

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**PAULO ROBERTO WORFEL**



**ANÁLISE DA VIABILIDADE E NÍVEIS DE GLUTATIONA DE CÉLULAS DE  
MELANOMA MURINO TRATADAS COM FLAVONÓIDES E OXIGÊNIO  
SINGLETE**

**CURITIBA  
2009**

**PAULO ROBERTO WORFEL**

**ANÁLISE DA VIABILIDADE E NÍVEIS DE GLUTATIONA DE CÉLULAS DE  
MELANOMA MURINO TRATADAS COM FLAVONÓIDES E OXIGÊNIO  
SINGLETE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Glauca Regina Martinez

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Eliane Merlin Rocha

**CURITIBA  
2009**

Dedico meu trabalho:

À Deus,

À minha esposa Adriane e minha filha Ana  
Carolina,

À minha Família, pela compreensão e carinho

Aos meus amigos, sempre preocupados em  
ajudar...

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre presente.

À Profª Drª Glauca Regina Martinez pela imensa dedicação, paciência, interesse, orientação e compreensão, decisiva em todos os aspectos.

À Profª Drª Maria Eliane M. Rocha pela colaboração nos aspectos didáticos e organizacionais e científicos.

Às professoras do Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular: Drª Guilhermina Noletto, Drª Sílvia Cadena, Drª Sheila Winnischofer, Drª Eva Carnieri pelos auxílios em todos os momentos.

Aos meus colegas que realmente fizeram a diferença na minha vida acadêmica: Gláucio Valdameri, Stelia Carolina, Tatiana Herrerias, que me auxiliaram tanto nos momentos de trabalho quanto nos intervalos.

Aos meus colegas do laboratório Rosilene, (que, para meu orgulho, fez parte da minha banca), Amanda, Carolina, Juliana (s), Sílvia R., Paulo L., Beth, Andréia, Regina, Eduardo, Gustavo, Mônica, Thiago, Fernanda e Eliane.

Aos meus colegas do mestrado, que foram sempre companheiros.

Às Fontes Financiadoras:

- CAPES
- Instituto Milênio Redoxoma
- Fundação Araucária
- L'Oreal, UNESCO – Academia Brasileira de Ciências

MUITO OBRIGADO!!!

## RESUMO

O melanoma é um tipo de câncer de baixa incidência, mas de alta letalidade sendo normalmente refratário aos tratamentos convencionais de quimioterapia. Uma forma alternativa de tratamento é a terapia fotodinâmica, na qual luz, sensibilizador e oxigênio geram, entre outras espécies reativas, o oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ), considerado um agente importante no mecanismo de destruição do tumor. A concentração de glutathione (GSH) celular é um dos principais parâmetros usados para avaliar estresse oxidativo, por possuir várias atividades biológicas, entre elas a proteção do DNA contra danos oxidativos. Os flavonóides são compostos naturais de origem vegetal que apresentam diversas atividades biológicas. Não se conhece os efeitos sobre as células de melanoma de um tratamento com flavonóides anterior a um estresse oxidativo gerado pelo  $^1\text{O}_2$ . Neste trabalho foi avaliada a viabilidade celular e a concentração de glutathione total (GSx) e glutathione oxidada (GSSG) de células de melanoma murino B16-F10 submetidas ao tratamento com apigenina, flavona, luteolina ou quercetina, sem e com um posterior tratamento com o endoperóxido gerador de  $^1\text{O}_2$  (DHPNO<sub>2</sub>). Também foi avaliada a influência desses flavonóides sobre a atividade da enzima glutathione-S-transferase, pois essa enzima está relacionada com a quantidade de glutathione intracelular. Os experimentos demonstraram que na viabilidade celular de B16-F10: i) o tratamento somente com  $^1\text{O}_2$  (10 mmol.L<sup>-1</sup> de DHPNO<sub>2</sub>) não propiciou diferenças significativas em relação ao controle; ii) o tratamento com apigenina, luteolina e quercetina apresenta diminuição na viabilidade celular na maior dose (50 μmol.L<sup>-1</sup>) para ~70%, ~57% e ~55%, respectivamente, não sofrendo alteração com o posterior tratamento com  $^1\text{O}_2$ , iii) a flavona não interfere na viabilidade celular de B16-F10 nas doses testadas, nem com o posterior tratamento com  $^1\text{O}_2$ . Para as medidas da concentração de glutathione das células B16-F10 foi encontrado que: i) O  $^1\text{O}_2$  promove redução em ~40% no conteúdo de GSx, mas não aumenta o nível de GSSG; ii) a apigenina reduz a concentração de GSx e GSSG nas doses de 10 e 25 μmol.L<sup>-1</sup>; iii) a flavona, luteolina ou quercetina reduzem a quantidade de GSx na maioria das doses alcançando ~40%, ~80% e ~50% de redução, respectivamente, na dose de 50 μmol.L<sup>-1</sup>, mas não alteram os níveis de GSSG em relação ao controle; iv) o  $^1\text{O}_2$  não reduz os níveis de GSx e GSSG quando as células são previamente tratadas com os flavonóides. A atividade da enzima glutathione-S-transferase não foi afetada pelo tratamento das células B16-F10 com apigenina e flavona, mas a luteolina e a quercetina reduziram a atividade desta enzima. Apesar de a flavona ter diminuído os níveis de glutathione, ela não causou diminuição da viabilidade celular, de forma que a diminuição da viabilidade das células tratadas com apigenina, luteolina ou quercetina pode estar associada também a outros fatores além da diminuição do conteúdo de glutathione. Como os flavonóides inibiram uma diminuição adicional dos níveis de GSx pela ação do  $^1\text{O}_2$ , este pode estar atuando sobre outros alvos celulares, uma análise de oxidação de outras biomoléculas poderá contribuir para um entendimento mais completo da implicação desses resultados.

Palavras-chaves: glutathione, melanoma, oxigênio molecular singlete, flavonóides.

## ABSTRACT

Melanoma is a type of cancer with low incidence, but high lethality due to the fact of being refractory to conventional chemotherapeutic treatments. An alternative treatment is photodynamic therapy, in which light, sensitizer and oxygen generate, among other reactive species, singlet molecular oxygen ( $^1\text{O}_2$ ), which is considered an important agent in the destruction of the tumor. Cellular glutathione (GSH) concentration is a key indicator of oxidative stress, since this biomolecule is important to several biological activities, including the protection of DNA against oxidative damage. Flavonoids are vegetal natural compounds with diverse biological activities. However, the effect of a treatment with flavonoids prior to an oxidative stress generated by  $^1\text{O}_2$  on melanoma cells is not known. This study evaluated the cell viability and the levels of total glutathione (GSx) and oxidized glutathione (GSSG) of B16-F10 after the treatment with apigenin, flavone, luteolin or quercetin and a subsequent treatment with the endoperoxide generator of  $^1\text{O}_2$  (DHPNO<sub>2</sub>). It was also evaluated the effect of this flavonoids on glutathione-S-transferase activity, this enzyme is important because it is closely related to the amount of intracellular glutathione levels. The experiments showed that on B16-F10 cell viability: i) the treatment with only  $^1\text{O}_2$  (DHPNO<sub>2</sub> 10 mmol.L<sup>-1</sup>) did not present any significative difference to control; ii) treatment with apigenin, luteolin or quercetin at 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  lowered cell viability to ~70%, ~57% and ~55%, respectively, and there was not additional effect by the  $^1\text{O}_2$  treatment; iii) flavone did not interfere with B16-F10 cell viability with the tested doses, nor with the subsequent treatment with  $^1\text{O}_2$ . For the concentration of glutathione on B16-F10 cells, it was found that: i)  $^1\text{O}_2$  promotes a reduction of ~40% in GSx content, but it does not rise GSSG levels; ii) apigenin reduced the concentration of GSx and GSSG at 10 and 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ; iii) flavone, luteolin or quercetin, mainly in the higher doses, were able to lower GSx levels, reaching ~40%, ~80% and ~50%, respectively, at 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , but they do not alter GSSG levels; iv)  $^1\text{O}_2$  do not reduces GSx levels when cells were previous treated with flavonoids. The activity of the enzyme glutathione-S-transferase was not affected by B16-F10 cells treatment with apigenin and flavone, but with the flavonoids luteolin and quercetin, it was shown a reduction of this enzyme activity. In spite of the reduction on total glutathione levels by flavone; it did not lowered cell viability, which could indicate that the effect of apigenin, luteolin and quercetin on cell viability could be associated to other mechanisms of cell death, besides the reduction of intracellular glutathione levels. Since flavonoids inhibited an additional reduction on glutathione levels by  $^1\text{O}_2$  action, this species could be acting on other cellular targets in this situation, and the analysis of others biomolecules oxidation could contribute to a more complete understanding of these results.

Keywords: glutathione, melanoma, singlet molecular oxygen, flavonoids.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Níveis de energia do oxigênio no estado fundamental e excitado -----	17
FIGURA 2 - Ciclo da glutathiona-----	24
FIGURA 3 - Estrutura química da apigenina-----	30
FIGURA 4 - Estrutura química da flavona-----	32
FIGURA 5 - Estrutura química da luteolina-----	33
FIGURA 6 - Estrutura química da quercetina-----	34
FIGURA 7 - Mecanismo químico de geração do $^1\text{O}_2$ -----	41
FIGURA 8 - Mecanismo de síntese do endoperóxido a partir do DHPN-----	42
FIGURA 9 - Efeito da apigenina sobre a viabilidade das células B16-F10 com e sem o tratamento posterior com $^1\text{O}_2$ -----	49
FIGURA 10 - Efeito da flavona sobre a viabilidade das células B16-F10 com e sem o tratamento posterior com $^1\text{O}_2$ -----	50
FIGURA 11 - Efeito da luteolina sobre a viabilidade das células B16-F10 com e sem o tratamento posterior com $^1\text{O}_2$ -----	52
FIGURA 12 - Efeito da quercetina sobre a viabilidade das células B16-F10 com e sem o tratamento posterior com $^1\text{O}_2$ -----	54
FIGURA 13 - Quantificação da glutathiona total das células B16-F10 tratadas com $^1\text{O}_2$ -----	56
FIGURA 14 - Quantificação da glutathiona total das células B16-F10 tratadas com apigenina e apigenina / $^1\text{O}_2$ -----	59
FIGURA 15 - Quantificação da glutathiona total das células B16-F10 tratadas com flavona e flavona / $^1\text{O}_2$ -----	62
FIGURA 16 - Quantificação da glutathiona total das células B16-F10 tratadas com luteolina e luteolina / $^1\text{O}_2$ -----	64
FIGURA 17 - Quantificação da glutathiona total das células B16-F10 tratadas com quercetina / $^1\text{O}_2$ -----	66
FIGURA 18 - Atividade enzimática da glutathiona S-Transferase -----	70

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 – EFEITO DO $^1\text{O}_2$ SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS B16-F10--	46
TABELA 2 – QUANTIFICAÇÃO DE GSSG DAS CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM $^1\text{O}_2$ -----	57
TABELA 3 – QUANTIFICAÇÃO DE GSSG DAS CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM APIGENINA E APIGENINA/ $^1\text{O}_2$ -----	60
TABELA 4 – QUANTIFICAÇÃO DE GSSG DAS CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM FLAVONA E FLAVONA/ $^1\text{O}_2$ -----	63
TABELA 5 – QUANTIFICAÇÃO DE GSSG DAS CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM LUTEOLINA E LUTEOLINA/ $^1\text{O}_2$ -----	65
TABELA 6 – QUANTIFICAÇÃO DE GSSG DAS CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM QUERCETINA E QUERCETINA/ $^1\text{O}_2$ -----	67
TABELA 7 – INTERFERÊNCIA DO DHPN NOS VALORES DE GSx-----	69



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ABC C1 – Proteína de membrana ATP-*binding cassette* 1
- $^1\text{O}_2$  - Oxigênio molecular no estado singlete ( $^1\Delta_g$ )
- OH - Radical Hidroxila
- BSO - L-Butionina-S-sulfoximina
- DEN - dietilnitrosamina
- DHPN - N,N'-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1-4-naftilideno)dipropanamida
- DHPNO<sub>2</sub> - Endoperóxido N,N'-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1-4-naftilideno)dipropanamida
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- D<sub>2</sub>O - Água deuterada
- DTNB - 5,5'- ditio-bis( 2 ácido nitrobenzóico)
- ELC - Extrato livre de células
- GSH -  $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina reduzida ou glutathiona reduzida
- GSO<sub>2</sub>H - glutathiona sulfinato
- GSO<sub>3</sub>H - glutathiona sulfonato
- GSSG- Glutathiona na forma oxidada ou dissulfito
- GSSOG - Glutathiona sulfóxido
- GST – Enzima Glutathiona-S-Transferase (EC. 2.5.1.18)
- GSx – Glutathiona Total
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de Hidrogênio
- HPLC – cromatografia líquida de alto desempenho ou *performance*
- iNOS - Enzima óxido nítrico sintase induzível
- INCA - Instituto Nacional do Câncer
- I $\kappa$ B - Subunidade inibitória de NF- $\kappa$ B
- MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
- NDPO<sub>2</sub> – 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropionato
- NF- $\kappa$ B - Fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B
- O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - Radical superóxido
- PBS - Solução salina-fosfato tamponada
- pH - Potencial hidrogeniônico
- ROS - Espécies reativas de oxigênio

RNS - Espécies reativas de nitrogênio

MDR – Resistência a multidrogas

MRP – proteína de resistência a múltiplas drogas

SBF - Soro fetal bovino

*t*-BHP - *tert*-butil hidroperóxido,

UVA - Luz com comprimento de onda de 315 a 400 nm

UVB - Luz com comprimento de onda de 280 a 315 nm

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	16
2.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	16
2.1.1 OXIGÊNIO SINGLETE	16
2.2 MELANOMA	20
2.3 METABOLISMO E FUNÇÃO DA GLUTATIONA	22
2.4 FLAVONÓIDES	26
2.4.1 APIGENINA	29
2.4.2 FLAVONA	31
2.4.3 LUTEOLINA	32
2.4.4 QUERCETINA	33
<b>3 OBJETIVOS</b>	37
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	38
4.1 SOLUÇÕES	38
4.2 CULTIVO CELULAR	38
4.3 SOLUÇÕES DE FLAVONÓIDES	39
4.4 SOLUÇÕES DE GLUTATIONA	39
4.5 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM FLAVONÓIDES	40
4.6 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM OXIGÊNIO SINGLETE	40
4.7 SÍNTESE DO ENDOPERÓXIDO GERADOR DE OXIGÊNIO SINGLETE	41
4.8 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	42
4.9 DETECÇÃO DE GLUTATIONA TOTAL E GLUTATIONA OXIDADA POR MÉTODO COLORIMÉTRICO	43
4.10 MEDIDA DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	44
4.11 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA	45
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	46

5.1 VIABILIDADE DAS CÉLULAS B16-F10 NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DO OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE-----	46
5.1.1 VIABILIDADE CELULAR PARA O TRATAMENTO COM APIGENINA E OXIGÊNIO SINGLETE-----	47
5.1.2 VIABILIDADE CELULAR PARA O TRATAMENTO COM FLAVONA E OXIGÊNIO SINGLETE-----	49
5.1.3 VIABILIDADE CELULAR PARA O TRATAMENTO COM LUTEOLINA E OXIGÊNIO SINGLETE-----	50
5.1.4 VIABILIDADE CELULAR PARA O TRATAMENTO COM QUERCETINA E DHPNO <sub>2</sub> -----	52
5.2 ANÁLISES DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA INTRACELULAR -----	55
5.2.1 QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA PARA AS CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM APIGENINA E <sup>1</sup> O <sub>2</sub> -----	58
5.2.2 QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA PARA AS CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM FLAVONA E <sup>1</sup> O <sub>2</sub> -----	61
5.2.3 QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA PARA AS CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM LUTEOLINA E <sup>1</sup> O <sub>2</sub> -----	63
5.2.4 QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA PARA AS CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM QUERCETINA E <sup>1</sup> O <sub>2</sub> -----	65
5.2.5 VERIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS INTERFERÊNCIAS DO DHPN COM OS FLAVONÓIDES UTILIZADOS-----	68
5.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE-----	69
<b>6. CONCLUSÕES-----</b>	<b>71</b>
<b>7. REFERÊNCIAS-----</b>	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de pele é um dos tipos de câncer mais comuns nos países desenvolvidos, chegando à 25% de todos os tipos de neoplasias registrados no Brasil ([http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=333](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=333) acesso em 25/01/09). O melanoma é a forma mais agressiva destes e, apesar de alcançar somente 3% de incidência, é o que mais leva o portador ao óbito.

De acordo com a Sociedade Americana de Câncer ([http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT\\_1x\\_Cancer\\_Facts\\_and\\_Figures\\_2008.asp](http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT_1x_Cancer_Facts_and_Figures_2008.asp). Acesso em 25/01/2009), eram estimados 62480 novos casos e 8420 mortes para 2008 (Esses novos casos são baseados nas taxas de incidência de 1995-2004 dos 41 estados conforme informado pela *North American Association of Central Cancer Registries*, representando cerca de 85% da população americana. As mortes são estimadas com base nos dados de mortalidade de 1969-2005 fornecidos pelo *National Center for Health Statistics, Centers for Disease Control and Prevention*). No Brasil, segundo o INCA (2008) eram previstos 2.950 casos novos em homens e 2970 casos novos em mulheres para o ano de 2008.

Sua letalidade é alta, decorrente do fato de ser normalmente refratário aos tratamentos convencionais, com seu prognóstico alcançando uma média de sobrevivência de 6 meses, atingindo uma sobrevida de 5 anos em menos de 5% dos casos (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007).

O bronzeamento de pele, considerado como um exagero à exposição solar, é bem determinado como um dos fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma, como demonstrado por estudos epidemiológicos (SOUZA *et al.*, 2004).

A luz ultravioleta (UV), componente tanto da luz solar, quanto da luz artificial, tem sido relacionada como fator importante na iniciação de várias formas de câncer cutâneo, como carcinomas e melanomas. Estudos apontam para a importância da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) também na iniciação e propagação de células cancerosas (AXELROD *et al.*, 1990; BRAR *et al.*, 2001). Algumas formas de tratamento utilizam-se deste mesmo fato para sensibilização das células afetadas. Uma dessas formas de tratamento é a terapia fotodinâmica, na qual luz, sensibilizador e oxigênio geram ROS pelo processo de fotossensibilização (KOLAROVA *et al.*, 2007).

Das espécies reativas geradas, o oxigênio molecular no seu estado singlete ( $^1\text{O}_2$ ) é uma das que provoca danos oxidativos em biomoléculas, inclusive no DNA (CADET *et al.*, 2003). Alterações nas defesas antioxidantes podem ser de importância para o sucesso na terapia.

Alguns dos compostos candidatos a atuarem nas células são os flavonóides, por interferirem em vários processos celulares. Entre os representantes destes compostos, a quercetina se destaca por seus efeitos demonstrados na indução de apoptose e bloqueio do ciclo celular na fase G2/M de alguns tipos celulares (MA *et al.*, 2007). Outros flavonóides que possuem características importantes nesse contexto são a apigenina, a flavona e a luteolina (MA *et al.*, 2007, ZHENG *et al.*, 2005; ULLMANNOVA; POPESCU, 2007; LIMA *et al.*, 2006).

A relação GSH/GSSG é um indicativo do estado redox da célula. A manutenção da concentração de GSH é importante para várias atividades biológicas, entre elas a proteção do DNA contra danos oxidativos (LAFLEUR *et al.*, 1994).

Foi demonstrado por Biroccio *et al.* (2002) que a depleção do conteúdo celular de glutatona induzido pela diminuição da expressão no gene c-Myc, promoveu o processo de apoptose em células de melanoma. Segundo Benathan *et al.* (1992) a depleção do conteúdo de GSH aumenta em três vezes a sensibilidade de três diferentes linhagens celulares de melanoma ao tratamento com a droga anti-neoplásica melfalano. Portanto, substâncias que interferem no conteúdo de glutatona das células também apresentam possibilidades interessantes no tratamento do câncer.

Torna-se clara a importância do estudo das defesas celulares contra o estresse oxidativo, tanto para o maior entendimento dos mecanismos de ação dos promotores das mutações que resultam no desenvolvimento do câncer de pele, quanto na possibilidade destes fatores serem explorados em terapias auxiliares no futuro. Não foram encontrados dados na literatura correlacionando a utilização de flavonóides concomitantes com a atuação do oxigênio singlete, o que pode vir a ser um dos caminhos promissores para ampliar a aplicação e o sucesso de tratamento nos casos de diferentes tipos de câncer.

Nesse sentido, pesquisas são necessárias para estabelecer os mecanismos pelos quais os flavonóides atuam, quais são e em quais doses sua eficácia é maior, além de seu comportamento em presença de uma espécie reativa gerada. Dessa

forma, este estudo pretende contribuir para o entendimento do papel de flavonóides em células de melanoma murino B16-F10, analisando parâmetros como viabilidade e alterações dos conteúdos de glutathiona, isoladamente e na presença do oxigênio molecular singlete, como representante de ROS.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

As espécies reativas podem ser geradas de várias maneiras em sistemas biológicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), mas a luz UV está diretamente relacionada com a sua produção (WANG *et al.*, 2001). A irradiação UV solar consiste em radiação UVB, com comprimento de onda de 280 a 315 nm e a radiação UVA, com comprimento de onda de 315 a 400 nm, contribuindo ambas, não somente para o envelhecimento, mas também para a carcinogênese.

