante desse flavonóide na sua atividade antitumoral.

Srivastava et al (2016) induziram um câncer de mama em camundongos albinos Swiss para que a ação da quercetina no tumor sólido fosse verificada. Após 12 dias da indução de um adenocarcinoma de mama, o tumor já passou a ser visível e iniciou-se o tratamento. Passados 10 dias de tratamento os autores já observaram uma redução no volume do tumor, em comparação com os ratos não tratados. Além disso, foi verificado um aumento da sobrevivência das espécies tratadas com o flavonóide em aproximadamente 5 vezes quando comparada com os ratos controles. A apoptose se instalou com aumento no nível de p53 e redução das proteínas Bcl-2 e Bcl-xL concomitante com aumento de Bax. Houve liberação do citocromo c, ativação das caspase-3 e caspase-9 e fragmentação de DNA. Com relação ao DNA, os autores verificaram que a quercetina pode ser capaz de intercalar as bases dessa biomolécula, sendo responsável pelas alterações morfológicas que culminaram em dano (SRIVASTAVA et al., 2016).

Outras linhagens celulares de câncer de mama, T47D e EAC, foram tratadas com quercetina nas concentrações de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ por um período de 48 horas e as características apoptóticas semelhantes à de Priyadarsini et al (2010) foram observadas.

7.4 AÇÃO DA QUERCETINA SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS DE CARCINOMA GÁSTRICO E CÂNCER DE TIROIDE

Os tumores do estômago é um tipo de câncer que ocorre, em sua maioria, nos homens na faixa de 70 anos chegando ao terceiro lugar de maior incidência de cânceres no homem e quinto entre a população feminina no país. O maior número de casos desse tipo de tumor ocorre no Japão com a estimativa de 780 doentes para cada 100.000 habitantes. A estimativa de novos casos para o ano de 2016 foi de 20.520, sendo 12.920 homens e 7.600 mulheres (INCA, 2016).

A quercetina também se mostrou capaz de induzir células de carcinoma gástrico BGC-823 a apoptose. As células passaram pelo tratamento com a quercetina, nas concentrações de $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ até $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$, por um período de 72 horas. As características morfológicas típicas da apoptose, como condensação da cromatina e do núcleo e formação dos corpos apoptóticos, foram observadas. As células maiores de tumor, que existiam antes do tratamento, diminuíram de tamanho e algumas desapareceram. Foi observada a diminuição de Bcl-2 e aumento em Bax além da ativação da caspase-3 (WANG et al., 2012).

Borska et al (2012) avaliaram o efeito sinérgico da quercetina com um agente quimioterápico, daunorrubicina, em linhagens celulares, EPG85-257P e EPG85257RDB. De carcinoma gástrico humano. A linhagem EPG85257RDB é extremamente resistente ao fármaco daunorrubicina, sendo assim o objetivo desse estudo foi verificar se a quercetina conseguia sensibilizar tal células frente a esse quimioterápico afim de melhorar o tratamento. O mecanismo de ação desse fármaco ainda não é completamente compreendido, acredita-se que ele iniba a síntese de DNA e RNA DNA-dependente devido a formação de um complexo com essa biomolécula via intercalação entre os pares de sua base nitrogenada e produção de espécies reativas de oxigênio.

A combinação da quercetina com esse agente sensibilizou as células-RDB ($\text{IC}_{50} = [\text{Q}] = 12 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $[\text{D}] = 0,43 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e levou a morte celular por apoptose com uma redução da dose utilizada do fármaco promovendo assim a diminuição de seus efeitos colaterais.

O flavonóide, nas concentrações de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$, também proporcionou um decréscimo na proliferação celular e aumento na taxa de apoptose em células de carcinoma da tireoide papilar, B-CPAP após o período de incubação de 72 horas. Foi observada a ativação da caspase-3, principalmente nas concentrações de 50 a $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$. A apoptose foi confirmada devido a presença de formação de bolhas de superfície celular e formação de corpos apoptóticos ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e fragmentação do DNA.