A UVA tem sido menos preocupante como fator da carcinogênese por ser menos absorvida pelo DNA que a UVB, mas a quantidade de UVA solar e sua profunda penetração na pele, com estimativa de 19 a 50 % desta radiação alcançando os melanócitos, aumentam sua importância em relação à UVB, tanto na carcinogênese em humanos como em peixes (HE *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2001).

Foi demonstrado que a exposição de queratinócitos HaCaT a baixas doses de radiação UV levam à formação de radical superóxido e óxido nítrico (AITKEN *et al.*, 2007). Do mesmo modo, Hanson e Clegg (2002) observaram aumento da produção de ROS em pele humana após irradiação UVB (1600 J/m).

Como demonstrado por Baier *et al.* (2007), a radiação UVA causa a formação de uma espécie reativa denominada oxigênio molecular singlete quando queratinócitos ou pele humana são expostos a luz de laser UVA (355nm) a 6 J/cm<sup>2</sup>. Anteriormente, fortes evidências já tinham sido relatadas nesse sentido, pois usando o marcador hidroperóxido de colesterol (3β-hidroxicolest-5-ene-7-hidroperóxido) (KULIG; SMITH, 1973; YAMAZAKI *et al.*, 1999), foi observado que ele se encontrava aumentado quando a pele dos ratos era irradiada com UVA (OZAWA *et al.*, 1991).

#### 2.1.1 OXIGÊNIO SINGLETE

O oxigênio molecular singlete é a espécie reativa que se configura em um estado excitado do oxigênio molecular, com o fornecimento de energia, provocando uma superação da regra de restrição de spin, formando uma espécie muito mais reativa que o oxigênio molecular. O oxigênio singlete, ou singleto, pode existir em



dois estados: um com estado excitado  ${}^1\Delta_g$  com dois elétrons em spin opostos no mesmo orbital e o estado excitado  ${}^1\Sigma_g$  que possui um elétron em cada orbital  $\pi$  degenerado, com spins opostos, conforme esquematizado na FIGURA 1. Este estado excitado tem baixa estabilidade, tendo um tempo de vida muito curto, sendo rapidamente convertido no estado excitado  ${}^1\Delta_g$ , sendo este o estado de maior interesse e será representado como  ${}^1O_2$ .

Estado	Orbitais $\pi^*$	Energia(kcal/mol)	$\tau$ (s)
${}^1\Sigma_g^+$	$\uparrow \quad \downarrow$	37,5	$10^{-11}$
${}^1\Delta_g$	$\uparrow\downarrow \quad \text{---}$	22,5	$10^{-6}$
${}^3\Sigma_g^-$	$\uparrow \quad \uparrow$		

FIGURA 1 – Níveis de energia do oxigênio no estado fundamental e excitado  
 FONTE: MARTINEZ *et al.*, 2003.

O  ${}^1O_2$  pode reagir com DNA, colesterol, lipídios, aminoácidos e proteínas, sendo esta última o maior alvo de suas reações, devido à sua abundância no ambiente celular. A reação com proteínas ocorre primariamente nos aminoácidos triptofano, metionina, cisteína, histidina e tirosina nas cadeias laterais, resultando na formação de endo ou hidroperóxidos de meia vida curta de resíduos de triptofano, histidina e tirosina, tanto em proteínas isoladas quanto em proteínas de células inteiras (RONSEIN *et al.*, 2006; MORGAN *et al.*, 2004).

O dano em DNA tem uma vital importância entre todas as possíveis lesões aos componentes celulares, devido ao fato do seu papel no armazenamento de informações e hereditariedade, o principal dano gerado pela ação do  ${}^1O_2$  é a formação de base oxidada, nesse caso, a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina, que pode levar a mutações (AGNEZ-LIMA *et al.*, 2001).

O tempo de vida do  ${}^1O_2$  varia conforme o solvente utilizado. Em geral, solventes que possuem ligações C-H e O-H favorecem a desativação do estado excitado do  ${}^1O_2$ , transformando a energia de ativação em vibracional do solvente.

Com solventes substituindo o hidrogênio por átomos de deutério, este tempo de vida é aumentado, de 2  $\mu\text{s}$  em água para 20  $\mu\text{s}$  em  $\text{D}_2\text{O}$ , conforme verificado por Kajiwara e Kearns (1973), chegando a 60 $\mu\text{s}$  nos estudos de Foote e Clennan (1995), porém, sempre tempos maiores que a meia vida em solvente aquoso. Este fato tem sido utilizado nos estudos de efeitos e detecção do  $^1\text{O}_2$ , porém outros testes devem ser realizados para diferenciar os efeitos da espécie reativa e do composto deuterado no sistema.

Devido ao tempo de vida do  $^1\text{O}_2$  ser maior que outras espécies reativas, a distância percorrida também pode ser maior, chegando de 10 a 20 nm, segundo Moan e Berg (1991) aumentando as chances de desativação por substratos celulares.

A geração do  $^1\text{O}_2$  pode ocorrer por via fotoquímica, nesta modalidade, um sensibilizador é ativado através da luz a um estado excitado singlete, passando em seguida a um estado triplete através de um mecanismo denominado cruzamento intersistemas. A partir daí, existem dois tipos de destinos: o tipo I, onde este sensibilizador excitado reage com um substrato, gerando  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , e  $\text{OH}\cdot$  e tipo II quando reage com o oxigênio molecular e gera o  $^1\text{O}_2$  (FOOTE *et al.*, 1991).

Existe a possibilidade do  $^1\text{O}_2$  ser gerado através de mecanismos químicos. Para isto, podem ser utilizados derivados naftalênicos hidrossolúveis, cujos substituintes devem possuir a característica de não serem sensíveis ao  $^1\text{O}_2$ , ao fotossensibilizador ou aos produtos necessários à sua síntese. O DHPN (*N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1-4-naftilideno)dipropanamida) possui estas características e após sua conversão para sua forma endoperóxido (DHPNO<sub>2</sub>), sua decomposição por termólise evidenciou sua capacidade de gerar o  $^1\text{O}_2$  intracelularmente (KLOTZ *et al.*, 1999).

Para decomposição de 95% do DHPNO<sub>2</sub> é necessário a termólise a 37°C por 99 minutos, gerando cerca de 59% do oxigênio no estado excitado singlete (MARTINEZ, 2003). A utilização deste tipo de geração de  $^1\text{O}_2$  possui as vantagens de não utilizar a luz diretamente, o que impede a geração de diferentes espécies reativas e em concentração desconhecidas, além de ser uma fonte limpa de  $^1\text{O}_2$  com rendimento conhecido.

Utilizando esse endoperóxido, foi investigado o papel específico do  $^1\text{O}_2$  em células produtoras de melanina (melanoma murino B16-F10 e melanoma humano SK-MEL). Os resultados mostraram que o tratamento com DHPNO<sub>2</sub> (1,0 mmol/L)

diminui a viabilidade celular em cerca de 66 % (B16-F10) e 58 % (SK-MEL), sem diferenças entre as condições de melanogênese estimulada. Entretanto, as células B16-F10 tratadas com quantidades maiores de DHPNO<sub>2</sub> (5,0 e 10 mmol/L) sob condições de melanogênese estimulada mostraram uma viabilidade maior (107 % e 183 %, respectivamente) quando comparadas com as células sem estímulo da melanogênese. Além disso, a análise por microscopia eletrônica de varredura para as células de melanoma tratadas com DHPNO<sub>2</sub> (1 e 5 mmol/L) mostrou células menores, perda de características microespículas e presença de vesículas de secreção. Porém, em relação às células tratadas nessas mesmas condições, mas com estímulo da melanogênese, observou-se um maior número de células espalhadas, achatadas e bem aderidas ao substrato. Estes resultados em conjunto mostram que <sup>1</sup>O<sub>2</sub> interfere na fisiologia das células de melanoma, causando danos e podendo levar ao processo de morte celular. Além disso, um aumento na quantidade de melanina parece modificar a resposta observada nos tratamentos com maiores concentrações de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, oferecendo proteção em relação à morte celular (SANTOS, 2007).

Lebedeva *et al.* (2007) observaram que, quando realizada a geração do oxigênio molecular singlete por endoperóxido (em concentração menor que 2 µmol/L) em células normais de epitélio da próstata (P69) e em células de câncer de próstata, ocorreu uma seletividade para as células de câncer, com uma maior toxicidade para as neoplásicas quando avaliadas pelo método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Os resultados demonstraram uma redução na viabilidade de menos de 10% para as células normais e uma redução de mais de 30% para as células de câncer, com uma concentração de 1,25 µmol/L do endoperóxido. Neste estudo o endoperóxido utilizado (sal sódico do ácido 4-metilnaftaleno-1-propionico) possui um rendimento de ~ 50% de geração de oxigênio no estado excitado singlete. Este trabalho demonstra uma seletividade em relação à viabilidade celular em células normais e de câncer, com o tratamento utilizando-se o gerador do oxigênio molecular singlete.

Otsu *et al.* (2005) utilizaram dois endoperóxidos, possuindo tempo de meia-vida similares, porém com diferentes hidrofobicidades. O endoperóxido mais hidrofóbico (1-metilnaftaleno-4-propionato, 4 mmol/L por 2h) induziu a liberação de citocromo c da mitocôndria isolada para o citosol e reduziu a viabilidade celular em 80% de HepG2 (hepatoma), avaliada pela atividade da lactato desidrogenase. O <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

gerado neste estudo demonstrou que esta espécie reativa dispara a apoptose pela liberação do citocromo c por meio da peroxidação dos componentes mitocondriais e promove a morte celular por uma via diferente da apoptose típica, devido à inativação da via das caspases, pois apresentou uma inibição das caspases 3 e 9.

## 2.2 MELANOMA

Os melanócitos, células especializadas em pigmentação, que ocorrem predominantemente na pele e olhos, originam-se na crista neural progenitora de alta mobilidade e migram para a pele durante o desenvolvimento embrionário. Na pele, localizam-se na membrana basal da epiderme e nos folículos capilares, e sua homeostase é regulada por queratinócitos epidérmicos (SLOMINSKI *et al.*, 2004). Quando surge uma lesão característica denominada de nevo atípico, pode ser gerada uma malignidade derivada da crista neural, que é o melanoma, assumindo um crescimento radial ou superficial, não invasivo, e devido a alterações genéticas, adquire capacidade de se tornar invasivo, angiogênico e metastático, iniciando a ocorrência de metástases distantes e morte (GOVINDARAJAN *et al.*, 2007).

O melanoma é uma das formas mais agressivas de câncer, e muito resistente aos tratamentos baseados em drogas que agem sobre o DNA, microtúbulos e as topoisomerasas (CHEN *et al.*, 2006).

Como a pele é a primeira e a principal barreira contra as exposições ambientais, torna-se também a principal defesa contra variações de temperatura e contra radiações, inclusive a luminosa. Segundo Lin e Fisher (2007), os melanócitos propiciam algumas destas características pela produção de um pigmento denominado melanina. São os diferentes graus de produção de melanina que determinam os fototipos de pele, fator importante na predisposição populacional ao câncer de pele.

A resposta inflamatória da pele quando exposta à luz UV envolve a produção de grandes quantidades de várias citocinas e fatores de crescimento pelos queratinócitos, gerando uma resposta imunitária/inflamatória vigorosa e, em alguns casos, angiogênese, com a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nesses processos e pela interação da luz UV com constituintes celulares do melanócito (MEYSKENS *et al.*, 2001).

São muitas as alterações genéticas que possuem correlações com a incidência no desenvolvimento de câncer. A maioria destas alterações pode ocorrer em três genes, segundo Benjamim e Ananthaswamy (2007): proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparo do DNA. Alteração em um ou mais destes grupos cooperam na indução da condição neoplásica. Os proto-oncogenes são importantes para o crescimento e divisão celular, os genes supressores de tumor atuam no atraso do ciclo celular e ativação da morte celular regulada e os genes de reparo atuam no caso de alterações no DNA, ação auxiliada também pelos proto-oncogenes.

Entre os genes que têm sido implicados no desenvolvimento do melanoma, um dos mais comuns é o CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), que codifica duas proteínas distintas, mas relacionadas: p16<sup>INK4a</sup> e p14<sup>ARF</sup>, envolvidas na regulação do ciclo celular e apoptose (NELSON; TSAO, 2009). Além disso, as MAP quinases são constitutivamente ativadas em melanoma, permanecendo não ativadas nos nevos benignos, e sua ativação ocorre desde os estágios precoces do melanoma (GOVINDARAJAN *et al.*, 2003).

Segundo Rosati *et al.* (2007) um fato relevante para a manutenção da atividade de crescimento de um tumor é a sua capacidade em evadir os mecanismos de indução da apoptose celular, o que tem destacado as proteínas envolvidas na morte celular programada como alvos no desenvolvimento de terapia.

O envolvimento das espécies reativas na iniciação e propagação do câncer está relacionado com a ativação do processo apoptótico pela cascata Akt/proteína quinase B e MAP quinase e por fatores de transcrição (proteína de ativação 1). Um destes fatores de transcrição, o fator nuclear (NF-κB) é ativado pelas espécies reativas, contribuindo como um sinal de proliferação e proporciona a importante resistência à indução da apoptose por quimioterapia nas células de melanoma (GLOIRE *et al.*, 2006). O NF-κB quando inativado está ligado a IκB, que é sua subunidade inibitória. Quando exposto à determinados estímulos, que podem ser endotoxinas, estresse mecânico, infecções ou vírus, ocorre ativação do NF-κB, que aumenta a expressão de múltiplos genes, incluindo os de citocinas (IL-2, IL-6, IL-8, TNFα), iNOS (óxido nítrico sintase induzível), fatores de crescimento, moléculas de adesão, ciclooxigenase 2 e receptores de citocinas (RADHAKRISHNAN; KAMALAKAN, 2006). Segundo Meyskens *et al.* (1999) o NF-κB tem a regulação influenciada pelo estado Redox. O NF-κB é inibido por sua proteína inibitória (IκB),

sendo esta última responsiva a estímulos exógenos, como o estresse oxidativo, interferindo desta forma na própria NF- $\kappa$ B. Além disto, NF- $\kappa$ B é também ativado em condições pró-oxidante, enquanto AP-1 (outro fator de transcrição) é estimulada por anti-oxidantes.

As formas de tratamento nos casos positivos de melanoma vão desde a quimioterapia até cirurgia para excisão da área afetada. Para um tratamento quimioterápico eficaz, substâncias inócuas às células normais e que causem uma sensibilização das células cancerosas aos medicamentos favorecem a terapia (SON *et al.*, 2005). Tal utilização diminui as doses necessárias ou suas freqüências e conseqüentemente reduz assim os efeitos colaterais do tratamento convencional que incluem náusea, vômitos, queda de cabelos, queda da resposta do sistema imune, fadiga e feridas na região da boca.

Utiliza-se também a terapia fotodinâmica como forma de tratamento minimamente invasiva e aprovada para o tratamento clínico de vários tipos de câncer e outras doenças não neoplásicas, mas em melanoma sua efetividade é baixa (MA *et al.*, 2007). Esta terapia depende de um sensibilizador que deve ser acumulado especificamente em tecidos neoplásicos e posteriormente ativado por luz, através de um comprimento de onda específico, gerando espécies reativas, principalmente o  $^1\text{O}_2$ , que responde pela citotoxicidade nas células neoplásicas e a conseqüente regressão do tumor (JUARRANS *et al.*, 2008).

### 2.3 METABOLISMO E FUNÇÃO DA GLUTATIONA

A glutathiona consiste em um tripeptídeo composto por  $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina, existindo nos organismos nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (BERG *et al.*, 2004; NO *et al.*, 2006; YOSHIDA, 1996). Existe uma correlação positiva entre os níveis intracelulares de glutathiona reduzida e os mecanismos enzimáticos de proteção contra ROS. Segundo Meister e Anderson (1983), sua função consiste em atuar na síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (LAVRENTIADOU *et al.*, 2001), metabolismo de xenobióticos (YOSHIDA, 1996), sinalização celular (SIES, 1999), além da regulação do processo da melanogênese (NO *et al.*, 2006; MEYSKENS *et al.*, 2001).

A síntese da glutatona em vertebrados ocorre em dois estágios envolvendo uma  $\gamma$ -glutamilcisteína sintase e uma GSH sintase. A própria GSH é um inibidor competitivo da  $\gamma$ -glutamilcisteína sintase, controlando por *feedback* sua formação, e está presente na maioria dos tecidos do corpo humano (YOSHIDA, 1996).

A  $\gamma$ -glutamilcisteína sintase pode ser inibida pela utilização do composto L-Butionina-S-sulfoximina (BSO), que age na enzima de forma irreversível, resultando na depleção da GSH. Esta droga já foi utilizada no tratamento de melanoma metastático em humanos, juntamente com o Melfalano, uma droga antineoplásica, com uma resposta parcial do tratamento, alcançando uma resposta total de cura ao término de quatro ciclos que duraram 18 meses (MEYSKEN *et al.*, 2001).

Os níveis de GSH são controlados também pela sua eliminação para o plasma, sua oxidação à GSSG e sua conjugação com outros substratos. A ligação da GSH com aminoácidos através da  $\gamma$ -glutamil-transpeptidase, gera  $\gamma$ -glutamil-aminoácidos e cisteinil-glicina. Esta reação também ocorre com conjugados de GSH, gerando  $\gamma$ -glutamil-aminoácidos e cisteinil-glicina conjugados, por exemplo, cisteinil-glicina-xenobiótico, a serem secretados na urina após sua conversão em ácido mercaptúrico (SIES, 1999). Esta via pode ser revertida para a obtenção de substratos para a síntese de GSH, hidrolisando cisteinil-glicina para os respectivos aminoácidos por uma ecto ou endopeptidase. O  $\gamma$ -glutamil-aminoácido pode também ser convertido em 5-oxoprolina e usado para a síntese de ácido glutâmico.

A glutatona faz parte de um ciclo onde sua oxidação e redução é realizada por um conjunto de enzimas, a saber: glutatona redutase (GR), que faz a conversão da GSSG à 2GSH, à custa de  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ , fazendo, portanto, a reciclagem da glutatona à sua forma reduzida; glutatona Oxidase (GO), que realiza a oxidação da GSH à custa de um  $\text{O}_2$ , gerando  $\text{H}_2\text{O}_2$  que será posteriormente convertido à  $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  pela catalase ou pela glutatona peroxidase (GSH-Px), esta última que oxida a GSH à custa de um  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gerando 2  $\text{H}_2\text{O}$  (FLOHE *et al.*, 1973; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), como demonstrado na FIGURA 2.

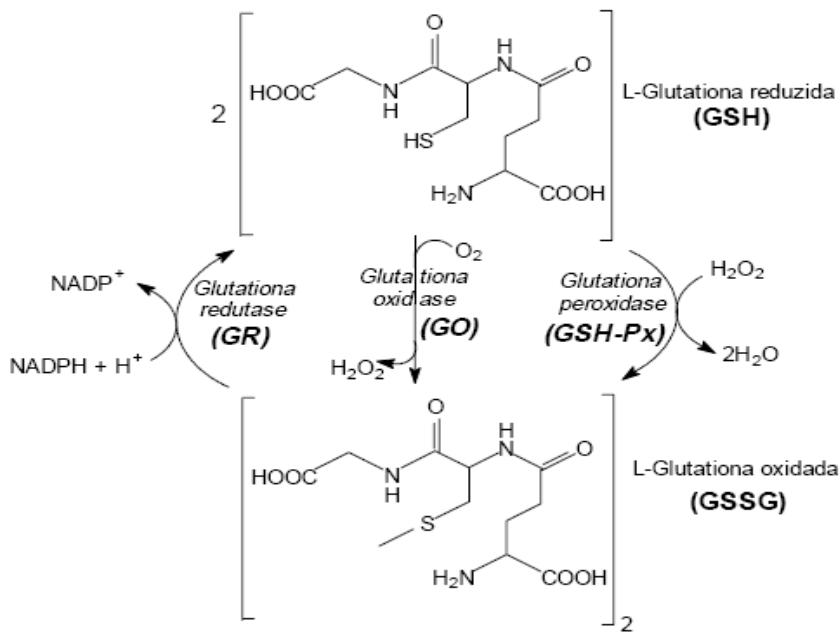


FIGURA 2- Ciclo da glutatona

FONTE: ROVER JUNIOR *et al.* (2001)

A Glutatona peroxidase contém uma seleno-cisteína em sua estrutura, essencial para sua atividade. Quatro tipos de GSH-Px são conhecidas. A glutatona peroxidase clássica, ou GPx1 ou cGPx, descoberta em 1957 em eritrócitos, por ser citosólica, é amplamente distribuída em tecidos animais e é mais específica com a GSH como doador de hidrogênio. Existe também uma forma gastrointestinal da glutatona peroxidase, também denominada de GPx2, ou GI-GPx, caracterizada em 1993, com a função de degradação de hidroperóxidos solúveis ingeridos na dieta. Também é encontrada no fígado humano, juntamente com a GPx1 e GPx4 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A fosfolípido hidroperóxido glutatona peroxidase (WANG *et al.*, 2001), denominada de GPx4 ou de PHGPx, que é a única que possui a capacidade de reduzir não somente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peróxidos orgânicos sintéticos, mas também hidroperóxidos de ácidos graxos e de colesterol, que são posteriormente esterificados. Para comparação, a GPx1 e GPx2 não agem sobre peróxidos de colesterol, e a GPx4 não somente realiza esta reação como também age sobre peróxidos de ácidos graxos no interior de membranas e de lipoproteínas.

Outra forma desta enzima é a glutatona peroxidase plasmática, cuja forma tetramérica a faz apresentar cinética e estrutura diferente das demais, com sua função incerta, devido aos naturalmente baixos níveis plasmáticos de GSH, na



ordem de  $\mu\text{mol/L}$ , embora o  $K_m$  desta enzima para a GSH é da ordem de  $\text{mmol/L}$  (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Além disso, uma enzima importante no estudo relacionada com níveis de glutathiona é a enzima glutathiona S-transferase (GST, EC. 2.5.1.18), pois sendo uma enzima metabolizadora de xenobióticos que catalisa a conjugação de vários componentes eletrofílicos com a glutathiona, está estreitamente relacionada com a quantidade de glutathiona intracelular (SAVIC-RADOJEVIC *et al.*, 2007).

Este conjunto de enzimas realiza a importante manutenção dos níveis de glutathiona reduzida e oxidada. Devido à sua importância, a quantidade de glutathiona é considerada como um tampão de sulfidrilas e, interfere em muitos parâmetros celulares (BERG *et al.*, 2004). Os valores, em células normais, dos níveis de GSH são entre 0,5 a 10  $\text{mmol/L}$ . Seus níveis são mantidos também pela sua ligação excepcional ( $\gamma$ ), que protege este tripeptídeo da degradação pelas aminopeptidases (SIES, 1999).

Segundo Kachadourian e Day (2006), a depleção nos níveis de GSH é uma estratégia potencial para a sensibilização de células cancerosas, apesar da tendência do tumor em manter elevado o nível deste tripeptídeo, provavelmente devido à sua alta taxa de proliferação, alto metabolismo e altas taxas da produção de ROS.

A alteração na razão GSH/GSSG é indicador da proporção da oxidação da glutathiona a partir de sua forma reduzida, denominado estado redox (GHIBELLI *et al.*, 1999). Este fator auxilia no diagnóstico de alguns tipos de câncer e doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Algumas alterações fisiológicas também causam modificações na concentração da glutathiona reduzida, como anemias causadas por infecções, utilização de drogas oxidantes e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). O nível normal intracelular desta relação é de 500 (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001). Tal razão monitora a magnitude do estresse oxidativo. Quando o excesso de GSSG ocorre no espaço intracelular, este ambiente oxidante propicia a formação de pontes dissulfeto entre proteínas, acarretando alterações nas suas funções (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Devasagayan *et al.* (1991) descreveram também outros produtos formados a partir da oxidação de GSH, utilizando-se a geração de  $^1\text{O}_2$  pela termodissociação do endoperóxido NDPO<sub>2</sub>. Entre os produtos detectados, destaca-se a glutathiona sulfinato (GSO<sub>2</sub>H, 2%), Glutathiona sulfóxido (GSSOG, 14%), glutathiona sulfonato

(GSO<sub>3</sub>H, 8%), glutathiona dissulfeto (GSSG, 63%) e compostos não identificados (13%).

Existe também um transportador de membrana que possui afinidade por ambas as formas GSH e GSSG, podendo alterar a razão GSH/GSSG, de fato, em células H69AR (câncer de pulmão) a expressão de tal receptor reduz a quantidade celular de GSH (LABERGE *et al.*, 2007). Tal transportador, denominado de proteína de resistência a múltiplas drogas 1 (MRP1) ou proteína de membrana *ATP binding cassette 1* (ABCC1) é conhecido como uma das causas de resistência aos fármacos, ocasionando o insucesso no tratamento de alguns cânceres (HE *et al.*, 2003; LABERGE *et al.*, 2007).

Benlloch *et al.* (2005) descreveram que em linhagens de células B16M de melanoma murino, a linhagem B16-F10 possui níveis mais altos de GSH que os da linhagem B16-F1, o que está relacionado à maior capacidade de fazer metástase das B16-F10, porém de igual forma, superexpressa Bcl-2, que inibe o efluxo de GSH através da MRP-1, aumentando os níveis de GSH intracelular e resultando em uma maior resistência destas células à agentes citotóxicos.

## 2.4 FLAVONÓIDES

Flavonóides são uma grande família de compostos polifenólicos sintetizados por plantas que possuem uma estrutura química comum. Ocorrem naturalmente em um amplo número de frutas, vegetais, bem como em algumas bebidas, por exemplo, chás, vinho tinto, café e cerveja. Segundo Rusak *et al.* (2005), o consumo de diferentes flavonóides pela população europeia pode chegar a 1g/dia, dependendo das fontes alimentares. Contudo, Firuzi *et al.* (2005) afirmam que a presença de flavonóides na dieta humana fica próximo de 23 mg/dia.

Vários autores identificaram muitos destes componentes em plantas constituintes da dieta humana, alguns sendo listados no QUADRO 1.

<b>FLAVONÓIDE</b>	<b>ALGUMAS FONTES</b>
Epicatequina	Chá verde, maçã, damasco
Catequina	Vinho tinto, cereja, chocolate
Epigalocatequina	Cacau, chocolate, nectarina, pêra, uva
Galato epicatequina	Cacau, chocolate, passas,
Naringina	Frutas cítricas
Taxifolina	Frutas cítricas
Quempferol	Chá preto, alho-poró, brocolis, toranja
Quercetina	Cebola, alface, brocolis, casca de maçã, bagas, olivas, chás, vinho tinto
Miricetina	Vinho tinto, uvas
Crisina	Casca de frutas
Apigenina	Aipo, salsinha
Malvidina	Frutas vermelhas, vinho tinto
Cianidina	Cereja, framboesa, morango , uva
Apigenidina	Frutas coloridas e cascas moles de frutas
Luteolina	Aipo, pimentão, chá de camomila
Flavona	Orégano, cascas moles de frutas, pimentão

#### QUADRO 1- FONTES DOS FLAVONÓIDES NA NATUREZA

FONTE: HALLIWELL e GUTTERIDGE (2007); LOTITO e FREI (2006).

Os flavonóides podem ser divididos em subclasses como, por exemplo: flavonas, flavanonas, flavonóis, flavanóis (catequinas) e antocianidinas (LOTITO; FREI, 2006), entre outras. Estas classificações são variadas conforme os autores consultados. Suas propriedades de componentes bioativos naturais como quimiopreventivos ou terapêuticos tornam este compostos alvo de intensas pesquisas.

Janich *et al.* (2006) revelam que os polifenóis presentes no extrato de *vitis vinifera* (procianidina B1 e B3, catequina, e flavanóis não identificados) são capazes de sequestrar espécies reativas, inclusive o oxigênio singlete, gerado a partir de fotossensibilização com Rosa Bengala.

Em 2008, De Rosso *et al.* verificaram que os antocianinos, que são pigmentos flavonóides naturais, possuem a capacidade de seqüestrar espécies reativas, como o oxigênio singlete. Neste estudo, utilizando-se de azul de metileno e perinaftenona

como sensibilizadores para a geração do oxigênio singlete, foi encontrado que a extinção deste último se deu através de mecanismo de transferência de carga e modulado pelo número de substituintes –OR dos flavonóides.

Yang *et al.* (2009) testaram a capacidade de diferentes flavonóides na proteção da oxidação de óleo submetido a aquecimento (50 a 220°C) e verificaram que flavonóides com uma dupla ligação entre C2-C3 e um grupo hidroxil nos anéis B e C apresentam melhor atividade antioxidante. O fator de proteção (sendo o período de indução da oxidação da amostra/período de indução da oxidação do controle) obtido foi mais alto para quercetina, dihidromiricetina, luteolina e quercemferol, representando uma maior capacidade antioxidante destes compostos.

Alguns estudos indicam que os flavonóides possuem várias propriedades em determinados tipos celulares como: propriedades antiinflamatórias, antialérgicas, antivirais, anticancer (FERRANDIZ; ALCARAZ, 1991; SON *et al.*, 2005; WILMS *et al.*, 2005), de redução da incidência de doenças cardiovasculares (BAZZANO *et al.*, 2005), propriedades antioxidantes (FIRUZI *et al.*, 2005; MOLINA-JIMÉNEZ *et al.*, 2005), antiproliferativa (SON *et al.*, 2005), quelantes, de interferência no ciclo celular (RUSAK *et al.*, 2005) e promoção da apoptose (MERCER, *et al.*, 2005). Embora todas estas propriedades sejam conhecidas, os mecanismos pelos quais os fenômenos ocorrem não são bem estabelecidos.

Os polifenóis, em altas concentrações, podem também apresentar atividade pró-oxidante. Radicais livres podem ser gerados por auto-oxidação e ciclo redox dos flavonóides, colaborando para iniciar a peroxidação de lipídeos em membranas celulares. Podem também prejudicar o sistema das defesas antioxidantes, por exemplo, alterando os níveis de glutathione e a atividade da glutathione-S-transferase e assim induzir indiretamente o estresse oxidativo na célula (MICHELS *et al.*, 2005). Deve ser ressaltado o fato de que doses diferentes podem gerar efeitos pró-oxidantes ou antioxidantes.

Van Zanden *et al.* (2005) trabalharam com células MDCKII (células de rim canino da linhagem Madin-Darby) transfectadas com MRP 1 e 2, e tratadas com quercetina, flavona, apigenina, robinetina, luteolina, miricetina entre outras, nas doses de 1, 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{mol/L}$ . Com tratamento de 25  $\mu\text{mol/L}$  foram encontradas as seguintes inibições de atividade de MRP1: 47% para apigenina, 36% para flavona, 53% para luteolina e 63% para quercetina. A  $\text{IC}_{50}$  (dose requerida para inibir a atividade em 50%) para estes flavonóides foram de  $>50 \mu\text{mol/L}$  para a

flavona,  $35,1 \pm 9,6$  para a apigenina,  $22,4 \pm 4,8$  para luteolina, e  $21,8 \pm 3,5$  para a quercetina. Para a inibição de MRP2, foram encontrados os valores de 2% para a apigenina, 5% para a flavona, 17% para a luteolina e 5% para a quercetina. A  $IC_{50}$  para estes flavonóides foram de  $>50 \mu\text{mol/L}$  para a flavona, apigenina, luteolina e quercetina. Entre outras conclusões, este estudo demonstrou que flavonóides com poucos, ou nenhum, grupo hidroxil e os que não possuem a dupla ligação entre C2 e C3 são os menos potentes inibidores de MRP1.

Lima *et al.* (2006) verificaram comportamentos semelhantes entre a luteolina e a quercetina quando analisaram o dano em DNA induzido pelo *t*-butilhidroperóxido (*t*-BHP). Ambas promoveram uma proteção celular contra este dano e promoveram uma prevenção da depleção de GSH causada pelo *t*-BHP em células HepG2, uma linhagem de hepatoma humano. Sendo a relação entre a prevenção da redução da concentração de GSH e a proteção contra danos ao DNA um fator de interesse por grande parte dos pesquisadores porque pode estar envolvido no potencial anticarcinogênico dos flavonóides, além de atuar na prevenção de outras doenças já descritas por estudos epidemiológicos.

Outro fator de destaque das propriedades dos flavonóides é o fato de agirem de forma seletiva em determinadas vias de transdução de sinal (WAY *et al.*, 2005). Devido à sua estrutura, os flavonóides podem ser absorvidos pelo trato gastrointestinal e serem envolvidos diretamente nas defesas antioxidantes *in vivo*, possuindo potencial terapêutico em alterações que tem envolvimento com o estresse oxidativo (MOON *et al.*, 2000).

#### 2.4.1 APIGENINA

Em estudos utilizando-se tipos celulares diversos como de câncer de cólon, mama, próstata e pele (GUPTA *et al.*, 2001), a apigenina (FIGURA 3) tem demonstrado promover a inibição do crescimento celular, atraso do ciclo celular e indução de apoptose.

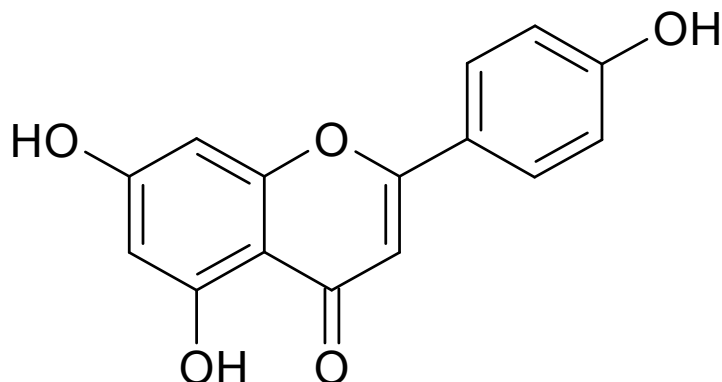


FIGURA 3- Estrutura química da apigenina

FONTE: O Autor (2008)

Liang *et al.* (1999) demonstraram ser a apigenina um potente inibidor da ativação do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), nas doses de 0,5, 1, 5, 10 e 20  $\mu$ mol/L por 1h, fato que possivelmente está relacionado com a regulação do ciclo celular e apoptose.

Em células HeLa (carcinoma cervical humano) a apigenina (37 a 74  $\mu$ mol/L) promoveu a diminuição na viabilidade celular, com os efeitos mais pronunciados em 36, 48 e 72 h após o tratamento. Segundo os mesmos autores, esta inibição está relacionada com indução de apoptose e/ou atraso do ciclo celular (ZHENG *et al.*, 2005).

Porém, no estudo de Tsuji e Walle (2007) utilizando-se hepatócitos normais de truta Arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a apigenina apresentou efeitos tóxicos na proliferação celular equivalentes aos da crisina, outro flavonóide, e maiores que os efeitos da luteolina e quercetina. A explicação apresentada pelos autores foi de que a presença de atividade de peroxidase nestas células é capaz de oxidar as flavonas para produtos tóxicos e a presença de maiores conteúdos de GSH auxilia na inibição deste efeito.

Way *et al.* (2005) demonstraram a capacidade da apigenina de induzir a liberação do citocromo c em células de câncer de mama de maneira dependente de dose (de 10 a 40  $\mu$ mol/L) e causar uma rápida indução da ativação da caspase-3. Foram encontrados resultados que sugerem uma supressão da superexpressão do gene HER2/neu nestas células. Este gene (HER2/neu) tem uma importância especial neste tipo de câncer, pois sua expressão aumentada possui alto valor

prognóstico, correlacionando-se com baixa sobrevivência, por associar-se ao aumento do potencial metastático e resistência a agentes quimioterápicos.

Outra atuação da apigenina, nas doses de 37 a 74  $\mu\text{mol/L}$ , na indução da apoptose foi pesquisada por Zheng *et al.* (2005) que perceberam que as células HeLa apresentaram um aumento tempo-dependente da proteína p53. Correlacionando-se com os resultados da também aumentada proteína p21, que é uma alvo a “*downstream*” do p53, sugere-se que a apoptose mediada por apigenina e o atraso do ciclo celular na fase G1 nas células HeLa ocorre de maneira dependente de p53 e p21. Ocorre também uma redução significativa dos níveis de Bcl-2 de maneira dependente do tempo de tratamento com a droga, indicando uma modificação nesta proteína de forma correlacionada com a indução das vias apoptóticas.

Em células da linhagem H69AR (células pequenas de câncer de pulmão), foi mostrado que a apigenina (30  $\mu\text{mol/L}$ ), entre outras atividades, apresentou uma característica de ter sua afinidade aumentada pela MRP1 com o aumento da concentração de GSH. Contudo a apigenina não aumentou a afinidade da GSH com MRP1, ou seja, não teve um efeito recíproco. Neste trabalho foi demonstrado também que a GSH é transportada através da membrana na presença da apigenina (ROTHNIE *et al.*, 2008).

#### 2.4.2 FLAVONA

A flavona é um flavonóide com influência comprovada na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial nas concentrações de 50, 75, 100, 150 e 200  $\mu\text{mol/L}$ , de forma dose dependente (VALDAMERI, 2008), cuja estrutura química está representada na FIGURA 4. Possui propriedades de indução da apoptose em células BV-173 da fase aguda de leucemia humana, que exibiram condensação e quebra do núcleo, comportamentos típicos da apoptose, comprovados pela análise com Anexina-V, na concentração de 200  $\mu\text{mol/L}$  (MATSUI *et al.* 2005). Neste mesmo estudo, foi demonstrada a perturbação do potencial transmembrana mitocondrial e ativação de caspase-3 na mesma concentração.

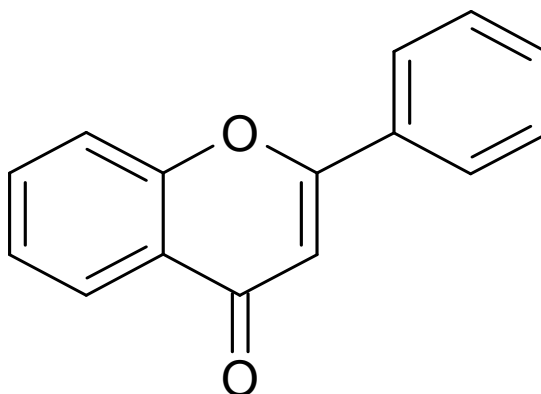


FIGURA 4- Estrutura química da flavona

FONTE: O Autor (2008)

Wenzel *et al.* (2005) demonstraram que o tratamento por 24h com a flavona (150  $\mu\text{mol/L}$ ) induz apoptose em células de câncer de cólon humano da linhagem HT-29, e aumenta a captação de palmitoilcarnitina devido ao aumento do transporte mitocondrial de ácidos graxos. Foi demonstrada uma associação destes eventos com um aumento na geração de radical superóxido, o que pode ser o fator desencadeante da apoptose.

#### 2.4.3 LUTEOLINA

A luteolina (FIGURA 5) é um importante membro da família das flavonas que contribui para a prevenção da oxidação de LDL mediado por  $\text{Cu}^{2+}$ , além de possuir propriedades antialérgicas e inibidora da topoisomerase I (KIMATA *et al.*, 2000).

Michels *et al.* (2005) demonstram que a luteolina (250  $\mu\text{mol/L}$ ) apresenta atividade de indução da apoptose em células H4IIE de hepatoma de ratos após tratamento por 24h. A luteolina (100 $\mu\text{mol/L}$ ) induziu um pequeno, mas significativo aumento da peroxidação lipídica quando incubada por 24h, sugerindo um efeito pró-oxidante.

Nos estudos de Bandele e Osheroff (2007), a luteolina na concentração de 50  $\mu\text{mol/L}$  se revelou capaz de promover quebras no DNA na presença da



topoisomerase II humana, mas não promoveu quebras na ausência da enzima, demonstrando sua influência sobre esta.

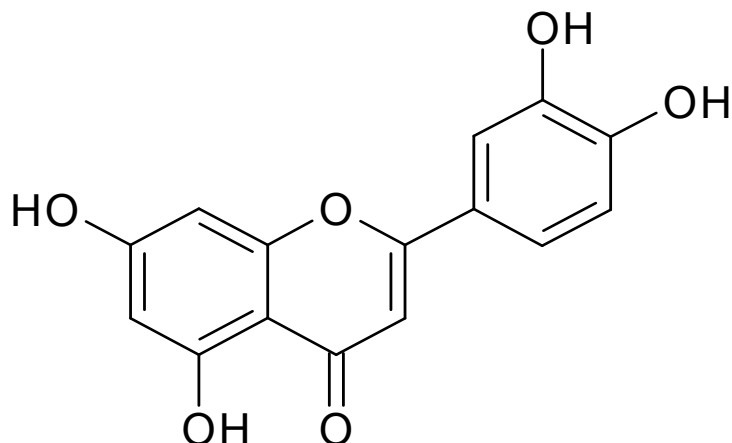


FIGURA 5- Estrutura química da luteolina

FONTE: O Autor (2008)

Foi também demonstrado por Van Zanden *et al.* (2004) que a luteolina e a quercetina apresentaram forte inibição para a GST P1-1 (uma isozima de GST), com IC<sub>50</sub> na doses de 0,8 e 1,3  $\mu\text{mol/l}$ , respectivamente, para células MCF7 (células de câncer de mama).

Outros estudos não obtiveram os mesmos promissores resultados. Por exemplo, a luteolina, quando administrada dieteticamente por 3 semanas (1,2 mg/peso corporal/dia) não apresentou aumento dos níveis de GSH em células normais de cólon de ratos. Neste mesmo estudo, a luteolina não apresentou também diferenças na atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, e nos níveis de vitaminas C, E e A (ASHOKKUMAR *et al.*, 2008).

#### 2.4.4 QUERCETINA

Dentre os flavonóides, a quercetina é um dos mais abundantes da natureza. Na FIGURA 6 encontra-se sua estrutura química, este flavonóide pertence à classe dos flavonóis (FIRUZI *et al.*, 2005). Em uma dieta normal, a ingestão de quercetina

pode chegar a 16 mg/dia (WILMS *et al.*, 2005). Tal quantidade diária ingerida explica a importância da pesquisa com este flavonóide.

Vásquez-Garzón *et al.* (2009), utilizando-se de um marcador de lesão hepática, a  $\gamma$ -glutamil transpeptidase, em ratos machos após receberem uma dose de dietilnitrosamina, um agente cancerígeno e mutagênico que altera a função hepática pela geração de ROS, a quercetina nas doses de 2, 5, 10, 25 e 50 mg/kg de peso, reduziu a lesão hepática em 66,2%, demonstrando sua capacidade de interferir na resposta ao estresse oxidativo. Além disto, a quercetina foi capaz de aumentar os níveis de GSH em 22% em 12h após o tratamento quando ministrada junto com o DEN (dietilnitrosamina, um indutor de estresse oxidativo e injúria celular).