Com relação aos efeitos da quercetina sobre essas linhagens celulares ainda há poucos estudos, sendo necessário maiores investigações, inclusive dos mecanismos de ação do fármaco sobre essas células. Porém, devido as evidencias experimentais semelhantes a aquelas obtidas no tratamento de células de outros tipos de câncer, leucemia, hepatoma, câncer de mama dentre outros, sugerimos que as EROs também possam desempenhar um papel relevante na apoptose de carcinomas gástricos e câncer de tireoide.

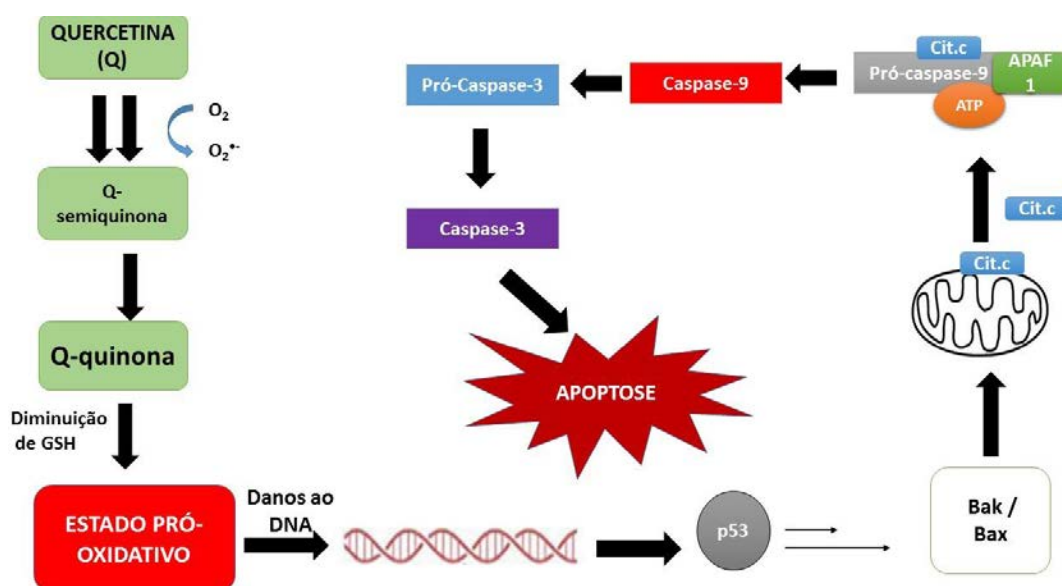
De acordo com todas essas evidencias apresentadas, a quercetina demonstrou-se capaz de exercer atividades antitumorais contra diferentes tipos de células de cânceres em concentrações relativamente baixas, induzindo a apoptose a partir de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Nessas concentrações os danos desse polifenol nas células sadias foi considerado insignificante, ressaltando que o fármaco possui citotoxicidade seletiva a células cancerígenas que, segundo nossa hipótese, pode estar relacionada com seu efeito pró-oxidante, evidenciamos assim que tal atividade possui papel relevante, não exclusivo, na capacidade antitumoral desempenhada por esse flavonoide, inclusive até maior do que sua ação antioxidante.

O mecanismo de ação da quercetina, segundo os dados apresentados, envolve a via mitocondrial que é acompanhada da perda do potencial de membrana, regulação de proteínas da família Bcl-2, liberação do citocromo c para o citosol e ativação da via das caspases. Conforme citado nesse trabalho, a concentração é um dos fatores que determina a ação pró ou antioxidante desempenhada pelos flavonoides, e com base no que foi demonstrado nos artigos, o tratamento de células com concentrações superiores a $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ parece favorecer a atividade pró-oxidante da quercetina. A hipótese de que a ação pró está relacionada com sua atividade antitumoral é reforçada pelo mecanismo de ação de fármacos da terapia oxidante citada anteriormente.