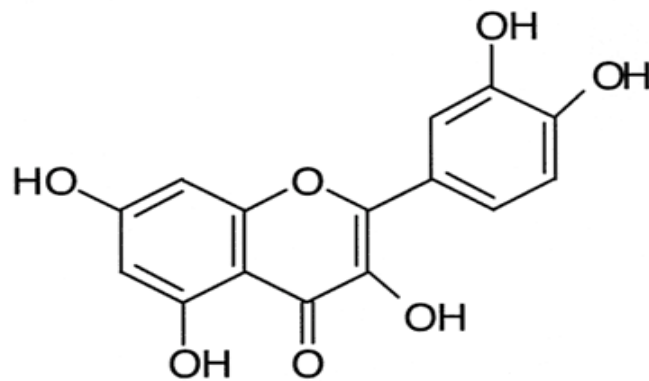


FIGURA 6- Estrutura química da quercetina

FONTE: O Autor (2008)

Em células de câncer gástrico, quando tratadas com 70  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina por 24h (YOSHIDA *et al.*, 1990), e em células T de leucemia humana com tratamento com 70  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina por 15h (YOSHIDA *et al.*, 1992), a quercetina bloqueou o ciclo celular na transição de fase G1. Diferentemente, gerou um bloqueio em G2/M em células de câncer de laringe com doses de 0,01 a 5  $\mu\text{mol/L}$  (FERRANDINA *et al.*, 1998), câncer de mama humano com 23,1  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina por 6 dias (ÁVILA *et al.*, 1994) e em células de leucemia aguda humana com 70  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina por 24 e 48h (RUSAK *et al.*, 2005).

Outra propriedade da quercetina, apresentada por Wilms *et al.* (2005) é a de proteção dos linfócitos dos danos ao DNA, quando estes foram incubados com quercetina nas doses de 1, 10, 50 e 100  $\mu\text{mol/L}$  por 1h, a 37°C e posteriormente

incubados na presença de peróxido de hidrogênio a 25  $\mu\text{mol/L}$  por mais 1h a 37°C. Estes autores concluem que a base das propriedades anticarcinogênicas da quercetina pode ser devido à proteção do DNA de linfócitos humanos de danos oxidativos no modelo avaliado.

Firuzi *et al.* (2005) verificaram a capacidade da quercetina e da miracetina em reduzir  $\text{Fe}^{3+}$ . Segundo estes autores, devido à presença do grupo catecol no anel B, o grupo OH na posição 3 e a dupla ligação em  $\text{C}_{2,3}$  no anel C, uma oxidação bi-eletrônica pode ocorrer, que inicia a produção de duas estruturas quinônicas, altamente estáveis. Quando essa propriedade foi comparada com compostos como o resveratrol, trolox e ácido úrico, a quercetina apresentou uma capacidade redutora de 3x, 2,7x e 5,3x maior que a capacidade destes componentes, respectivamente, sendo os flavonóides considerados ativos como redutores.

Está bem estabelecido que o oxigênio singlete é capaz de promover o aumento da quebra de plasmídeo de DNA de fita simples. No estudo de Devasagayan *et al.* (1995), a quercetina reduziu inicialmente as quebras, mas não protegeu em tempo de incubação mais longos (120 min). A explicação para este fato dada pelos autores foi que a quercetina, algum produto ou intermediário, poderia reagir com a base do DNA, e assim a razão da formação de quebras foi mais lenta no início, mas sem proteção no platô.

Em cultura de melanócitos normais da epiderme, a quercetina induziu a melanogênese, induzindo a atividade da enzima tirosinase, sem elevar os níveis de mRNA para esta enzima (NAGATA *et al.*, 2004). Segundo Rusak *et al.* (2005), a quercetina (10, 20, 50 e 70  $\mu\text{mol/L}$ ) apresentou também atividade antiproliferativa em células HL-60 após 48 a 72h de incubação, sendo este flavonóide o de maior ação dentre os estudados por este autor (kaempferol, isorhamnetina, taxifolina, quercetina e miricetina e metilquercetagina). Neste mesmo estudo comprovou-se o aumento do número de células em apoptose na presença de quercetina, de maneira dose-dependente.

Nas células B16-F10 em meio DMEM, Nitoda *et al.* (2008) realizaram o tratamento com quercetina (doses de 5, 10, 20, 40 e 80  $\mu\text{mol/L}$ ) por 72h e encontraram uma resposta citotóxica potente, com  $\text{IC}_{50}$  em 20  $\mu\text{mol/L}$ , com completa letalidade em 80  $\mu\text{mol/L}$ . A diferença na viabilidade foi verificada já na dose de 10  $\mu\text{mol/L}$ , quando comparado com o controle. Também foi verificada uma menor

quantidade de melanina para as células tratadas com 40  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina. A explicação para este fato foi devido ao aumento da atividade e da síntese da enzima tirosinase.

No estudo realizado por Forni *et al.* (2008) foi encontrado que o crescimento reduzido, induzido pelo tratamento com quercetina (10  $\mu\text{mol/L}$ ) em B16-F10 pelo tempo de 48 e 72h, aumentou a atividade da transglutaminase 2, que é considerada um dos indicativos de diferenciação celular. Isto foi o principal indicativo para que os autores concluíssem que o efeito antiproliferativo da quercetina pode ser devido à diferenciação celular.

Em outro estudo, utilizando-se de fibroblastos de camundongo C3H foi verificado, por ensaio cometa, um aumento (35%) na quebra de DNA quando essas células foram incubadas com  $\beta$ -caroteno (20  $\mu\text{mol/L}$ ) e expostas à radiação UVA (7.6  $\text{kJ/m}^2$ ). A pré-incubação com quercetina (10 e 23  $\mu\text{mol/L}$ ) reduziu significativamente a quebra de DNA induzida por UVA e  $\beta$ -caroteno. Foram verificados neste mesmo estudo também a geração de oxigênio singlete na radiação UVA e que a quercetina não é capaz de suprimí-lo diretamente, embora tenha apresentado a maior absorção da radiação UVA dentre os flavonóides estudados (YEH *et al.*, 2005). Neste mesmo estudo foram testados também os flavonóides rutina e naringina, os quais foram mais eficientes na proteção do DNA e na supressão do oxigênio singlete do que a quercetina (YEH *et al.*, 2005).

### 3. OBJETIVOS

Como descrito anteriormente, sabe-se que os níveis de glutathiona reduzida e oxidada são importantes para a manutenção das defesas contra o estresse oxidativo, porém, não são conhecidos os efeitos dos flavonóides como tratamento às células B16-F10 e como estes flavonóides atuam como tratamento anterior ao gerador de oxigênio singlete.

Desta forma, torna-se importante analisar os efeitos do tratamento com flavonóides na presença e na ausência de oxigênio molecular singlete na viabilidade e nos níveis de glutathiona total (GSx) e oxidada (GSSG) nas células de melanoma murino B16-F10.

Para isto foram enumerados como objetivos:

- Avaliar os efeitos da apigenina, flavona, luteolina e quercetina na viabilidade células de melanoma murino B16-F10;
- Avaliar os efeitos da apigenina, flavona, luteolina e quercetina como tratamentos anteriores ao tratamento com o gerador de oxigênio singlete na viabilidade células B16-F10;
- Mensurar os níveis de glutathiona total e de glutathiona oxidada em células B16-F10 tratadas com os flavonóides apigenina, flavona, luteolina e quercetina;
- Mensurar os níveis de glutathiona total e oxidada em células B16-F10 tratadas com os flavonóides (quercetina, flavona, apigenina e luteolina) e posteriormente com o gerador de oxigênio molecular singlete.
- Verificar a interferência do tratamento com os flavonóides apigenina, flavona, luteolina e quercetina na atividade da enzima glutathiona-S-transferase de células B16-F10.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. SOLUÇÕES

Para o preparo das soluções foi utilizada água ultrapura proveniente do purificador de água Master System Gehaka a partir de água destilada, recém-preparada em aparelho Corning Glass Work, modelo AG 10A.

A solução salina-fosfato tamponada (PBS) foi preparada como solução estoque concentrada 5x. Esta solução concentrada era constituída de: NaCl 680 mmol/L, KCl 13,4 mmol/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  40,5 mmol/L (pH 7,5). A solução foi esterilizada em autoclave (120°C; 1 kgf/cm<sup>2</sup>, 30 minutos) e armazenada a 4°C. Para o uso, a solução foi diluída com água ultrapura autoclavada.

A solução de bicarbonato de sódio (7,5%, p/v) foi previamente esterilizada em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm<sup>2</sup> por 30 min, e para o HEPES (20 mmol/L) (pH 7,0) foi previamente esterilizado por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm (Millipore®).

A solução de tripsina-EDTA era constituída de NaCl 137 mmol/L, KCl 5,4 mmol/L, glucose 5 mmol/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,42 mmol/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,44 mmol/L,  $\text{NaHCO}_3$  2,3 mmol/L, EDTA 0,53 mmol/L, 50 mg % tripsina (1:250) e 2 mg % de vermelho de fenol, sendo o pH ajustado para 7,4 com bicarbonato de sódio. A solução foi esterilizada por filtração a vácuo e armazenada a -20 °C.

### 4.2. CULTIVO CELULAR

Todo material utilizado para os procedimentos de cultivo de células (frascos de vidro para armazenamento de soluções, frascos de descarte de material, lamínulas, equipamento para filtração sob pressão, rolhas, tampas, pipetas de vidro, microtubos de 1 e 2 mL, e ponteiros de pipetas automáticas) foram esterilizados em autoclave (Fanen) a 120°C, durante 30 minutos, a 1 kgf/cm<sup>2</sup>. Os demais materiais utilizados no cultivo celular (garrafas estéreis para o cultivo, placas de cultivo de 6, 12, 96 poços, placas Petri de 10 mm) foram adquiridos estéreis e mantidos sob condições ideais de armazenamento conforme especificações do fabricante.

O meio de cultura utilizado neste trabalho foi o meio RPMI 1640 (Cultilab), reconstituído em água ultrapura e esterilizado por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore®) sob pressão em aparelho Sartorius. Após o procedimento de filtração, alíquotas do meio foram deixadas em estufa 37°C, para acompanhamento do aparecimento de eventuais contaminantes. Os meios foram mantidos congelados ou em geladeira a 4°C. Para os experimentos os meios foram suplementados com quantidade adequada (7,5%) de soro fetal bovino estéril (Cultilab). O pH do meio foi ajustado para pH 7,4 com quantidades adequadas de solução de bicarbonato de sódio e HEPES.

A linhagem celular usada neste trabalho B16-F10 foi cultivada em RPMI contendo 7,5% de soro fetal bovino (SFB). As culturas foram mantidas em estufa (Sanyo), em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, com umidade controlada de 95% e temperatura constante de 37°C. Os repiques foram realizados seguindo a rotina do laboratório, utilizando solução de tripsina-EDTA para descolar as células. Para armazenamento das linhagens, 10<sup>7</sup> células.mL<sup>-1</sup> foram suspensas em meio de cultura, acrescido de soro fetal bovino 40% (v/v) e DMSO 10% (v/v), e congeladas inicialmente a -70°C, e a seguir em nitrogênio líquido. Para uso as células foram descongeladas a 37°C e semeadas no meio adequado como já descrito. Após adesão das células à superfície da garrafa (~4h), o meio foi trocado, eliminando-se o meio de congelamento contendo o DMSO e eventuais células mortas. A monocamada de células foi rotineiramente observada em microscópio invertido (Olympus, modelo CK2).

#### 4.3 SOLUÇÕES DE FLAVONÓIDES

Para o preparo da solução estoque com a concentração de 200  $\mu\text{mol/L}$ , os flavonóides foram solubilizados em dimetilsulfóxido estéril (DMSO). A flavona, luteolina, apigenina e quercetina foram adquiridas da Sigma Chemical Co. (EUA).

#### 4.4 SOLUÇÕES DE GLUTATIONA

Os padrões de glutathiona reduzida e a glutathiona oxidada foram adquiridas da Sigma Chemical Co. (EUA) e solubilizadas em água ou em HCl quando indicado e

utilizadas em concentrações conhecidas (10; 5; 2; 1; 0,5; 0,1 mmol/L) para as curvas de padronização dos métodos colorimétrico e para as reações enzimáticas.

#### 4.5 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM FLAVONÓIDES

Para o ensaio de viabilidade celular, as células ( $3 \times 10^4$ ) foram plaqueadas em placas de 96 poços e para a mensuração de GSx e GSSG intracelular, as células ( $2 \times 10^4$  céls) foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após 24 h foram adicionados os flavonóides nas doses de 10, 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  diluídos em meio de cultura a partir da solução de 200  $\mu\text{mol/L}$  em DMSO, ou DMSO na concentração final de correspondente a quantidade máxima aplicada no tratamento com o flavonóide (0,01%); seguindo-se a incubação por 24h.

#### 4.6 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE

A geração do  $^1\text{O}_2$  foi realizada a partir de uma fonte química, neste caso o endoperóxido da *N,N'*-di(2,3 dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida ou DHPNO<sub>2</sub> (FIGURA 7) previamente preparado conforme descrito no item 4.7.

Após o tratamento de 24h com os flavonóides, o DHPNO<sub>2</sub> foi aplicado para concentração final de 10 mmol/L em meio de cultura sem SFB e a incubação foi feita a 37°C por 2h que é o tempo necessário para decomposição de 99% do composto com geração de 59% do oxigênio molecular no estado singlete (KLOTZ *et al.*, 1999).



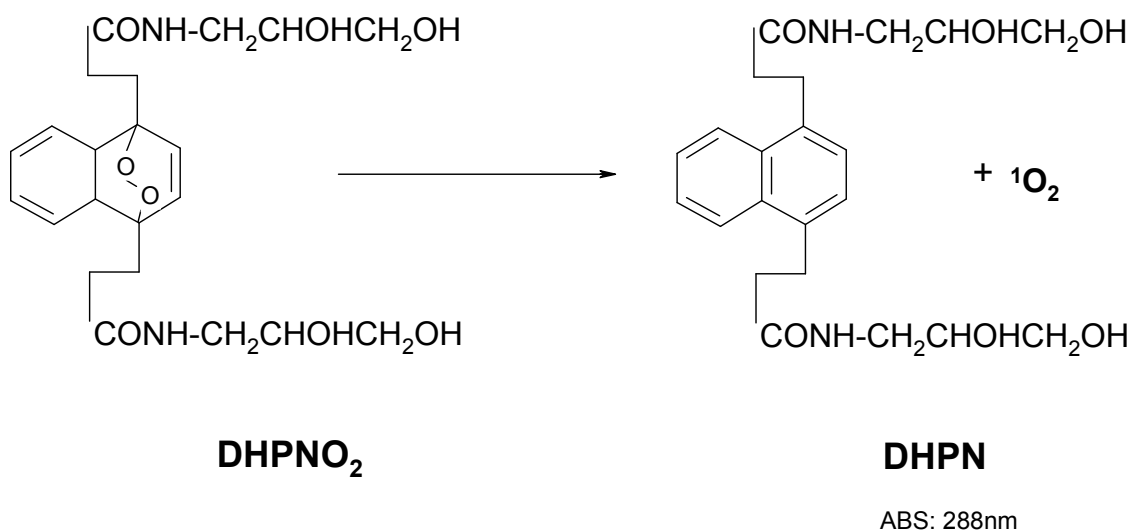


FIGURA 7: Mecanismo químico de geração do  $^1\text{O}_2$

FONTE: O autor (2009)

#### 4.7 SÍNTESE DO ENDOPERÓXIDO GERADOR DO OXIGÊNIO SINGLETE

O DHPNO<sub>2</sub> foi preparado em um balão pequeno de fundo redondo, no qual foram colocados 200 mg de DHPN em 2 mL de água deuterada e 100 µL de azul de metileno 5 mg/mL, que atuou como sensibilizador, com borbulho de oxigênio, proveniente de um cilindro de oxigênio puro comprimido (adquirido da marca White-Martins), com pequena vazão. Esta reação foi realizada dentro de um banho com gelo, mantido à temperatura entre 0 e 4°C e irradiada constantemente por uma lâmpada de mercúrio de 500W (Figura 8). A reação foi mantida por um período inicial de 6h, e analisada quanto à eficiência da síntese do endoperóxido e seguido por períodos de 2h em mensurações sucessivas da absorbância em 288 nm, que é o comprimento de onda de absorção do anel naftalênico. Quando a eficiência alcançou 89% ou mais, a reação foi interrompida e acrescentada a resina Dowex, para a completa absorção do azul de metileno. O sobrenadante foi filtrado em membrana polimérica de 0,22 µm e estocado em nitrogênio líquido. Para uma completa recuperação do endoperóxido, foram realizadas lavagens sucessivas da resina com água deuterada e compressão em seringa de 20 mL com o filtro. Estas frações formadas também foram mensuradas e armazenadas no nitrogênio líquido.

A concentração do endoperóxido foi determinada espectrofotometricamente a 288 nm coletando-se amostras de 5µL e diluindo-se em 10 mL de água ultrapura. A

solução foi misturada por agitação e realizou-se a leitura em 288 nm, em um espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-2450PC, esta foi considerada como leitura de absorvância inicial. Após um período de 2 h, a solução foi mantida em banho a 50°C, e novamente mensurada a absorvância, considerando-se esta como absorvância final. Os valores de absorvância foram transformados em concentração, considerando o  $\epsilon$  do DHPN em 288 nm =  $7780 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e o  $\epsilon$  do DHPNO<sub>2</sub> em 288 nm =  $140 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e a pureza (%) representa a fração de endoperóxido presente na mistura. A quantidade de DHPNO<sub>2</sub> final foi calculada pela fórmula:  $\% = [1 - (\text{abs } i / \text{abs } f)] / [1 - (140/7780)]$ , considerado (abs i) a absorvância inicial, (abs f) a absorvância final, conforme descrito acima.

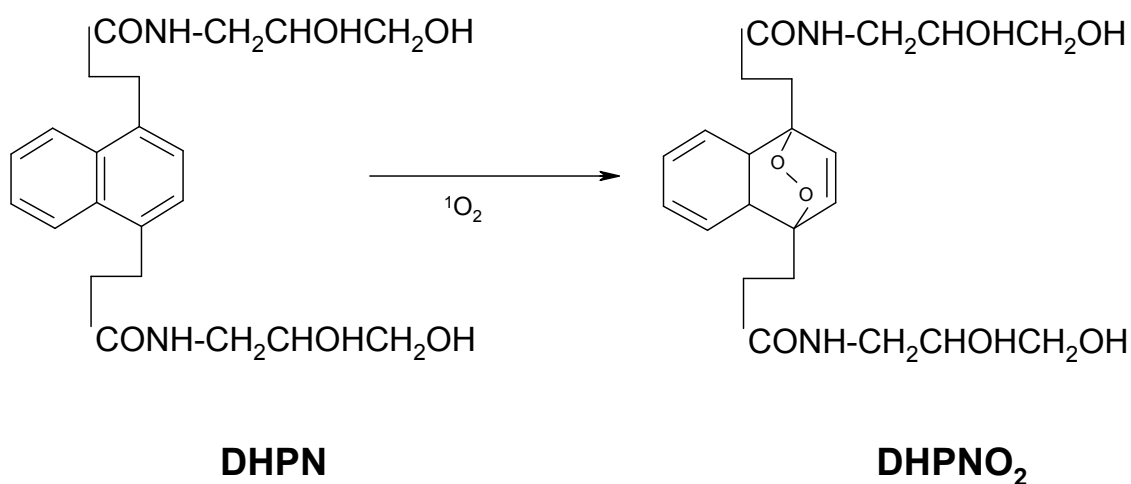


FIGURA 8: Mecanismo de síntese do endoperóxido a partir do DHPN.

FONTE: O autor (2009)

#### 4.8 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados na ausência e presença dos flavonóides e posterior incubação na presença de DHPNO<sub>2</sub>. As células ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços e deixadas por 24 h em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C para aderirem. Após 24 h, o meio foi trocado por meio sem SFB na presença e na ausência dos compostos em estudo em triplicata, nas concentrações e tempos conforme descrito nos itens 4.5 e 4.6.

A viabilidade celular foi quantificada através do corante cristal violeta conforme proposto por Gillies, *et al.* (1986). Após o tempo determinado as células não viáveis foram aspiradas e aquelas aderidas à placa foram fixadas em metanol por 10 min em temperatura ambiente. Às células aderidas foram acrescentados 50  $\mu$ L da solução do corante cristal violeta (N-hexametilpararosanilina), preparado a 0,2% em etanol 2%. Após 2 a 5 minutos, os poços foram exaustivamente lavados (10 vezes com PBS) e o corante dissolvido com 200  $\mu$ L de solução de citrato de sódio 0,05 mol/L em etanol 50%, durante 10 minutos, no próprio poço da placa. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Micro-Elisa Reader, Bio-Rad) utilizando filtro de 590 nm. Os resultados foram expressos em % de células viáveis em relação ao controle.

#### 4.9 DETECÇÃO DE GLUTATIONA TOTAL E GLUTATIONA OXIDADA POR MÉTODO COLORIMÉTRICO

Foram seguidos os protocolos de Griffith (1980), He *et al.* (2003), Rahman *et al.* (2007) adaptados. Após o tratamento descrito nos itens 4.5 e 4.6, foi retirado o sobrenadante e efetuada uma lavagem com PBS para a retirada de eventuais células mortas. Foram acrescentados 450  $\mu$ L de HCl 10 mmol/L e as células retiradas com *Scraper* e estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para a análise, as células foram lisadas por processo de congelamento e descongelamento por 5x. Foram centrifugadas a 10.000g por 10 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$  e 350  $\mu$ L do sobrenadante foram coletados. Deste volume, 50 $\mu$ L foram retirados para a quantificação de proteína pelo método de Bradford (1976), item 4.11. Aos 300 $\mu$ L restantes, foi adicionado 300 $\mu$ L de ácido 5-sulfosalicílico e misturado em Vortex.

Para a precipitação de proteína, as amostras foram deixadas em gelo por 5 minutos, quando foi realizada nova centrifugação a 10.000g por 10 minutos, com as amostras ainda mantidas em  $4^{\circ}\text{C}$ . Foram coletados 200 $\mu$ L do sobrenadante e separados em 2 alíquotas iguais de 100  $\mu$ L, uma para a quantificação de GS total e outra para GSSG.

Para a alíquota que foi mensurada GSSG, 2-vinilpiridina foi adicionada para a concentração final de 2% (v/v), a solução foi misturada em Vortex e deixada por 1 h

na capela, fora do gelo. A neutralização foi realizada com adição de trietanolamina (0,05 mmol/L), para um pH final igual a 7.

Foram distribuídos 20 $\mu$ L da amostra para a quantificação de GS total por poço da placa de 96 poços e para GSSG foram utilizados 60 $\mu$ L.

Imediatamente, 100 $\mu$ L da mistura fresca preparada (DTNB 5,5'-ditio-bis(2-ácido nitrobenzoico) 6 mmol/L; tampão fosfato/EDTA pH 7.5 e 20 unidades de glutathion redutase) foram pipetados em cada poço. Após esta adição, foram adicionados 50  $\mu$ L de NADPH (1 mmol/L).

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

As amostras foram mantidas no gelo durante todo o desenvolvimento da metodologia de análise, a partir de sua retirada da placa de cultivo e tratamento, com exceção do tempo necessário para a derivatização com a 2-vinilpiridina, que apresentou maior eficiência em temperatura ambiente, sem alteração dos valores mensurados para os padrões de GSH e GSSG (dados não mostrados). Tal procedimento está de acordo com o protocolo proposto por Rahman *et al.* (2007).

#### 4.10 MEDIDA DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A medida da atividade da GST (EC. 2.5.1.18) foi determinada com as células lisadas, centrifugadas e o conteúdo de proteína estimado. 20  $\mu$ g de proteína do sobrenadante foi adicionado a uma solução de 0,1 mol/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6,5), com 1 mmol/L de GSH como substrato e iniciada com a concentração final de 1mmol/L de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno em solução etanólica 20x. E sua alteração na absorbância verificada em um espectrofotômetro modelo UV-2450PC, a 340 nm a 25°C por 3 minutos, de acordo com Habig e Jakoby (1981). Atividade foi calculada utilizando-se do  $\Delta$ Abs/3 min em relação ao controle.

#### 4.11 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

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

#### 4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados com o software Statistica (StatSoft, Inc, 1995), com as repetições, desvios e tratamentos analisados pela análise de variância (ANOVA) e para as diferenças entre tratamentos e controle e entre os tratamentos de flavonóides com e sem oxigênio singlete foram avaliados pelo teste de Tukey, com nível de significância definida como  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. VIABILIDADE DAS CÉLULAS B16-F10 NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DO OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE

A viabilidade celular foi verificada pelo método de cristal violeta, conforme descrito por Gillies *et al.* (1986). O método do cristal violeta baseia-se na fixação das células na placa de cultivo, promovida pelo metanol. Com a adição do cromóforo cristal violeta, que tingem os núcleos das células, quantifica-se o número de células que permaneceram aderidas após o tratamento.

Neste estudo não foram observadas reduções na viabilidade celular de B16-F10 com o tratamento com o  $^1\text{O}_2$  em relação ao controle, nem no controle com DMSO e posterior tratamento com o  $^1\text{O}_2$  (TABELA 1).

TABELA 1 – EFEITO DO  $^1\text{O}_2$  SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS B16-F10

	Sem $^1\text{O}_2$	Com $^1\text{O}_2$
Controle	100 ± 10	92 ± 20
DMSO 0,01%	103 ± 9	88 ± 10

NOTA: Tratamento das células de melanoma B16-F10 com DHPNO<sub>2</sub> (10 mmol/L) por 2h a 37°C. Controle (meio de cultura sem soro e sem adição de DMSO). Análise de viabilidade pela técnica do corante cristal violeta conforme item 4.8. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes em triplicata.

Os resultados observados para viabilidade celular com o tratamento utilizando-se do gerador do  $^1\text{O}_2$  diferem dos observados por Santos (2007), onde foi encontrada uma redução da viabilidade para aproximadamente 40% com a dose de 10 mmol/L de DHPNO<sub>2</sub> com 2 h de tratamento. Isto pode ser devido ao fato de que a viabilidade celular da B16-F10 no trabalho de Santos (2007) foi realizada com a metodologia do MTT, que se utiliza da atividade das desidrogenases para a formação dos cristais de formazana e posterior diluição em DMSO para a leitura, enquanto que a metodologia do cristal violeta utiliza-se do fato da aderência celular ao substrato acrílico para sua quantificação, por coloração do núcleo.

Watson *et al.* (1994) verificaram diferença na sensibilidade dos métodos baseados no MTT e no cristal violeta quando utilizados em células HT-29, de uma

linhagem intestinal exposta ao peróxido de hidrogênio. Após exposição em gradiente de concentração de 0,05 a 10 mmol/L do peróxido, o decréscimo da viabilidade celular foi maior quando verificado pelo método MTT, sendo este, portanto considerado como melhor indicador da injúria celular para esta linhagem.

Outra diferença entre o presente estudo e o de Santos (2007) é em relação ao meio de cultivo utilizado. No estudo realizado por Santos (2007) utilizou-se do meio MEM para o cultivo celular, enquanto para este estudo foi utilizado o meio RPMI-1640, com composição diferente. Diferenças nas condições de cultivo, como confluência celular, também podem interferir em parâmetros celulares relacionados com a resistência a determinados tratamentos (CARRETERO *et al.*, 1999).

Porém, como em nosso estudo seriam utilizados compostos fenólicos como tratamento, e existe a possibilidade de interferência destes diretamente nas desidrogenases que realizam a formação dos cristais a partir do MTT, optou-se pela utilização do método do cristal violeta.

Peng *et al.* (2005) demonstraram que a luteolina e a quercetina são capazes de provocar a redução do MTT, mesmo na ausência de células vivas, utilizando-se o meio RPMI-1640, acrescido de 10% de soro fetal bovino, alterando desta forma os resultados para a viabilidade celular.

### 5.1.1 VIABILIDADE CELULAR PARA O TRATAMENTO COM APIGENINA E OXIGÊNIO SINGLETE

Os resultados do tratamento das células B16-F10 com a apigenina na ausência do  $^1\text{O}_2$  (FIGURA 9) nas doses de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  por 24h, mostraram redução da viabilidade celular estatisticamente significativa em relação ao controle com DMSO (~30 e ~28%, respectivamente). Na dose de 10  $\mu\text{mol/L}$  não houve efeito sobre a viabilidade na ausência do  $^1\text{O}_2$ , mas com o posterior tratamento com gerador químico de  $^1\text{O}_2$ , tal diferença foi verificada (73% de viabilidade). Isto sugere que embora o tratamento com apigenina na dose de 10  $\mu\text{mol/L}$  não afete diretamente a viabilidade das células B16-F10, deixa-as mais suscetíveis ao tratamento posterior com o  $^1\text{O}_2$ .

Esses resultados sugerem uma semelhança com o efeito em células HeLa (carcinoma cervical humano), nas quais a apigenina (37  $\mu\text{mol/L}$ ) promoveu a diminuição na viabilidade celular, com os efeitos (65, 40 e 25 % do controle) em 36, 48 e 72 h após o tratamento, respectivamente (ZHENG *et al.*, 2005). A citotoxicidade da apigenina, conforme este mesmo estudo, apresentou que a  $\text{IC}_{50}$  de 9,8  $\mu\text{mol/L}$  para as células de HeLa em tratamento por 72h. Observaram também inibição do crescimento celular de maneira dose-dependente nas doses de 18,5 a 74  $\mu\text{mol/L}$ , com efeitos mais pronunciados em tempos acima de 36h.

Kaur *et al.*, (2008) demonstraram que a apigenina foi capaz de reduzir a viabilidade celular de câncer de próstata humana quando foi utilizada por 24h no tratamento com 20  $\mu\text{mol/L}$  (redução para ~64% do controle ) e 40  $\mu\text{mol/L}$  (redução para ~43% do controle), avaliada pela metodologia do MTT.

Para demonstrar como pode ocorrer a indução da apoptose, Way *et al.* (2005) demonstraram que a apigenina é capaz de induzir a liberação de citocromo *c* da mitocôndria de forma dose-dependente (10, 20 e 40  $\mu\text{mol/L}$ ) com tratamento por 24h em células MDA-MB-453, de câncer de mama humana, com subsequente ativação da caspase-3.

Caltagirone *et al.* (2000) verificaram a  $\text{IC}_{50}$  de 1,5  $\mu\text{mol/L}$  em B16-BL6 (melanoma murino com alto poder metastático) para a apigenina. Podemos verificar que diferentes tipos celulares possuem diferentes respostas quanto à citotoxicidade da apigenina.

Tais resultados para este e para os demais flavonóides foram importantes para confirmar que as doses escolhidas poderiam ser utilizadas nos demais experimentos, sem a redução excessiva do número de células viáveis, o que dificultaria análises posteriores de outros parâmetros, como a quantificação de glutathiona devido a uma reduzida quantidade de células.



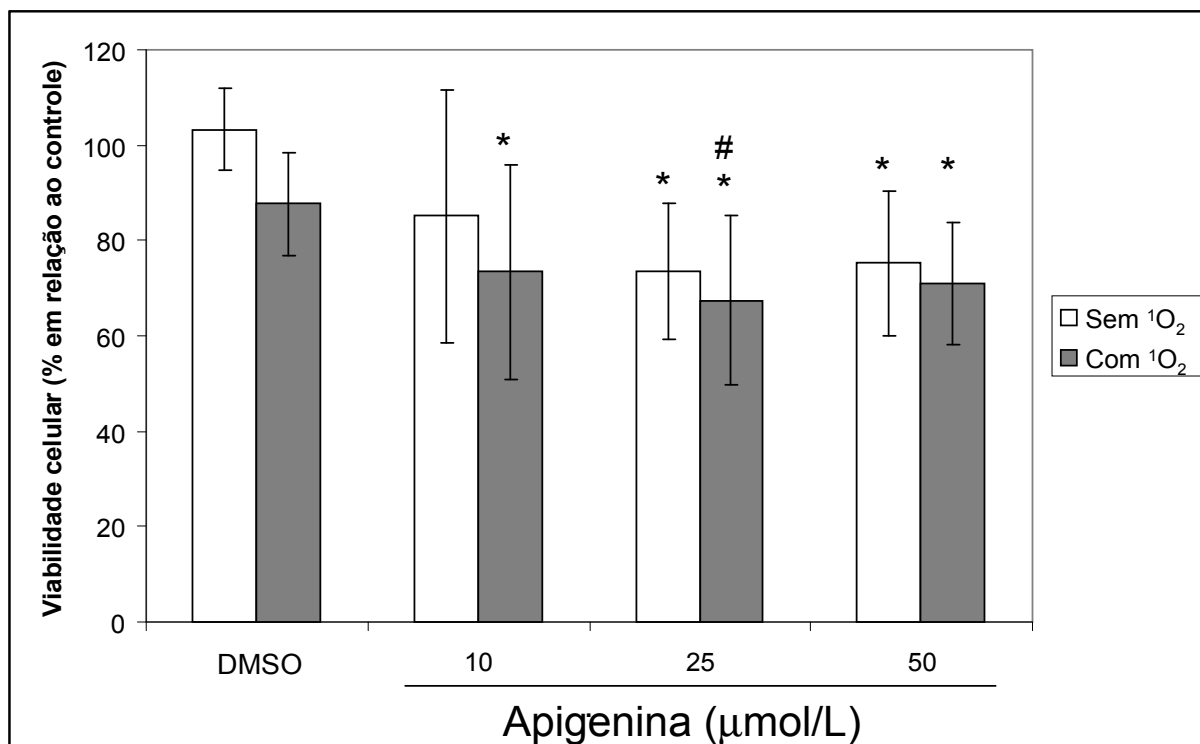


FIGURA 9 – Efeito da apigenina sobre a viabilidade das células B16-F10 com e sem o tratamento posterior com <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Tratamento das células de melanoma B16-F10 com flavonóides nas doses indicadas por 24h e posterior tratamento com DHPNO<sub>2</sub> (10 mmol/L) por 2h a 37°C. Controle com DMSO 0,01%. Análise de viabilidade pela técnica do corante cristal violeta conforme item 4.8. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes em triplicata. \* valores com diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle sem <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (p<0,05); # valores com diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle com <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (p<0,05).

### 5.1.2 VIABILIDADE CELULAR PARA O TRATAMENTO COM FLAVONA E OXIGÊNIO SINGLETE

Podemos observar que não houve diferença significativa entre o tratamento somente com a flavona em nenhuma das doses e nem com o tratamento de flavona e posterior tratamento com DHPNO<sub>2</sub> (FIGURA 10).

Este resultado nos mostra somente que a flavona não interferiu na viabilidade celular de B16-F10 nestas doses, mas não significa que não possam existir alterações em outros parâmetros celulares.

Este resultado está de acordo com o observado por Choi *et al.* (2002), onde não foi observada alteração na viabilidade em células da linhagem neuronal quando tratadas com flavona presente em extrato bruto de *Scutellaria baicalensis* Georgi.

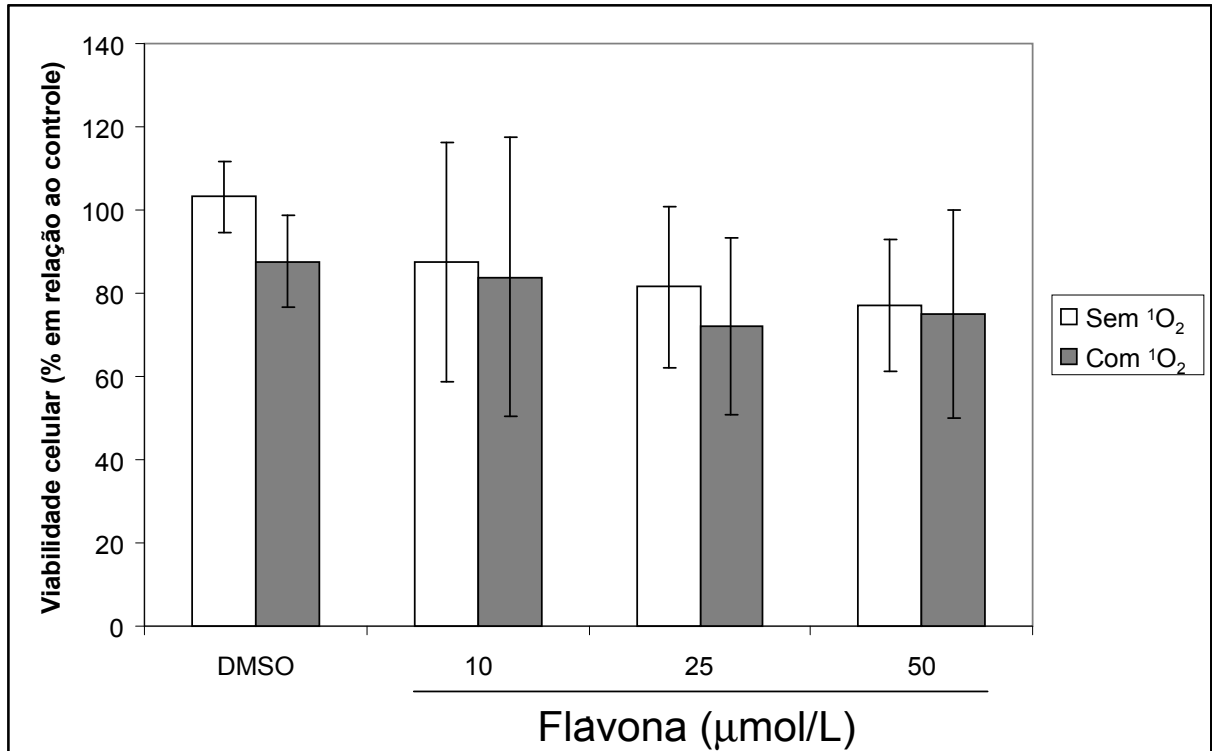


FIGURA 10 – Efeito da flavona sobre a viabilidade das células B16-F10 com e sem o tratamento posterior com <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Tratamento das células de melanoma B16-F10 com flavonóides nas doses indicadas por 24h e posterior tratamento com DHPNO<sub>2</sub> (10 mmol/L) por 2h a 37°C. Controle com DMSO 0,01%. Análise de viabilidade pela técnica do corante cristal violeta conforme item 4.8. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes em triplicata.

### 5.1.3 VIABILIDADE CELULAR PARA O TRATAMENTO COM LUTEOLINA E OXIGÊNIO SINGLETE

Os resultados apresentados na FIGURA 11 demonstram que houve uma diferença na viabilidade celular em relação aos controles, apenas na dose de 50 µmol/L de luteolina, com e sem o tratamento posterior com <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (~57%). Tais diferenças foram significativas ambas em relação ao controle com o veículo DMSO.

Nas demais doses, podemos observar que não houve diferença significativa na viabilidade celular entre o tratamento somente com a luteolina e o tratamento de luteolina seguido do tratamento com DHPNO<sub>2</sub>.

Tais resultados apresentam similaridade com a tendência indicada no trabalho de Choi *et al.* (2008), que tratou células B16 com luteolina nas concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 µmol/L por 72h e obteve citotoxicidade significativa apenas na dose de 100 µmol/L, utilizando-se da metodologia do MTT. Embora os tempos de tratamento difiram, os resultados indicam que são necessárias doses maiores que 10µmol/L para apresentar efeito citotóxico neste tipo de célula.

Martínez *et al.* (2003) observaram uma redução na viabilidade em células B16-F10, com o tratamento com luteolina 50 µmol/L (24h) para ~70%, utilizando-se do método do MTT. Além disso, neste mesmo estudo, a luteolina afetou a viabilidade da Melan-a, uma linhagem celular de melanócito, não neoplásica, demonstrando a possibilidade do tratamento com luteolina afetar também a viabilidade de células normais.

Diferentemente, no trabalho de Iwashita *et al.* (2000) o tratamento com luteolina (100 e 200 µmol/L) por 24h em células B16 inibiu a proliferação, mas não reduziu o número de células viáveis, avaliadas pelo método de exclusão do corante azul de Trypan.

Não só em células de melanoma que a luteolina apresentou redução na viabilidade. Matsui *et al.* (2005) analisaram os efeitos deste flavonóide em células de leucemia humana BV-173 por ligação de Annexina-V (marcador para apoptose). Para o tratamento com 50 µmol/L por 24h verificaram um aumento de ~58% em células em apoptose.

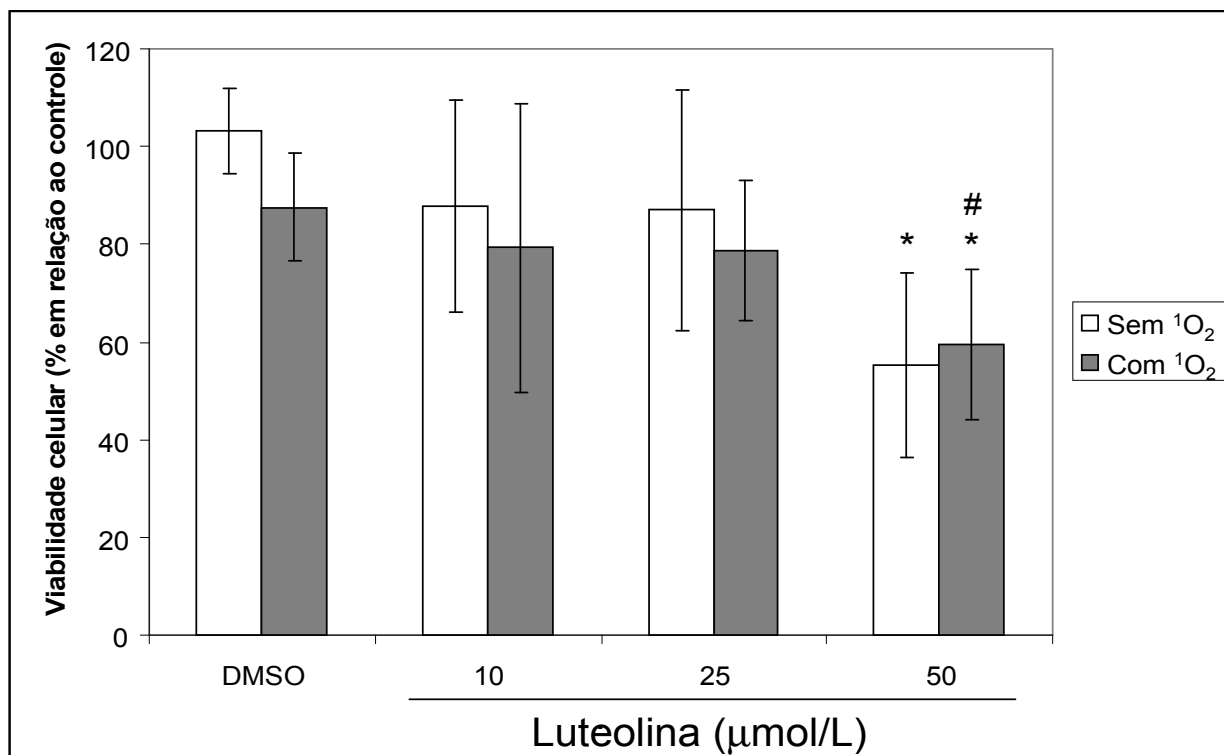


FIGURA 11 – Efeito da luteolina sobre a viabilidade das células B16-F10 com e sem o tratamento posterior com <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Tratamento das células de melanoma B16-F10 com flavonóides nas doses indicadas por 24h e posterior tratamento com DHPNO<sub>2</sub> (10 mmol/L) por 2h a 37°C. Controle com DMSO 0,01%. Análise de viabilidade pela técnica do corante cristal violeta conforme item 4.8. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes em triplicata. \* valores com diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle sem <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (p<0,05); # valores com diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle com <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (p<0,05).