Esse fato explicaria a seletividade apresentada por ela nas células cancerígenas devido ao fato de promover o aumento de EROs, pela propagação reacional dos intermediários reativos semi-quinona e/ou quinona, ou pela alteração nos níveis de enzimas antioxidantes intracelulares naturais. Esse aumento pode resultar num estresse oxidativo seletivo nessas células tumorais, culminando nos danos a biomoléculas, como o DNA, que por sua vez atuaria como um sinalizador para ativação de p53 e na sequência de algumas etapas na ativação da via mitocondrial, resultando na cascata das caspases. Lembramos que esse mecanismo já foi apresentado e explicado na Figura 16.

A Figura 20 esquematiza um possível mecanismo pelo qual a atividade pró-oxidante da quercetina está relacionado com sua propriedade antitumoral. Conforme é possível observar nessa figura, a quercetina pode reagir com o oxigênio e sofrer oxidação. Esse processo pode resultar na formação dos intermediários do tipo semiquinona e quinona, que são reativos e exercem efeitos pró-oxidantes dentro dessas células pois reagem com os grupos tióis da glutatona reduzida (GSH), diminuindo assim sua concentração do interior da célula. Essa diminuição compromete, ainda mais, o sistema de defesa antioxidante das células tumorais, promovendo um excesso de espécies reativas de oxigênio que, a partir da ativação da via mitocondrial, induz essas células a sofrerem apoptose (GIBELLINI et al., 2010).

Figura 20. Papel pró-oxidante da quercetina na indução a apoptose em células tumorais.



Fonte: Adaptado de GIBELLINI et al., 2010.

No geral, as técnicas experimentais utilizadas na determinação da atividade antitumoral de flavonóides frente a várias linhagens de tumores em diferentes artigos são as mesmas. Por exemplo, a determinação dos valores de IC_{50} podem ser realizados a partir da técnica colorimétrica, a apoptose pode ser determinada por citometria de fluxo, e os ensaios sobre o efeito do flavonóide na viabilidade celular pode ser realizado de diferentes maneiras, de acordo com os tipos de células analisadas e técnicas aplicadas (SOMASAGARA et al., 2012).

Os estudos realizados com a quercetina costumam utilizar concentrações parecidas de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, normalmente. Os valores de IC_{50} variam na faixa de 50 a $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com algumas exceções. Isso ocorre devido aos diferentes tipos de células estudadas e também do tempo de exposição, mesmo que normalmente seja de 48 horas. Porém independente dessas diferenças experimentais, em todos os artigos estudados a quercetina desempenhou atividade antitumoral considerável.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer é problema de saúde e um problema social que afeta milhões de pessoas por ano e a resistência em sofrer apoptose é uma característica marcante dos tumores malignos, responsáveis pelos maiores riscos de morte aos pacientes. A resistência em sofrer apoptose e a capacidade de adquirir resistência aos medicamentos antineoplásicos apresentadas por essas células tumorais torna-se um grande desafio a ser enfrentado por pesquisadores da área da saúde, e afins.

A busca por fármacos que contribuam com o combate ao câncer, de maneira mais segura e eficaz, é crescente e fundamental para avançar em direção a concretização de tal desafio, nesse contexto, a utilização de compostos naturais parece ser uma solução promissora.

A quercetina tem demonstrado, com base nos artigos mostrados aqui e em muitos outros presentes em base de dados, possuir atividade antitumoral considerável que é responsável pelo grande interesse no desenvolvimento de pesquisas relacionadas aos possíveis usos terapêuticos desse flavonóide no tratamento de várias linhagens diferentes de tumores, como leucemia, câncer gástrico, colorretal, câncer de mama, colo do útero e muitos outros. Uma das características que mais chama a atenção com relação ao uso desse polifenol é a presença desconsiderável de danos a células normais.