#### 5.1.4 VIABILIDADE CELULAR PARA O TRATAMENTO COM QUERCETINA E DHPNO<sub>2</sub>

De forma semelhante à luteolina, como demonstrado na FIGURA 12, não houve diferença estatística da viabilidade celular em melanoma murino com o tratamento com somente quercetina nas doses de 10 e 25 µmol/L, contudo, na dose de 50 µmol/L, a quercetina proporcionou uma redução da viabilidade de forma significativa, com uma viabilidade de ~55% sem o tratamento com DHPNO<sub>2</sub> e de ~51% do controle com o posterior tratamento com DHPNO<sub>2</sub>.

Na dose de 25 µmol/L com quercetina e posteriormente com o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ocorreu redução significativa da viabilidade em relação ao controle com DMSO para ~62%,

demonstrando que uma dose intermediária de quercetina auxiliada por um tratamento posterior com o  $^1\text{O}_2$  propicia uma redução na viabilidade celular de B16-F10.

Caltagirone *et al.* (2000), trabalhando com células B16-BL6 (linhagem de melanoma murino, similar à B16-F10, por ambas possuírem alto poder metastático), verificaram a IC<sub>50</sub> para alguns flavonóides e concluíram que o resultado para a quercetina foi de 1,5  $\mu\text{mol/L}$  para uma exposição à droga por 72h. Com tratamento de 1  $\text{mmol/L}$  de quercetina por 72h, a viabilidade foi de aproximadamente 30%.

Nitoda *et al.* (2008) realizaram o tratamento de células B16-F10 com quercetina e encontraram uma resposta citotóxica potente, com IC<sub>50</sub> em 20  $\mu\text{mol/L}$ , com completa letalidade em 80  $\mu\text{mol/L}$ . O tempo utilizado por estes autores (72h) foi maior que o utilizado em nosso estudo, o que explica que uma menor dose, porém com um maior tempo de permanência propicia maior morte celular. O método utilizado por Nitoda *et al.* (2008) para a avaliação da viabilidade foi o método MTT.

Martínez *et al.* (2003) obteve uma viabilidade celular em B16-F10 de 82% quando tratadas com quercetina 50  $\mu\text{mol/L}$  por 24h, utilizando-se do método do MTT. Mas outro resultado interessante deste mesmo trabalho foi que o tratamento, com mesma dose e tempo, com quercetina não afetou a viabilidade celular da Melan-a, uma linhagem celular de melanócito, não neoplásica, sugerindo seletividade às células do câncer.

A análise de células de leucemia humana BV-173 indicou apoptose por ligação com Annexina-V quando tratadas com quercetina (50  $\mu\text{mol/L}$  por 24h) e revelou um aumento em mais de 63% de células com injúrias. Portanto, outras células neoplásicas podem também sofrer as interferências deste flavonóide (MATSUI *et al.*, 2005)

Forni *et al.* (2008) encontrou crescimento reduzido em B16-F10, quando tratada com quercetina (10  $\mu\text{mol/L}$ ) em pelo tempo de 48h (32% de redução) e 72h (39% de redução). No tempo de 24h não encontrou diferenças da viabilidade celular mensurada pelo método de exclusão do corante azul de Trypan. Nesta dose os resultados são coincidentes com os do nosso trabalho.

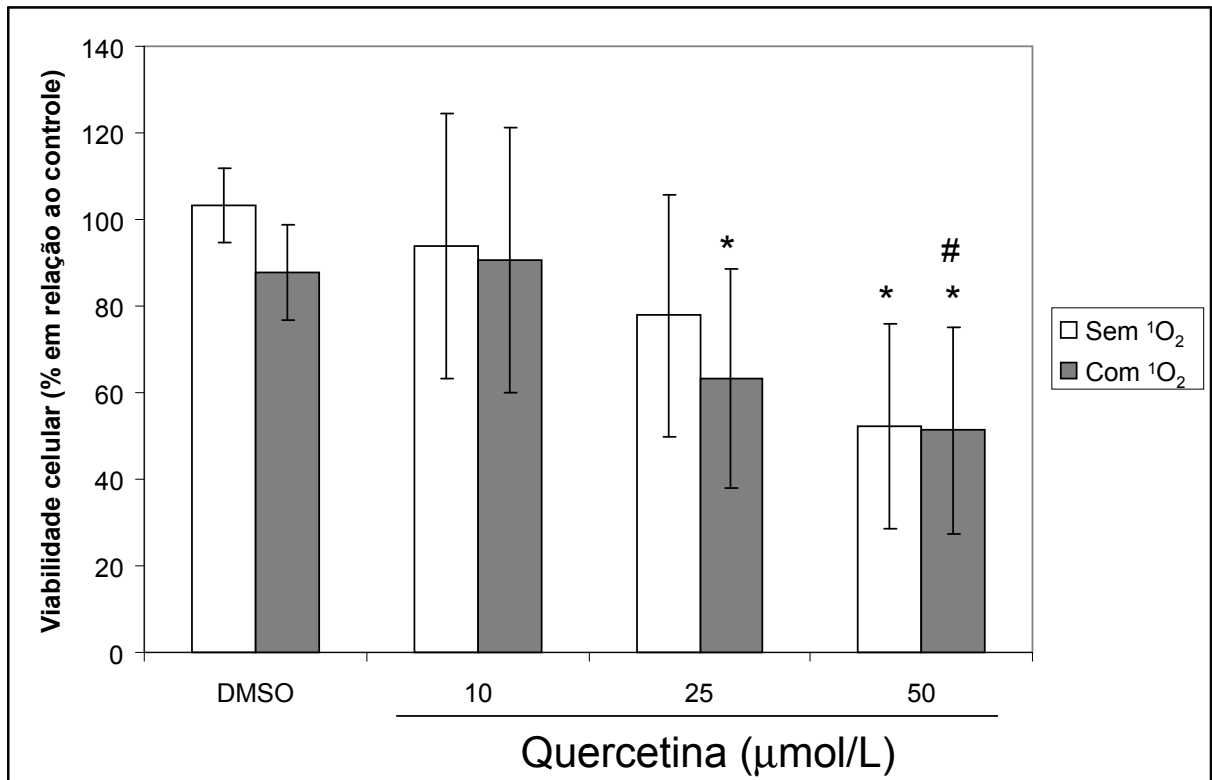


FIGURA 12 - Efeito da quercetina sobre a viabilidade das células B16-F10 com e sem o tratamento posterior com <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Tratamento das células de melanoma B16-F10 com flavonóides nas doses indicadas por 24h e posterior tratamento com DHPNO<sub>2</sub> (10 mmol/L) por 2h a 37°C. Controle com DMSO 0,01%. Análise de viabilidade pela técnica do corante cristal violeta conforme item 4.8. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes em triplicata. \* valores com diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle sem <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (p<0,05); # valores com diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle com <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (p<0,05).

Podemos verificar que os flavonóides estudados que possuem um anel B catecol (luteolina e quercetina) apresentaram uma redução maior na viabilidade na dose de 50 µmol/L (~57 e ~55 % do controle, respectivamente) Porém, a apigenina (50 µmol/L) também apresentou redução na viabilidade celular para ~75 % do controle, sugerindo que além do anel B catecol, o número de hidroxilas no anel B também pode estar relacionado à citotoxicidade, pois quando comparada à flavona (sem substituintes) apresentou maior efeito.

## 5.2 ANÁLISES DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA INTRACELULAR

Considerando a importância dos níveis de glutatona nas funções celulares, este parâmetro foi investigado a fim de compreender parte do mecanismo de ação dos flavonóides e do oxigênio singlete sobre as células de melanoma. De forma semelhante às análises da viabilidade celular, os flavonóides utilizados para o tratamento das células da linhagem B16-F10 de melanoma murino foram a apigenina, luteolina, flavona e quercetina, nas doses de 10, 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  por um período de 24h e a concentração utilizada do DHPNO<sub>2</sub> foi de 10 mmol/L e incubação por 2h. Como os flavonóides são dissolvidos em DMSO e posteriormente diluídos, o controle com DMSO somente foi realizado na concentração máxima utilizada (0,01%). Além disso, também foi usado um controle com BSO, o qual é inibidor da  $\gamma$ -glutamylcisteína sintase, cuja presença no meio de incubação resulta na depleção da glutatona.

A metodologia de quantificação se baseia no princípio da quebra do DTNB pela GSH, formando um produto TNB, mensurado a 415nm, e outro produto TNB-SG, que é reduzido a TNB pela glutatona redutase, e também mensurado no mesmo comprimento de onda. A GSSG nesse sistema é reduzida à GSH pela mesma glutatona redutase e também entra no ciclo, por isso os resultados se referem ao conteúdo de glutatona total (GSx).

Para GSSG, 2-vinilpiridina foi adicionada à amostra, que se conjuga com a GSH já existente no sistema. Após esta conjugação, impedindo a GSH de entrar no ciclo, a GSSG é rapidamente convertida à GSH e esta, livre da 2-vinilpiridina, pode interagir com DTNB e ser quantificada.

Para um melhor entendimento dos resultados obtidos, optou-se pelo relato dos dados como glutatona total na tentativa de minimizar a propagação de erros pelos cálculos, nos quais seria considerado que 2 x GSH sejam equivalentes a 1 GSSG.

Conforme verificado na FIGURA 13, não foi verificada redução significativa da quantificação de glutatona total com o controle realizado com DMSO e as células tratadas somente com o gerador de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> apresentaram diminuição do conteúdo total de glutatona, sendo essa redução em torno de 40% em relação controle sem o DMSO, além disso os níveis de GSx no tratamento com <sup>1</sup>O<sub>2</sub> no controle com DMSO foram iguais ao do mesmo tratamento sem DMSO.

Os resultados para as células tratadas com BSO confirmam a depleção de GSH das células e indicam que o método é capaz de detectar diminuições no conteúdo de glutathiona com bastante segurança.

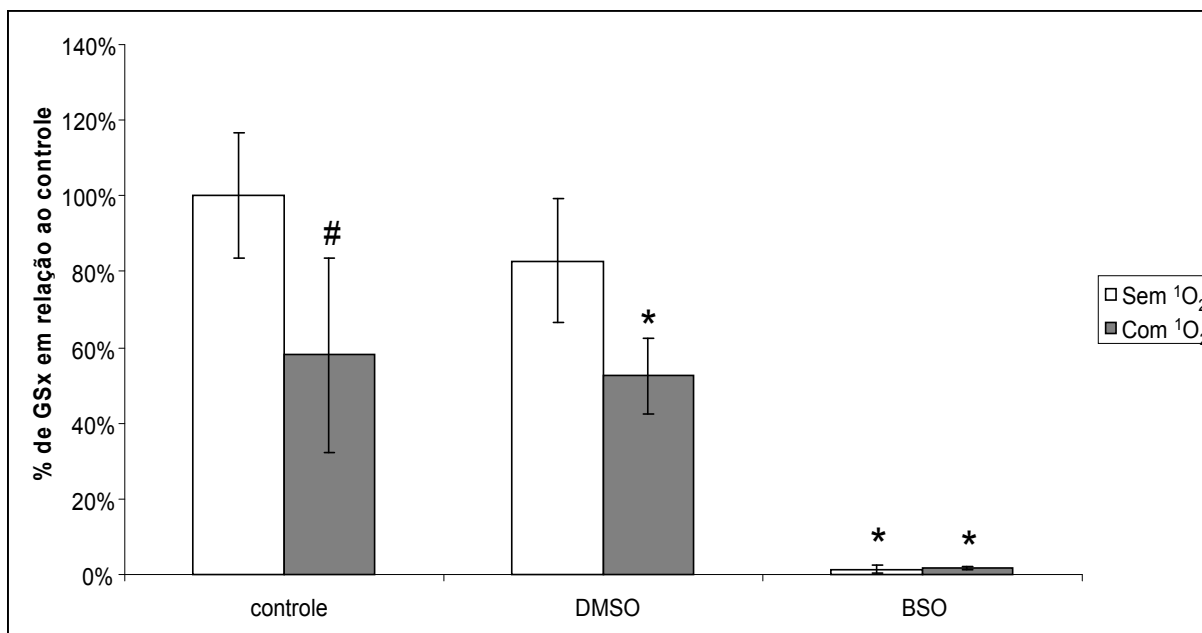


FIGURA 13 – Quantificação da glutathiona total das células B16-F10 tratadas com  $^1\text{O}_2$ .

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Tratamento das células de melanoma B16-F10 em meio sem soro por 24h, na ausência ou presença de DMSO 0,01% ou BSO 50  $\mu\text{mol/L}$  e posterior tratamento com DHPNO<sub>2</sub> (10 mmol/L) por 2h a 37°C. Análise de glutathiona total conforme item 4.9 e proteína pelo método de Bradford (1976). DMSO é o veículo para a solubilização do flavonóide, BSO é controle positivo para a técnica de quantificação, pois inibe a síntese de GSH. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes em triplicata. # valores com diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle sem  $^1\text{O}_2$ , \* valores com diferenças estatisticamente significativas em relação ao DMSO sem  $^1\text{O}_2$  ( $p < 0,05$ ).

Nas células tratadas com o oxigênio singlete não há alteração dos níveis de GSSG em relação ao controle (TABELA 2). Uma possibilidade para esse resultado é o consumo de GSH pelo  $^1\text{O}_2$ , mas sem a formação de GSSG, e produzindo glutathiona sulfinato (GSO<sub>2</sub>H), glutathiona sulfóxido (GSSOG) e glutathiona sulfonato (GSO<sub>3</sub>H), não sendo estes detectados pela metodologia descrita no item 4.9, como encontrado nos estudos de Devasagayan *et al.* (1990). Desta forma, existe um consumo de GSH, reduzindo a glutathiona total, mas não ocorre o aparecimento de



GSSG. Para a diminuição de GSSG pode ocorrer uma reação com a formação de glutathiona sulfóxido (GSSOG).

TABELA 2 – QUANTIFICAÇÃO DE GSSG DAS CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM  $^1\text{O}_2$

	% de GSSG em relação ao controle	
	Sem $^1\text{O}_2$	Com $^1\text{O}_2$
Controle	100,0 ± 29,3	116,1 ± 47,4
DMSO	96,0 ± 39,5	88,3 ± 42,7
BSO	36,1 ± 14,5 *	60,1 ± 12,2

NOTA: Tratamento das células de melanoma B16-F10 em meio sem soro por 24h, na ausência ou presença de DMSO 0,01% ou BSO 50  $\mu\text{mol/L}$  e posterior tratamento com DHPNO<sub>2</sub> (10  $\text{mmol/L}$ ) por 2h a 37°C. Análise de glutathiona oxidada conforme item 4.9 e proteína pelo método de Bradford (1976). Os valores representam a média de 3 experimentos independentes em triplicata. DMSO é o veículo para a solubilização do flavonóide, BSO é controle positivo para a técnica de quantificação, pois inibe a síntese de GSH. \* diferença estatisticamente significativas em relação ao DMSO sem  $^1\text{O}_2$  ( $p < 0.05$ ). 100 % equivale a  $0,12 \pm 0,03 \mu\text{mol}$  de GSSG por  $\mu\text{g}$  de proteína.

Verificamos nos resultados apresentados que as células de melanoma murino quando tratadas com  $^1\text{O}_2$  apenas, existe uma redução significativa do conteúdo de glutathiona total da célula. Tal resultado pode ser devido à grande concentração de glutathiona em células neoplásicas com grande poder metastático, como neste caso (BENLLOCH *et al.*, 2005). Por estar em grandes concentrações, a glutathiona torna-se alvo importante na desativação do estado excitado do oxigênio singlete.

### 5.2.1 QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA PARA AS CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM APIGENINA E $^1\text{O}_2$

Na FIGURA 14 estão apresentados os resultados da quantificação de glutathiona total (GSx) em células tratadas com apigenina em diferentes doses, com e sem posterior tratamento com  $^1\text{O}_2$ . Observa-se uma redução significativa nas doses de 10, 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  de apigenina sem o tratamento com o  $^1\text{O}_2$  em relação ao controle DMSO. Esse resultado está de acordo com o trabalho de Shukla e Gupta (2008), no qual a apigenina na dose 40  $\mu\text{mol/L}$  também apresentou uma redução de 67% nos níveis de glutathiona em 1h de tratamento nas células de câncer de próstata humana 22Rv1, chegando a 81% com 3h de tratamento. Segundo Galati *et al.* (2001), em seus estudos *in vitro*, a apigenina não forma conjugados com GSH, indicando possivelmente outro destino para o GSH.

Quando as células foram tratadas com apigenina e posteriormente com  $^1\text{O}_2$ , não há diferença estatística com relação ao tratamento somente com a apigenina. Além disso, apenas o tratamento com a dose de 10  $\mu\text{mol/L}$  permaneceu diferente do controle DMSO sem  $^1\text{O}_2$ , para as demais doses os desvios das medidas foi muito grande, não sendo diferentes do controle DMSO sem  $^1\text{O}_2$ .

Esses resultados indicam que a perturbação gerada pela apigenina nos níveis de glutathiona total propicia uma resistência ao posterior tratamento com  $^1\text{O}_2$ , pois como visto, este também é capaz de reduzir os níveis nas células controle e DMSO, mas não há aparente efeito adicional ao já induzido pela apigenina sozinha. Isso também pode indicar que estando a glutathiona em menor quantidade, o  $^1\text{O}_2$  pode estar reagindo com outros alvos celulares, seria interessante avaliar a oxidação do DNA ou proteínas, por exemplo.

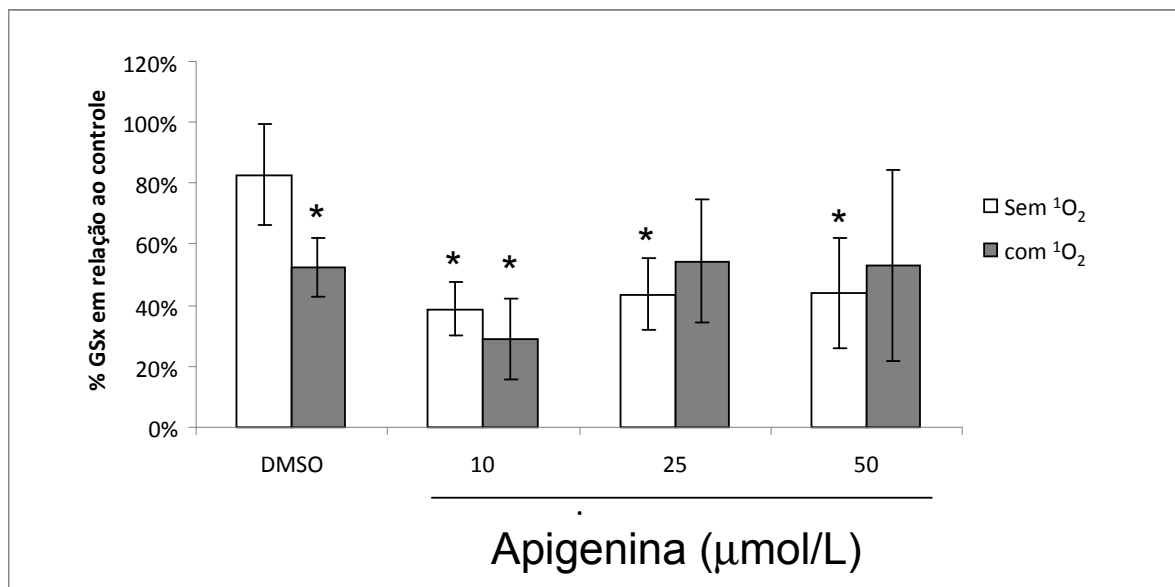


FIGURA 14 – Quantificação da glutatona total das células B16-F10 tratadas com apigenina e apigenina /<sup>1</sup>O<sub>2</sub>

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Tratamento das células de melanoma B16-F10 com flavonóide nas doses indicadas por 24h e posterior tratamento com DHPNO<sub>2</sub> (10 mmol/L) por 2h a 37°C. Controle com DMSO 0,01%. Análise de glutatona total conforme item 4.9 e proteína pelo método de Bradford (1976). Os valores representam a média de 3 experimentos independentes em triplicata. \* diferença estatisticamente significativas em relação ao DMSO sem <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (p<0.05). 100% equivale a 3,2 ± 0,53 µmol de glutatona total por µg de proteína.

Na TABELA 3, são apresentados os valores em % para os níveis de GSSG em relação ao controle. Os resultados demonstram que houve uma redução de ~60% e ~50% em relação ao controle com DMSO na quantidade de GSSG nos tratamentos somente com apigenina nas doses de 10 e 25 µmol/L, respectivamente. Esse fato é interessante, pois a redução de GSH não foi proporcional a um aumento esperado em GSSG, o que seria resultante da oxidação de GSH. O resultado foi até mesmo uma redução da glutatona na sua forma oxidada. Isto pode ser indicativo de outro destino ao GSH que não sua simples oxidação a GSSG.

As amostras tratadas com a apigenina e posterior tratamento com o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> não apresentaram diminuição ou aumento do conteúdo de GSSG em relação ao controle, mas quando comparadas ao tratamento somente com o flavonóide na mesma dose não se observa mais a diminuição dos níveis. Esse resultado pode indicar que o oxigênio singlete pode ter atuado de tal forma que inibiu o efeito promovido pela apigenina sobre a diminuição do GSSG.

TABELA 3 – QUANTIFICAÇÃO DE GSSG DAS CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM APIGENINA E APIGENINA/<sup>1</sup>O<sub>2</sub>

	% de GSSG em relação ao controle	
	Sem <sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Com <sup>1</sup> O <sub>2</sub>
DMSO	96,0 ± 39,5	88,3 ± 42,7
Apigenina 10 µmol/L	38,4 ± 9,0 *	107,1 ± 39,2 #
Apigenina 25 µmol/L	47,7 ± 10,6 *	108,5 ± 42,3 #
Apigenina 50 µmol/L	59,8 ± 9,6	96,7 ± 38,3

NOTA: Tratamento das células de melanoma B16-F10 com flavonóide nas doses indicadas por 24h e posterior tratamento com DHPNO<sub>2</sub> (10 mmol/L) por 2h a 37°C. Análise de glutathiona oxidada conforme item 4.9 e proteína pelo método de Bradford (1976). Os valores representam a média de 3 experimentos independentes em triplicata. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controle com DMSO (p<0.05). # diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento na mesma dose, mas sem <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (p<0.05). 100 % equivale a 0,12 ± 0,03 µmol de GSSG por µg de proteína.

Benlloch *et al.* (2005) estudaram as diferenças entre linhagens de melanoma com alto poder metastático (B16-F10) e com melanoma de baixo poder metastático (B16-F1). Nesse estudo, induzindo um aumento do fluxo de GSH por MRP1 (proteína de resistência a multiplas drogas 1) com o tratamento com verapamil, e sem alteração na síntese de GSH, ocorre também uma redução do conteúdo intracelular de GSH. Isto ocorre sem aumento do conteúdo de GSSG, demonstrando assim que GSH é liberada por fluxo através da MRP1, que propicia a extrusão de drogas das células tumorais. As MRPs são associadas a células de câncer com alto conteúdo de GSH. Através da MRP1, células de câncer podem liberar GSH até mesmo sem a presença de drogas citotóxicas.

Portanto, com a presença de apigenina no meio, e sendo o transportador MRP1 responsável por fazer a extrusão de drogas citotóxicas em co-transporte com GSH e GSSG, seria um mecanismo plausível para justificar as reduções nas concentrações intracelulares de glutathiona total e GSSG. Esta conclusão está de acordo com Rappa *et al.* (1997) em relação ao transportador, o qual apresentou redução no transporte de alguns substratos quando a síntese de GSH foi inibida por BSO e com Leslie *et al.* (2003) em relação à apigenina, que no seu estudo, com 30 µmol/L de concentração, foi utilizada como estímulo para a atividade da MRP1, com o intuito de avaliar a funcionalidade deste transportador à GSH e alguns análogos.

### 5.2.2 QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA PARA AS CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM FLAVONA E $^1\text{O}_2$

Na FIGURA 15 estão apresentados os resultados da glutathione total nas células B16-F10 tratadas com flavona em diferentes doses, com e sem posterior tratamento com  $^1\text{O}_2$ .

As diferenças significativas foram verificadas nas células tratadas com a flavona em relação ao controle com DMSO nas doses de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  de tratamento com flavona, e também no tratamento com flavona na dose de 50  $\mu\text{mol/L}$  com posterior incubação com gerador de oxigênio singlete. Não se observaram diferenças dos tratamentos somente com o flavonóide ou com o flavonóide e  $^1\text{O}_2$ , novamente indicando que não há um efeito aditivo dos dois tratamentos e o  $^1\text{O}_2$  tem seu efeito diminuído em relação à glutathione quando as células são previamente tratadas com o flavonóide.

Não há na literatura determinação dos níveis de glutathione para células tratadas com flavona. Entretanto, resultados publicados por Nijhoff *et al.* (1995) para ratos suplementados dieteticamente com flavona mostram diferenças na atividade da enzima GST, mas sem alterações do conteúdo de glutathione em alguns tecidos analisados como esôfago, intestino, cólon e fígado. Somente nas células do estômago destes mesmos animais foi encontrado um aumento da concentração de GSH.

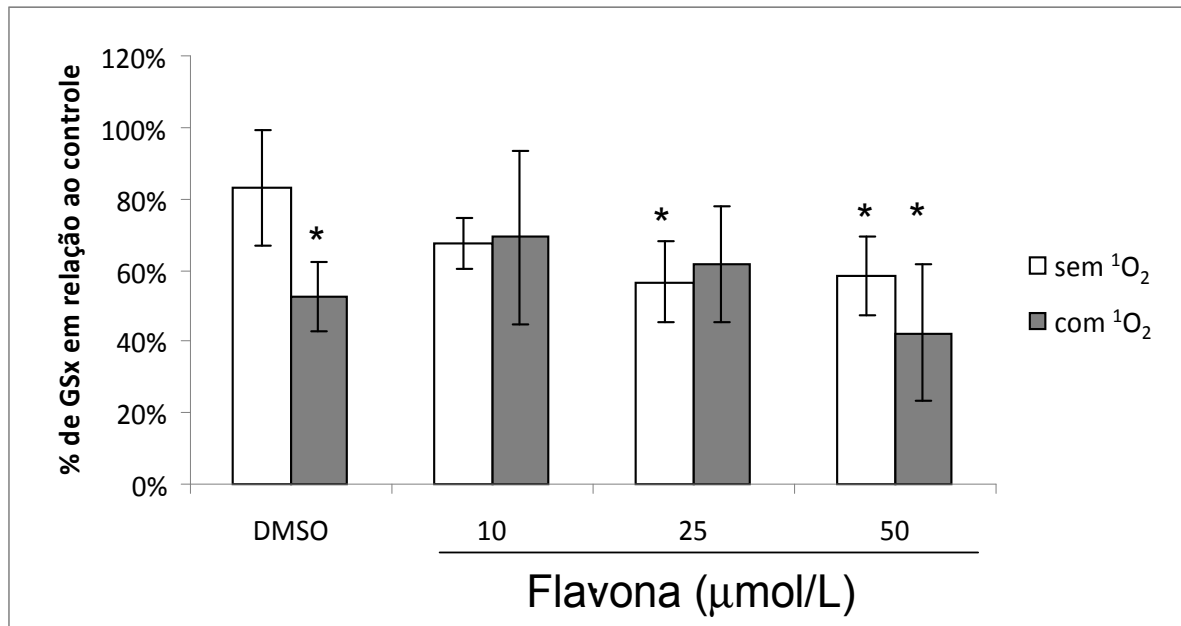


FIGURA 15 – Quantificação da glutathiona total das células B16-F10 tratadas com flavona e flavona / <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Tratamento das células de melanoma B16-F10 com flavonóide nas doses indicadas por 24h e posterior tratamento com DHPNO<sub>2</sub> (10 mmol/L) por 2h a 37°C. Controle com DMSO 0,01%. Análise de glutathiona total conforme item 4.9 e proteína pelo método de Bradford (1976). Os valores representam a média de 3 experimentos independentes em triplicata. \* diferença estatisticamente significativas em relação ao DMSO sem <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (p<0.05). 100% equivale a 3,2 ± 0,53 µmol de glutathiona total por µg de proteína.

As mensurações de GSSG demonstraram não haver diferenças significativas em relação ao controle, ou entre as doses (10, 25 e 50 µmol/L) tratadas apenas com flavona sem <sup>1</sup>O<sub>2</sub> e as doses de flavona com posterior tratamento com <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (TABELA 4).

TABELA 4 – QUANTIFICAÇÃO DE GSSG DAS CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM FLAVONA E FLAVONA/<sup>1</sup>O<sub>2</sub>

	% de GSSG em relação ao controle	
	Sem <sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Com <sup>1</sup> O <sub>2</sub>
DMSO	96,0 ± 39,5	88,3 ± 42,7
Flavona 10 µmol/L	76,6 ± 24,6	62,1 ± 7,8
Flavona 25 µmol/L	95,3 ± 50,4	62,3 ± 11,5
Flavona 50 µmol/L	67,7 ± 21,9	55,9 ± 14,2

NOTA: Tratamento das células de melanoma B16-F10 com flavonóide nas doses indicadas por 24h e posterior tratamento com DHPNO<sub>2</sub> (10 mmol/L) por 2h a 37°C. Análise de glutathiona oxidada conforme item 4.9 e proteína pelo método de Bradford (1976). Os valores representam a média de 3 experimentos independentes em triplicata. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controle com DMSO (p<0.05). # diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento na mesma dose, mas sem <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (p<0.05). 100 % equivale a 0,12 ± 0,03 µmol de GSSG por µg de proteína.

### 5.2.3 QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA PARA AS CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM LUTEOLINA E <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

Na FIGURA 16 estão apresentados os resultados da glutathiona total nas células B16-F10 tratadas com luteolina em diferentes doses, com e sem posterior tratamento com <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Pode-se verificar que para todas as doses do tratamento com luteolina sem o <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, revelou diferenças significativas em relação ao controle de glutathiona total, demonstrando que a luteolina reduz a quantidade de glutathiona total, porém quando é realizado um posterior tratamento com o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> os níveis não diferem do tratamento apenas com o flavonóide, não sendo seus efeitos adicionais um ao outro.

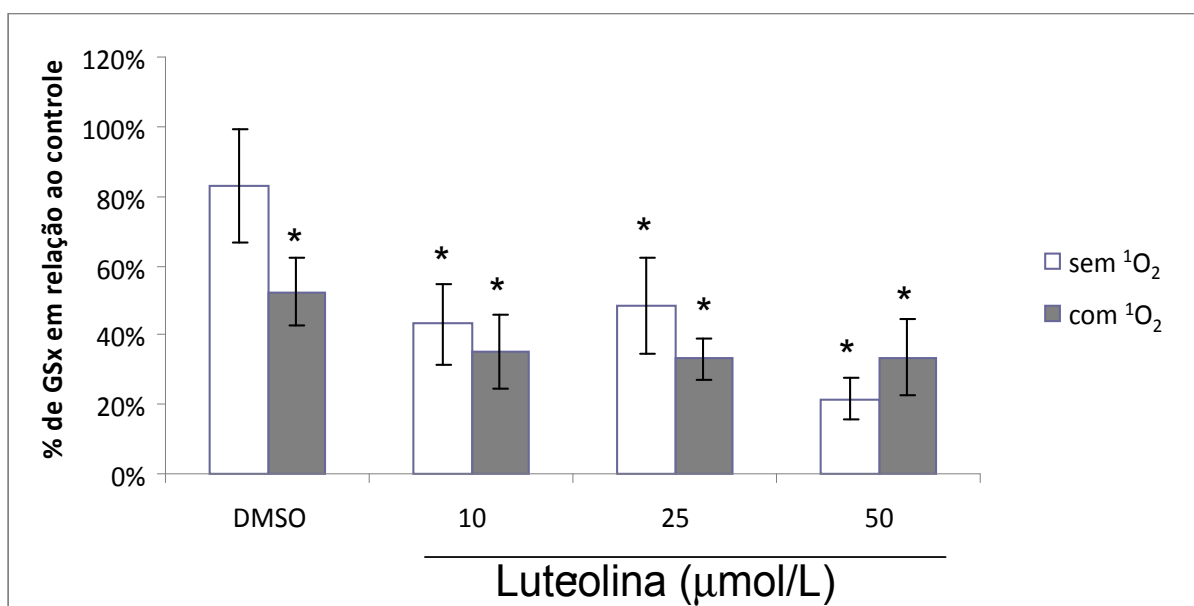


FIGURA 16 – Quantificação da glutathiona total das células B16-F10 tratadas com luteolina e luteolina /<sup>1</sup>O<sub>2</sub>

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Tratamento das células de melanoma B16-F10 com flavonóide nas doses indicadas por 24h e posterior tratamento com DHPNO<sub>2</sub> (10 mmol/L) por 2h a 37°C. Controle com DMSO 0,01%. Análise de glutathiona total conforme item 4.9 e proteína pelo método de Bradford (1976). Os valores representam a média de 3 experimentos independentes em triplicata. \* diferença estatisticamente significativas em relação ao DMSO sem <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (p<0.05). 100% equivale a 3,2 ± 0,53 μmol de glutathiona total por μg de proteína.

Percebe-se uma tendência para uma redução na GSSG no tratamento com luteolina, embora ocorra diferença significativa na mensuração de GSSG apenas nas doses de 10 e 50 μmol/L sem o tratamento posterior com o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (TABELA 5). Quando é realizado o posterior tratamento com <sup>1</sup>O<sub>2</sub> os valores não são mais diferentes do controle. Esses resultados também apontam para uma situação que não pode ser explicada somente por uma simples oxidação de GSH, mas de sua utilização de outras formas. É possível sugerir um mecanismo de alteração de glutathiona total semelhante ao que foi sugerido para a apigenina, com a atuação das MRPs.

Galati *et al.* (2001) demonstraram que a luteolina é capaz de formar mono ou bis conjugados com GSH sem formar radicais tiil ou GSSG. A diminuição da concentração de glutathiona total sem o aumento dos níveis de GSSG pode ser devida a este fato.



TABELA 5 – QUANTIFICAÇÃO DE GSSG DAS CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM LUTEOLINA E LUTEOLINA/<sup>1</sup>O<sub>2</sub>

	% de GSSG em relação ao controle	
	Sem <sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Com <sup>1</sup> O <sub>2</sub>
DMSO	96,0 ± 39,5	88,3 ± 42,7
Luteolina 10 µmol/L	38,6 ± 11,8 *	76,5 ± 32,5
Luteolina 25 µmol/L	75,0 ± 28,4	62,0 ± 30,2
Luteolina 50 µmol/L	45,6 ± 16,5 *	61,8 ± 24,4

NOTA: Tratamento das células de melanoma B16-F10 com flavonóide nas doses indicadas por 24h e posterior tratamento com DHPNO<sub>2</sub> (10 mmol/L) por 2h a 37°C. Análise de glutathiona oxidada conforme item 4.9 e proteína pelo método de Bradford (1976). Os valores representam a média de 3 experimentos independentes em triplicata. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controle com DMSO (p<0.05).. # diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento na mesma dose, mas sem <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (p<0.05). 100 % equivale a 0,12 ± 0,03 µmol de GSSG por µg de proteína.

#### 5.2.4 QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA PARA AS CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM QUERCETINA E <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

Na FIGURA 17 estão apresentados os resultados da glutathiona total nas células B16-F10 tratadas com quercetina em diferentes doses, com e sem posterior tratamento com <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Observa-se diferença significativa das doses de 10, 25 e 50 µmol/L sem o tratamento com o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> em relação ao controle com DMSO, o que demonstra que a quercetina é capaz de provocar a redução da quantidade de glutathiona total da célula.

Quando as células foram tratadas com quercetina e posteriormente com <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, não há diferença estatística com relação ao tratamento DMSO com <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ou em relação ao tratamento somente com a quercetina. Além disso, apenas o tratamento com a dose de 10 µmol/L permaneceu diferente do controle DMSO sem <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

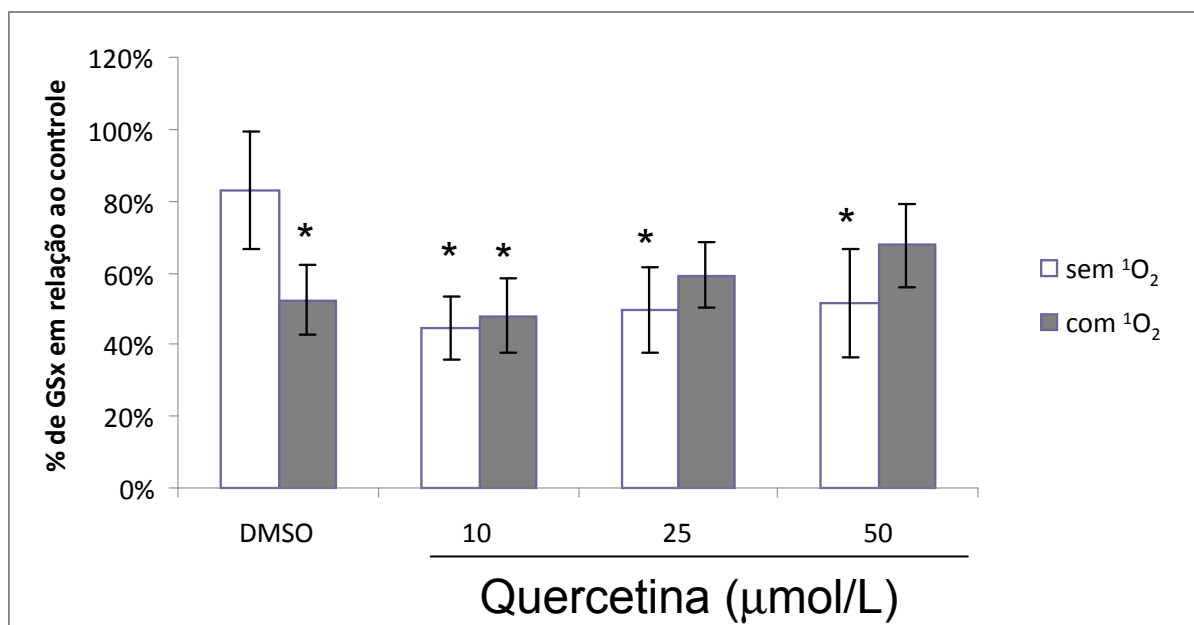


FIGURA 17 – Quantificação da glutathiona total das células B16-F10 tratadas com quercetina /<sup>1</sup>O<sub>2</sub>

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Tratamento das células de melanoma B16-F10 com flavonóide nas doses indicadas por 24h e posterior tratamento com DHPNO<sub>2</sub> (10 mmol/L) por 2h a 37°C. Controle com DMSO 0,01%. Análise de glutathiona total conforme item 4.9 e proteína pelo método de Bradford (1976). Os valores representam a média de 3 experimentos independentes em triplicata. \* diferença estatisticamente significativas em relação ao DMSO sem <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (p<0.05). 100% equivale a 3,2 ± 0,53 µmol de glutathiona total por µg de proteína.

Verificamos que também não há diferenças significativas quando é realizada a análise do conteúdo de GSSG para os tratamentos com a quercetina. Os dados para o tratamento com quercetina e <sup>1</sup>O<sub>2</sub> não serão apresentados, pois houve uma variação muito grande para os diferentes experimentos (TABELA 6).

Lima *et al.* (2006) não encontraram diferenças significativas nas concentrações de GSH quando células HepG2 (linhagem celular de carcinoma hepático) foram tratadas com 45 µmol/L de quercetina por 5h. Porém encontraram uma proteção das células frente a um estresse oxidativo gerado por *t*-butilhidroperóxido pela quercetina nesta dose.

Galati *et al.* (2001) demonstraram que a quercetina, da mesma forma que a luteolina, é capaz de formar mono ou bis conjugados com GSH sem formar radicais tiil ou GSSG. Com o tratamento com quercetina a diminuição da concentração de

glutaciona total nas células sem o aumento dos níveis de GSSG pode também ser devida a este fato.

De forma semelhante, Ramos e Aller (2008) também encontraram redução (30%) do conteúdo de GSH, mensurada por método fluorimétrico com monoclorobimano, quando células da linhagem de leucemia humana U937 foram tratadas com quercetina 25  $\mu\text{mol/L}$  por 24h.

TABELA 6 – QUANTIFICAÇÃO DE GSSG DAS CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM QUERCETINA E QUERCETINA/ $^1\text{O}_2$

	% de GSSG em relação ao controle	
	Sem $^1\text{O}_2$	Com $^1\text{O}_2$
DMSO	96,0 $\pm$ 39,5	88,3 $\pm$ 42,7
Quercetina 10 $\mu\text{mol/L}$	107,9 $\pm$ 53,0	-
Quercetina 25 $\mu\text{mol/L}$	149,4 $\pm$ 77,3	-
Quercetina 50 $\mu\text{mol/L}$	76,4 $\pm$ 58,4	-

NOTA: Tratamento das células de melanoma B16-F10 com flavonóide nas doses indicadas por 24h e posterior tratamento com DHPNO<sub>2</sub> (10 mmol/L) por 2h a 37°C. Análise de glutaciona oxidada conforme item 4.9 e proteína pelo método de Bradford (1976). Os valores representam a média de 3 experimentos independentes em triplicata. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controle com DMSO (p<0.05). # diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento na mesma dose, mas sem  $^1\text{O}_2$  (p<0.05). 100 % equivale a 0,12  $\pm$  0,03  $\mu\text{mol}$  de GSSG por  $\mu\text{g}$  de proteína.