Conforme foi possível observar, várias células cancerosas são extremamente sensíveis à apoptose induzida pela quercetina e o mecanismo de ação parece estar fortemente associado com sua característica pró-oxidante visto que vários artigos relatam que o processo apoptótico é acompanhado do aumento da produção de EROs, danos ao DNA, superexpressão da proteína p53 e regulação positiva das proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2. Com base no que foi apresentado nesse trabalho, todos esses processos de sinalização para a apoptose é resultante da via mitocondrial que pode ser ativada como umas das consequências dos danos oxidativos gerados pelas espécies reativas de oxigênio.

A predominância dessa atividade pró-oxidante exercida pela quercetina nas células tumorais explicaria a seletividade do flavonóide por essas células. Sendo ela capaz de induzir um aumento no nível de EROs, conseguiria induzir um estresse

oxidativo seletivo em células tumorais induzindo-as à morte celular programada, enquanto que as células normais, por não apresentarem excesso de oxidantes, são capazes de reestabelecer o equilíbrio redox celular.

Porém, é importante ressaltar que não estamos considerando que a ação pró-oxidante da quercetina seja seu o mecanismo exclusivo de ação, mas que desempenha um papel relevante para esse processo, não sendo a sua atividade antioxidante responsável por tal ação. Mais estudos são necessários para verificação dessa hipótese.

A quercetina também demonstrou a capacidade de atuar sinergicamente com quimioterápicos utilizados atualmente no tratamento contra o câncer, potencializando a ação desses fármacos e minimizando possíveis efeitos secundários devido ser capaz de induzir células cancerosas a apoptose e diminuir a proliferação das mesmas com menores doses desses agentes. Com base nessas informações, podemos dizer que ela se encaixa satisfatoriamente nas estratégias de terapia de combinação, trazendo efeitos benéficos ao organismo. Entretanto, ressaltamos que não há estudos clínicos com esse polifenol, sendo necessário a realização destes para verificação dos efeitos benéficos reais para o tratamento de tumores humanos.

Baseados em todos esses dados concluímos esse trabalho ressaltando a importância da realização de mais testes, *in vivo* e *in vitro*, afim de compreender melhor o mecanismo de ação desse flavonóide, e de testes clínicos para averiguação de seus efeitos no homem. Também destacamos o importante papel, porém não exclusivo, de sua atividade pró-oxidante na indução de várias linhagens celulares de diferentes tipos de tumores à apoptose pela via mitocôndria, tornando a quercetina como um fármaco promissor no tratamento do câncer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, Bruce et al. **Fundamentos de Biologia Celular**, 3ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2006.
- ALTUNDAG, E.M. et al. Quercetin-induced cell death in human papillary thyroid cancer (B-CPAP) cells. **Journal of Thyroid Research**, v. 2016, ID 9843675, 2016.
- ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v.1, n.1, p.37-58, 2007.
- ANDERSEN, O.M.; MARKAN, K.R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. Boca Raton: Taylor e Francis Group, 2006.
- ARAÚJO, B.W.P. et al. Flavonóides e Hipertensão. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 12, n.3, p.188-189, 2005.
- AUGUSTO, Ohara. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo:Oficina de Textos, 2006.
- AWAD, H.M. et al. Structure – activity study on the quinone/quinone methide chemistry of flavonoids. **Chemical Reserarch in Toxicology**, v.14, p. 398 – 408, 2001.
- AZMI, A, S.; SARKAR, F.H.; ADI, S.M. Pro-oxidant activity of dietary chemopreventive agentes: na under-appreciated anti-cancer property. **F1000Reserarch**, doi:10.12688/f1000research.2-135.v1, 2013.
- BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, n. 4, p. 629-643, 2010
- BARREIROS, A.L.B.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.
- BARROS, Maria Conceição Tavares Costa. **Preparação de novos derivados flavonóides com potencial atividade biológica**. Tese (Mestrado). 78 f. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2012.
- BEHLING, E.B et al. Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- BELIZÁRIO, J.R. O próximo desafio: Reverter o câncer. **Ciência Hoje**, v.31, n.184, p. 50-51, 2002.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais oxidantes da dieta. **Revista Nutrição**, v.12, n. 2, p.123-130, 1999.
- BISHAYEE, K.S. et al. Quercetin induces cytochrome-c release and ROS accumulation to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G2/M, in cervical carcinoma. **Cell Proliferation**, v.46, n.2, p.153-163, 2013.
- BORSKA, S. et al. In vitro effect of quercetin on human gastric carcinoma: Targeting cancer cells death and MDR. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n.9, p.3375-3383, 2012.

CAMPBELL, Mary.K; FARREL, Shawn. O. **Bioquímica**, Trad. 5a edição, São Paulo: Cenage Learning, 2011.

CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CESCATO, Valter Angelo Sperling. **Expressão dos genes relacionados à apoptose, Bcl-2, bax e caspase-3 nos adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes e seu potencial como marcador do comportamento tumoral**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2010.

CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v.29, n.3-4, p.323-333, 2000.

CHANG, Y.F.; CHI, C.W.; WANG, J.J. Reactive oxygen species production in involved in quercetin-induced apoptosis in human hepatoma cells. **Nutrition and Cancer**, v. 55, n.2, p.201-209, 2006.

CHEN, J. et al. Coadjustment of quercetin and hydrogen peroxide: The role of ROS in the cytotoxicity of quercetin. **Pharmazie**, v.59, n.2, p.155-158, 2004.

CHEN, L. et al. Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives. **Phytotherapy Research**, v.16, n.3, p. 199-209, 2002.

CHEN, Q. et al. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, n. 32, p.11105-11109, 2008.

CHENG, S. et al. Quercetin induces tumor-selective apoptosis through down-regulation of Mcl-1 and activation of Bax. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n.23, p.5679-5691, 2010.

CHO, H.J. et al. Upregulation of Bcl-2 is associated with cisplatin-resistance via inhibition of Bax translocation in human bladder cancer cells. **Cancer Letters**, v. 237, n.1, p.56-66, 2006.

CHOI, E.J.; CHEE, K.M.; LEE, B.H. Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 408, p.281-285, 2003.

CORDEIRO, MARIANA PIRIH. **Apoptose: O suicídio das células**. Monografia – Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, 1999.

DESCHNER, E.E. et al. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. **Carcinogenesis**, London, v. 7,n. 7 p. 1193-1196, 1991.

DIXON, R.A.; PASINETTI, G.M. Flavonoids and Isoflavonoids: From Plant Biology to Agriculture and Neuroscience. **Plant Physiology**, v. 154, n. 2, p.453-457, 2010.

DORTA, Daniel Junqueira. **Efeito citoprotetor e/ou citotóxico dos flavonóides: Estudo estrutura-atividade envolvendo mecanismos mitocondriais, com ênfase na apoptose**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2007.

DUAN, D. et al. Shikonin targets cytosolic thioredoxin reductase to induce ROS-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells, **Free Radical Biology and Medicine**, v.70, p.182-193, 2014.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p.61-68, 1997

GALLUZZI, L. et al. Systems biology of cisplatin resistance: past, present, and future. **Cell Death and Disease**, 5 e1257, 2014.

GIBELLINI, L. et al., Quercetin and cancer chemoprevention. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, ID 591356, 2011.

GRANADO-SERRANO, A.B. et al. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-Kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). **The Journal of Nutrition**, v.136, n.11, p.2715-2721, 2006.

GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p.110-118, 2004

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B.D; Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n.3, p.335-343, 2007.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M.H.; COLEPICCOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química nova**, v.30 n.1, p. 206-213, 2007.

HADI, S.M. et al. Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism for anticancer properties, **Seminars in Cancer Biology**, v.17, p. 370–376, 2007.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**, 3 ed. Oxford: University Press,1999.

HE, G. et al. Enhancement of cisplatin-induced colon cancer cells apoptosis by shikonin, a natural inducer of ROS in vitro and in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 469, n. 4, p.1075-1082, 2016.

HEIM, E.; TAGLIAFERRO, R.; BOBILYA, J.D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n.10, p. 572-584, 2002.

HORTA, M.F; YOUNG, J.D. Apoptose: Quando a célula programa a própria morte. **Ciência Hoje**, v.25, n.150, p.38-45, 1999.

HSU, C.S.; LY, Y.B. Aspirin potently inhibits oxidative DNA strand breaks: Implication for cancer chemoprevention. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 293, n.2, p. 705–709, 2002.

HURBER, L.S.; AMAYA-RODRIGUEZ, D.B. Flavonóides e flavonas. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.19, n.1, p. 97-108, 2008.

JIMÉNEZ, C.I.E.; MARTÍNEZ, E.Y.C.; FONSECA, J.G. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. **Revista da Faculdade Medicina UNAM**, v. 52, n. 2, p.73-75, 2009.

KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E.J.R. Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 366, p. 351-376, 1994.

KANG, T.B.; LIANG, N.C. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. **Biochemical Pharmacology**, v.54, p.1013-1018, 1997.

KANNAN, K.; JAIN, S.K. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, v. 7, n.27, p.153-163, 200.

KESSLER, M.; UBEAUD, G.; JUNG, L. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, p.132-142, 2003.

KIM, S.J. et al. Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells. **Biochimie**, v.92, n.8, p.927– 932, 2010.

KUSKOSKI, E.M, ASUERO, A.G, GARCÍA-PARILLA, M.C. Actividad antioxidante de pigmentos antocianícos. **Ciência Tecnologia e Alimentação**, v.24, n. 4, p. 691-691, 2004

LAZARY, V.M.D. **Efeitos do consumo de isoflavona na prevenção do câncer de mama**. 20f. Monografia de Conclusão de Curso - Educação e Promoção da Saúde, Universidade de Brasília, 2010.

LEE, John D. **Química inorgânica não tão concisa**, 5ª Ed., São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda, 2000.

LEE, W.J.; HUANG, J.Y.; SHYUR, L.F. Phytoagents for cancer management: regulation of nucleic acid oxidation, ROS, and related mechanisms. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2012, n. 2013, 2013, 925804, 2013.

LEÓN-GONZÁLEZ, A.J.; AUGER, C.; SCHINI-KERTH, V.B. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. **Biochemical Pharmacology**, v.98, n.3, p.371-380, 2015.

LOPES, F. et al. Resolution of neutrophilic inflammation by H₂O₂ in antigen-induced arthrititis. **Arthritis and Rheumatology**, v. 63, n.9, p.2651-2660, 2011.

LOPES, R.M et al. Flavonóides. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.3, n.14, p. 18-22, 2010.

LOPEZ-LAZAR, M. et al. Green tea constituents (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and gallic acid induce topoisomerase I- and topoisomerase II-DNA complexes in cells mediated by pyrogallol-induced hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, v.26, n.4, p.489-498, 2011.

LOPEZ-LAZARO, M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy, **Cancer Letters**, v. 252, n.1, p.1-8, 2007.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Flavonoids as anticancer agents: structure-activity relationship study. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, v.2, n.6, p. 691-714, 2002.

MA, Y. et al. Adenosine induces apoptosis in human liver cancer cells through ROS production and mitochondrial dysfunction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.448, n.1, 2014.

MACHADO et al. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1-2, p.33-39, 2008.

MARAI, J.P et al. The Stereochemistry of Flavonoids In: Grotewold; **The Science of Flavonoids**, OHIO, Springer Science + Business Media, 2006.

MARTÍNEZ, Alejandro. **Flavonoides**. Tese (Doutorado), Faculdade de Química Farmacêutica de Antioquia Medellín, 2005.

MATÉS, J.M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for câncer therapy. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.32,n. 2, p.157-170, 2000.

MATSUI, J. et al. Dietary bioflavonoids induce apoptosis in humam leukemia cells. **Leukemia Research**, v.29, n.5, p.573-581, 2005.

MENEZES, F.C.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v.30, n.2, São Paulo, 2007.

MIURA, H.M. et al. Active Oxygens Generation by flavonoids. **Biological and pharmaceutical Bulletin**, v.21, n.2, p.93-96, 1998.

MONKS, T.J.; LAU, S.S. The pharmacology and toxicology of polyphenolic – glutathione conjugates. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 229 – 255, 1998.

MUSIALIK, M. et al. Acidityof hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. **Journal Organic Chemistry**, v. 74, n.7, p. 2699 - 2709, 2009.

NELSON, D.L.; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 5ed. São Paulo: Sarvier Artmed, 2011.

NIJVELDT, R.J et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.74, n.4, p.418-425, 2001.

NIJVELDT, R.J et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications.**The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 74, n.4, p. 418-425, 2001.

NIU, G. et al. Quercetin induces apoptosis by activating caspase-3 and regulating Bcl-2 and cyclooxygenase-2 pathways in human HL-60 cells. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.43, n.1 , p.30-37, 2011.

OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de toxicologia**, 3 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

ONG, J.Y.H. et al. 2-Methoxy-1,4-naphthoquinone (MNQ) induces apoptosis of A549 lung adenocarcinoma cells via oxidation-triggered JNK and p38 MAPK signaling pathways. **Life Sciences**, v.135, p.158-164, 2015.

PETROS, A.M.; OLEJNICZAK, E.T.; FESIK, S.W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v.644, n.2-3, p.83-94, 2004.

PFEIFFER, T.; SCHUSTER, S.; BONHOEFFER, S. Cooperation and competition in the evolution of ATP producing of ATP producing pathways, **Science**, v. 292, n. 5516, p.505-507, 2001.

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

PRIYADARSINI, R.V. et al. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF-kB inhibition. **European Journal Of Pharmacology**, v. 649, n. 1-3, p. 84-91, 2010.

QU, K. et al. Reactive oxygen generation is essential for cisplatin-induced accelerated senescence hepatocellular carcinoma. **Frontiers of Medicine**, v. 8, n.2, p.227-235, 2014.

RAHMAN, A. et al. Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu (II): role of Cu (I) and oxygen free radicals. **Carcinogenesis**, v. 10, n.10, p.-1833-1899, 1989.

RATES, S.M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-613, 2001.

REIS, Alessandra Cortes. **Papel da Formação de Espécies Reativas de Oxigênio na apoptose de eosinófilos in vivo**: Importância para resolução da resposta inflamatória associada à pleurisia e à asma induzida em camundongos. Tese (Mestrado) - Biologia celular na universidade, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

RIBEIRO, S.M.R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v.21, n.3, p.133-149, 2005.

ROBERTS, L.; GORES, G. Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. **Semin Liver Disease**, v.25, n.2, p.212-225, 2005.

ROHRDANZ E. et al. The effect of quercetin on the mRNA expression of different antioxidant enzymes in hepatoma cells. **Archives of Toxicology**, v.77, n.9, p.506-510, 2003.

RUDIN, C.M. et al. Inhibition of glutathione synthesis reverses Bcl-2 mediated cisplatin resistance, **Cancer Research**, v. 63, n.2, 2003.

SAHU, S.C.; WASHINGTON, M.C. Quercetin-induced lipid peroxidation and DNA damage in isolated rat-liver nuclei. **Cancer Letters**, n.58, n.1-2, p.75-79, 1991.

SAKAO, k.; FUJII, M.; HOU, D-X. Clarification of the Role of Quercetin Hydroxyl Groups in Superoxide Generation and Cell Apoptosis by Chemical Modification. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n.9, p.2048-2053, 2009.

SALVI, M. et al. Interaction of genistein in the mitochondrial electron transport chain results in opening of the membrane transition pore. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics**, v.1556, n. 2-3, p.187-196, 2002.

SASKIA, A.B.R.; VAN, A.; BAST, A.A.L.T. Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids. **Flavonoids in health and Disease**, 9ed. New YORK: Marcel, 1998.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. **The Journal of Nutrition**, v.130, n. 8, 273S-2085S, 2000.

SCHULER, M.; MAURER, Y.; GOLDSTEIN, J.C. p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation. **Cell Death Differ**, v. 10, n.4, p.451-460, 2003.

SHAMIM, U. et al. Resveratrol-induced apoptosis is enhanced in low pH environments associated with cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v.227, n. 4, p.1493-1500, 2012.

SHERR, C.J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. **Cancer Research**, v.60, n.14, p.3689-3695, 2000.

SHUKLA, S., GUPTA, S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 6, p. 962-978, 2010.

SILVA, R. et al. *Flavonoides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico*. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 23, n. 1, p.36-43, 2015.

SOMASAGARA, R.R. et al. Extracts of strawberry fruits induce intrinsic pathway of apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor progression in mice. **Plos One**, Califórnia, v.7, n. 10, e47021, 2012.

SPRAUTEN, M et al. Impact of long-term serum platinum concentrations on neuro- and ototoxicity in cisplatin-treated survivors of testicular cancer, **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n.3, p. 300- 307, 2012.

SRIVASTAVA, S. et al. Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis. **Scientific reports**, v.6, n.24049, DOI: 10.1038/srep24049, 2016.

SZATROWSKI, T.P.; NATHAN, C.F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. **Cancer Research**, v. 51, p. 794-798, 1991.

SZATROWSKI, T.P.; NATHAN, C.F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells, **Cancer Research**, v. 51, n.3, p.794–798. 1991.

TAKAHASHI, A. et al. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pH_m). **Brain Research Bulletin**, v. 62, n. 6, p.497-504, 2004.

TENNANT, D.A. et al. Metabolic transformation in cancer. **Carcinogenesis**, v.30, n.8, p. 1269-1280, 2009.

TRUEBA, G.P. Los flavonoids: Antioxidantes o prooxidantes. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, v.22, n.1, p. 48-57, 2003.

UEDA et al. Baicalein induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. **Molecular Immunology**, v.38, n. 10, p.781-791, 2002.

VARBIRO, G. et al. Direct effect of Taxol on free radical formation and mitochondrial permeability transition. **Free Radic Biology and Medicine**, v.31, n.4, p.548-558, 2001.

VOLP, A.C.P. et al. Flavonóides antocianinas: Características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira Nutrição Clínica**, v. 23, n. 2, p.141-149, 2008.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.J. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n.2, p.304-309, 1997.

WANG, I.K.; LIN-SHIAU, S.; LIN, J.K. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukemia HL-60 cells. **European Journal of Cancer**, v.35, p.1571-1525, 2001.

WANG, P. et al. Effects of quercetin on the apoptosis of the human gastric carcinoma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n.2, p.221-228, 2012.

WATJEN, W. et al. Low concentration of flavonoids are protective in rat HAIE cells whereas high concentration cause DNA damage and apoptosis. **Nutrient Interactions and Toxicity**, v. 135, n. 3, p.523-531, 2005.

WEINBERG, Robert A. A biologia do câncer. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WINKEL, B.S.J. **The Science of Flavonoids**: The biosynthesis of flavonoids, cap. 3 OHIO: Springer, p.71-96, 2006.

YANG, B et al. Prooxidant activities of quercetin, *p*-coumaric acid and their derivatives analysed by quantitative structure-activity relationship. **Food Chemistry**, v.132, p.508-512, 2012.

YE, F. et al. Baicalein induces human osteosarcoma cell line MG-63 apoptosis via ROS-induced BNIP3 expression tumor biology. **Tumor Biology**, v.36, n.6, p.4731-4740, 2015.

ZERAIK, M,L. et al., Improvement of pro-oxidant capacity of protocatechuic acid by esterification. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p.1-9, 2014.

ZHAO, P. et al. Quercetin induces HepG2 cell apoptosis by inhibiting fatty acid biosynthesis. **Oncology Letters**, v.8, n.2, p.765-769, 2014.

ZHENG, L.F. et al. DNA damage induced by resveratrol and its synthetic analogues in the presence of Cu (II) ions: mechanism and structureactivity relationship. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 12, p. 1807–1816, 2006.