Aparentemente, quando existe um tratamento anterior com os flavonóides, estes reduzem a quantidade de glutaciona disponível para a reação com o  $^1\text{O}_2$ , forçando-o a reagir com outros alvos celulares, preferencialmente proteínas que são muito abundantes no ambiente intracelular, o que justifica a não existência de um efeito adicional ao tratamento com flavonóides (RONSEIN *et al.*, 2006)

Esta diminuição do conteúdo de glutaciona total através de tratamento com flavonóides pode ser uma estratégia importante para a redução das defesas antioxidantes das células neoplásicas, favorecendo um tratamento posterior convencional (KACHADOURIAN; DAY, 2006). Porém, para isto será imprescindível a pesquisa do tratamento com flavonóides frente às células não neoplásicas,

investigando sua especificidade em somente deixar as células do câncer mais suscetíveis aos agentes quimioterápicos.

Possibilidades interessantes surgiram da relação da redução da glutathiona total pelos flavonóides e a redução da viabilidade celular para a apigenina, luteolina e quercetina, pois a redução da glutathiona pode interferir na resposta celular à apoptose (BIROCCIO *et al.*, 2004).

A forma pela qual ocorre a diminuição do conteúdo de glutathiona total nas células de melanoma murino quando tratadas com flavonóides também merece estudos mais extensos. Alguns indícios levam a crer na influência dos MRPs expressos (LABERGE *et al.*, 2007), mas outros fatores podem gerar esta diminuição, como o favorecimento da conjugação da glutathiona com alguns dos próprios flavonóides (GALATI *et al.*, 2001) ou outras moléculas celulares.

Segundo Leslie *et al.* (2003), foi proposto que a MRP1 possui um bolso que acomoda motivos hidrofóbicos e hidrofílicos de conjugados e não conjugados de substratos do transportador, em combinação com GSH, favorecendo sua exportação. Tal explicação cabe aos flavonóides estudados, que poderiam se ligar ao MRP1, justificando a atuação deles junto aos transportadores e conseqüentemente, ao resultado da concentração de glutathiona total observada em nosso trabalho. Por outro lado, Van Zanden *et al.* (2005) apresentaram resultados dos flavonóides como inibidores da atividade de MRP 1 e 2. Por estes exemplos percebe-se que pesquisas mais detalhadas são importantes para esclarecer essas diferenças.

#### 5.2.5 VERIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS INTERFERÊNCIAS DO DHPN COM OS FLAVONÓIDES UTILIZADOS

Foram realizados experimentos para verificar a existência de uma possível ação do composto DHPN que é formado na geração do oxigênio singlete. Foram detectados os seguintes níveis para a amostra tratada com DHPN obtido da prévia decomposição térmica do DHPNO<sub>2</sub> a 37°C por 2h: (87 ± 10)% para GSx e (85 ± 17)% para GSSG. Esses valores não são diferentes estatisticamente em relação ao controle, indicando que ele não causa interferência nas medidas.

Também foi avaliado se o DHPN poderia interagir com os flavonóides e alterar os resultados de GSH ou GSSG, sendo os tratamentos subseqüentes e mesmo que não tenha ocorrido a permanência de ambos no mesmo momento. Tal interação poderia ocorrer no espaço intracelular, onde os flavonóides poderiam permanecer e interagir com o DHPN. Os resultados foram normalizados em relação ao tratamento na mesma dose de flavonóide, mas na ausência do DHPN (TABELA 7). Conforme indicado, não houve diferença significativa na utilização do DHPN como veículo para a geração química do oxigênio singlete.

TABELA 7 – INTERFERÊNCIA DO DHPN NOS VALORES DE GSx E GSSG

Flavonóide (50 $\mu$ mol/L)	GSx (%)	GSSG (%)
Controle	87,1 $\pm$ 8,2	85 $\pm$ 17,0
Apigenina	97,8 $\pm$ 11,4	85,5 $\pm$ 17,4
Luteolina	93,3 $\pm$ 21,8	110,9 $\pm$ 28,0
Flavona	105,8 $\pm$ 18,5	85,3 $\pm$ 18,4
Quercetina	83,3 $\pm$ 22,7	118,5 $\pm$ 19,8

NOTA: Resultados expressos em % em relação à mesma dose de tratamento sem o DHPN. GSx e GSSG foram determinadas pelo protocolo descrito no item 4.9. O DHPN foi obtido da decomposição térmica do DHPNO<sub>2</sub>. Os valores representam a média de 2 experimentos independentes em triplicata. Tratamento das células de melanoma B16-F10 com flavonóides nas doses indicadas por 24h e DHPN (10 mmol/L) por 2h.

### 5.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE

Conforme verificado na FIGURA 18, a atividade da enzima glutathione S-transferase (EC. 2.5.1.18) diminuiu significativamente quando as células B16-F10 foram tratadas com luteolina e quercetina nas doses de 50  $\mu$ mol/L, demonstrando uma inibição da atividade desta enzima. Isto pode ocorrer devido às interações na própria estrutura protéica da enzima podendo a estrutura do anel B com grupo catecol, presente nesses dois compostos, estar associado a esse efeito. O tratamento com a apigenina e a flavona não alteram a atividade enzimática da GST.

Como também foi demonstrado por Van Zanden *et al.* (2004), a luteolina e a quercetina apresentam forte inibição para a GST P1-1 (a isoenzima mais importante da GST). Este estudo foi realizado com células MCF7 (células de câncer de mama), com IC<sub>50</sub> de 0,8 e 1,3 µmol/L, respectivamente.

Nos estudos de Robaszekiewicz *et al.* (2007) em células pequenas de câncer de pulmão, somente na dose de 100µmol/L de quercetina que os autores encontraram redução na atividade da GST, porém seu tempo de tratamento foi de apenas 6h.

Zhang e Das (1994), analisando uma série de polifenóis, e utilizando-se de GST purificada de fígado de rato, calcularam a IC<sub>50</sub> para a quercetina como 19 µmol/L e para a apigenina como 29 µmol/L. O tratamento foi realizado *in vitro*, com um cálculo da IC<sub>50</sub> por regressão linear de pelo menos cinco valores entre 20 e 80% da inibição. Este resultado difere do nosso trabalho muito provavelmente devido ao tempo de tratamento de 24h em um ambiente celular estar sujeito a diferentes condições de regulação do que o utilizado por Zhang e Das, onde a inibição foi realizada com a mesma enzima purificada e adicionado o polifenol de estudo.

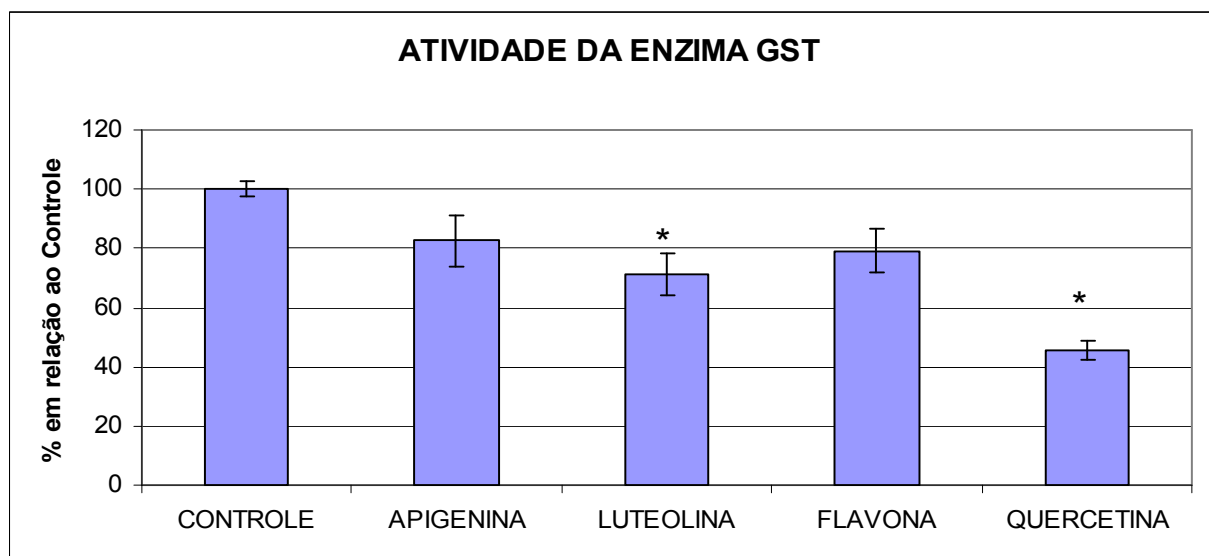


FIGURA 18 – Atividade enzimática da glutathione S-Transferase

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Atividade da enzima glutathione-S-transferase, com valores em relação ao controle com DMSO. Cálculos realizados com o  $\Delta$  da absorbância, por 3 minutos. Valores compostos por média de três experimentos independentes em triplicata. A análise foi realizada com os passos descritos no item 4.10. Os tratamentos foram realizados com concentração de 50 µmol/L para os 4 flavonóides. \* valores com diferenças estatisticamente significativas ao controle ( $p < 0.05$ ).

## 6. CONCLUSÕES

A viabilidade celular de B16-F10 não foi alterada pelo tratamento somente com  $^1\text{O}_2$  (10 mmol/L). No tratamento com apigenina, a viabilidade celular foi reduzida nas doses de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  e facilitou a morte celular do  $^1\text{O}_2$  na dose de 10  $\mu\text{mol/L}$ . Com este flavonóide, o conteúdo de glutathiona total foi reduzido nas três doses testadas e apenas nas doses de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  protegeu as células do estresse provocado pelo  $^1\text{O}_2$ . Para GSSG, reduziu os valores nas maiores doses de tratamento. A luteolina reduziu a viabilidade celular de B16-F10 somente na maior dose, e reduziu as concentrações de glutathiona total em todas as doses testadas, mas não interferiu em um tratamento posterior com  $^1\text{O}_2$ . Para GSSG apresentou uma tendência à redução dos seus níveis. A flavona não interfere na viabilidade celular de B16-F10 nas doses testadas, nem com o posterior tratamento com  $^1\text{O}_2$ . Na concentração de glutathiona total a flavona foi capaz de reduzi-la nas maiores doses, mas parece conferir proteção às células ao  $^1\text{O}_2$  em doses menores. Não alterou os níveis de GSSG. A quercetina reduziu a viabilidade de B16-F10 na maior dose e favoreceu a morte celular provocada pelo  $^1\text{O}_2$  quando utilizado 25  $\mu\text{mol/L}$ . Este flavonol foi capaz de reduzir as concentrações de glutathiona total nas três doses e parece proteger as células contra o estresse gerado pelo  $^1\text{O}_2$  nas maiores doses. Mas não interferiu na concentração de GSSG. A atividade da enzima glutathiona-S-transferase não foi afetada pelo tratamento das células B16-F10 com apigenina e flavona, mas a luteolina e a quercetina reduziram a atividade desta enzima. A redução da glutathiona total e a manutenção dos níveis de GSSG podem estar relacionadas ao estímulo das MRPs, pelos flavonóides, aumentando o efluxo de GSH e GSSG. Como os flavonóides inibiram uma diminuição adicional dos níveis de GSx pela ação do  $^1\text{O}_2$ , este pode estar atuando sobre outros alvos celulares, uma análise de oxidação de outras biomoléculas poderá contribuir para um entendimento mais completo da implicação desses resultados.

## 7. REFERÊNCIAS

AGNEZ-LIMA, L.F.; NAPOLITANO, R.L.; FUCHS, R.P.P.; DI MASCIO, P.; MUOTRI, A.R.; MENCK, C.F.M. DNA repair and sequence context affect 1O<sub>2</sub>- induced mutagenesis in bacteria. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2899-2903, 2001.

AITKEN, G. R.; HENDERSON, J. R.; CHANG, S.; McNEIL, C.J.; BIRCH-MACHIN, M. A. Direct monitoring of UV-induced free radical generation in HaCaT keratinocytes. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 32, p. 722-727, 2007.

[AMERICAN CANCER SOCIETY.](http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT_1x_Cancer_Facts_and_Figures_2008.asp) Disponível em <[http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT\\_1x\\_Cancer\\_Facts\\_and\\_Figures\\_2008.asp](http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT_1x_Cancer_Facts_and_Figures_2008.asp)>. Acesso em 25/01/2009.

ASHOKKUMAR, P.; SUDHANDIRAN, G. Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 62, 590 – 597, 2008.

ÁVILA, M.A.; VELASCO, J.A.; CANSADO, J.; NOTARIO, V. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. **Cancer Research**, v. 54, p. 2424-2428, 1994.

AXELROD, M.; SERAFIN, D.S.; KLITZMAN, B. Ultraviolet light and free radicals: an immunologic theory of epidermal carcinogenesis. **Epidermal Carcinogenesis**, v.86, p. 582-593, 1990.

BAIER, J.; MAISCH, T.; LANDTHALER, M.; BÄUMLER, W. Direct detection of singlet oxygen generation by UVA irradiation in human cells and skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 1498-1506, 2007.

BANDELE, O.J.; OSHEROFF, N. Bioflavonoids as poison of human topoisomerase II $\alpha$  and II $\beta$ . **Biochemistry**, v. 46, p. 6097-6108, 2007.



BAZZANO, L. A.; SONG, Y.; BUBES, V.; GOOD, C. K.; MANSON, J. E. LIU, S. Dietary intake of whole and refined grain breakfast cereals and weight gain in men. **Obesity Research**, v. 13, p. 1952-1960, 2005

BENJAMIN, C. L.; ANANTHASWAMY, H. N. *p53* and the pathogenesis of skin cancer. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 224, p. 241-248, 2007.

BENLLOCH, M.; ORTEGA, A.; FERRER, P.; SEGARRA, R.; OBRADOR, E.; ASENSI, M; CARRETERO, J.; ESTRELA, J.M. Acceleration of glutathione efflux and inhibition of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase sensitize metastatic B16 melanoma cells to endothelium-induced cytotoxicity, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 6950-6959, 2005.

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

BIROCCIO, A.; BENASSI, B.; FILOMENI, G.; AMODEI, S.; MARCHINI, S.; CHIORINO, G.; ROTILIO, G.; ZUPI, G.; CIRIOLO, M.R.; Glutathione influences c-Myc-induced apoptosis in M14 human melanoma cells. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 43763-43770, 2002.

BIROCCIO, A., BENASSI; B. FIORENTINO, F.; ZUPI,G. Glutathione depletion induced by c-Myc downregulation triggers apoptosis on treatment with alkylating agents. **Neoplasia**, v. 6, p. 195-206, 2004.

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

BRAR, S.S.; KENNEDY, T.P.; WHORTON, A.R.; STURROCK, A.B.; HUECKSTEADT, T.P.; GHIO, A.; HOIDAL, J.R. Reactive oxygen species from NAD(P)H: quinone oxidoreductase constitutively activate NF- $\kappa$ B in malignant melanoma cells. **American Journal Physiology Cell Physiology**, v. 290, p. c659-c676, 2001.

CADET, J.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; RAVANAT, J. Oxidative damage to DNA: formation, mensurement and biochemical features. **Mutation Research**, v. 531, p. 5-23, 2003.

CALTAGIRONE, S.; ROSI, C.; POGGI, A.; RANELLETTI, F.O.; NATALI, P.G.; BRUNITTI, M.; AIRELLO, F.B.; PLANTELLI, M. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potencial. **International Journal of Cancer**, v. 87, p. 595-600, 2000.

CARRETERO, J.; OBRADOR, E.; ANASAGASTI, M.J.; MARTIN, J.J.; VIDAL-VANACLOCHA, F.; ESTRELA, J.M. Growth-associated changes in glutathione content correlated with liver metastatic activity of B16 melanoma cells. **Clin Exp Metastasis**, v.17, p. 567-574, 1999.

CHEN, K. G.; VALENCIA, J. C.; ZHANG, G.; PATERSON, J. K.; ROUZAUD, F.; BERENS, W.; WINCOVITCH, S. M.; GARFIELD, S. H.; LEAPMAN, R. D.; HEARING, V. J.; GOTTESMAN, M. M. Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contribuites to the intractability of malignant melanomas. **PNAS**, v. 103, n. 26, p. 9903-9907, 2006.

CHOI, J.; CONRAD, C.C.; MALAKOSWSKY, C.A.; TALENT, J.M.; YUAN, C.; GRACY, R.W. Flavones fron *Scutellaria baicalensis* Georgi attenuate apoptosis and protein oxidation in neuronal cell lines. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1571, p. 201-210, 2002.

CHOI, M. Y.; SONG, H.S.; HUR, H.S.; SIM, S.S. Whitening activity of luteolin related to the inhibition of cAMP pathway in  $\alpha$ -MSH-stimulated B16 melanoma cells. **Archives Pharmacological Research**, v. 31, p. 1166-1171, 2008.

DE ROSSO, V. V.; VIEYRA, F. E. M.; MERCADANTE, A. Z.; BORSARELLI, C. D. Singlet oxygen quenching by anthocyanin's flavylum cations. **Free Radical Research**, v. 42, p. 885- 891, 2008.

DEVASAGAYAM, T.P.A.; SUNDQUIST, A.R.; DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Activity of thiol as singlet molecular oxygen quenchers. **Journal of Photochemical and Photobiology B: Biology**, v. 9, p. 105-116, 1991.

DEVASAGAYAM, T.P.A.; SUBRAMANIAN, M.; SINGH, B.B.; RAMANATHAN, R.; DAS, N.P. Protection of plasmid pBR322 DNA by flavonoids against single-strand breaks induced by singlet molecular oxygen. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 30, p. 97-103, 1995.

FERRANDINA, G.; ALMADOR, G.; MAGGIANO, N.; LANZA, P.; FERLINI, C.; CATTANI, P.; PINATELLI, M.; SCAMBIA, G.; RANELLETTI, F.O. Growth-inhibitory effect of tamoxifen and quercetin and presence of type II estrogen binding sites in human laryngeal cancer cell lines and primary laryngeal tumors. **International Journal Cancer**, v. 77, p. 747-754, 1998.

FERRÁNDIZ, M.L.; ALCARAZ, M.J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents Actions**, v.32, p. 283-288, 1991.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, Florianópolis, v. 43, p. 61-68, 1997.

FIRUZI, O.; LACANNA, A.; PETRUCCI, R.; MARROSU, G.; SASO, L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1721, p. 174-184, 2005.

FLOHE, L.; GÜNZLER, W. A.; SCHOCK. Glutathione peroxidase: a selfoenzyme. **FEBS Letters**, v. 32, p. 132-134, 1973.

FOOTE, C. S.; CLENNAN, E.L. Properties and reactions of singlet dioxygen, In active oxygen in chemistry. **Editores EDS**, vol. 2, p. 105, 1995.

FOOTE, C.S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochemistry and Photobiology**, v.54, p. 659-659, 1991.

FORNI, C.; BRAGLIA, R.; LENTINI, A.; NUCCETELLI, M.; PROVENZANO, B.; TABOLACCI, C.; BENINATI, S. Role of transglutaminase 2 in quercetin-induced differentiation of B16-F10 murine melanoma cells, **Amino Acids**, v. ?, p.?, 2008.

GALATI, G.; MORIDANI, M.Y.; CHAN, T. S.; O'BRIEN, P.J. Peroxidative metabolism of apigenin and narigenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, p. 370-382, 2001.

GHIBELLI, L.; COPPOLA, S.; FANELLI, C.; ROTILIO, G.; CIVITAREALE, P.; SCOVASSI, A. I.; CIRIOLO, M. R. Glutathione depletion causes cytochrome c release even in absence of cell commitment to apoptosis. **FASEB J.**, v. 13, p. 2031-2036, 1999.

GILLIES, R.J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Analytical Biochemistry**, v. 159, p. 109-113, 1986.

GLOIRE, G.; LEGRAND-POELS, S.; PIETTE, J. NF- $\kappa$ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 1493-1505, 2006.

GOVIDARAJAN, B. Malignant transformation of melanocytes to melanoma by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) signaling. *J. Biol. Chem.* v. 278, p. 9790–9795, 2003.

GOVINDARAJAN, B.; SLIGH, J. E.; VICENT, B. J.; LI, M.; CANTER, J. A.; NICKOLOFF, B. J.; RODENBURG, R. J.; SMEITINK, J. A.; OBRLEY, L.; ZHANG, Y.; SLINGERLAND, J.; ARNOLD, R. S.; LAMBERTH, D.; COHEN, C.; HILENSKI, L.; GRIENGLING, K.; MARTINEZ-DIEZ, M.; CUEZVA, J. M.; ARBISER, J. L. Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 719-729, 2007.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, p.851-857, 2007.

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

GUPTA, S.; AFAQ, F.; MUKHAR, H. Selective Growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate

carcinoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 287, p. 914-920, 2001

HABIG, W. H.; JAKOBY, W.B. Assay for differentiation of glutathione S-transferase. **Methods in Enzimology**, v.77,p. 399-405, London, 1981.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 4 ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HANSON, K. M.; CLEGG, R. M. Observation and quantification of ultraviolet-induced reactive oxygen species in *ex vivo* human skin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, p. 57-63, 2002.

HE, Y.; HUANG, J.; RAMIREZ, D. C.; CHIGNELL, C. F. Role of reduced glutathione efflux in apoptosis of immortalized human keratinocytes induced by UVA. **The Journal of Biological Chemistry**,, v. 278, p. 8056-8064, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA .Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>> Acesso em 25/01/2009.

IWASHITA, K.; KOBORI, M.; YAMAKI, K.; TSUSHIDA, T. Flavonoids inhibit cell growth and induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 64, p. 1813-1820, 2000.

JANISCH, K.M.; ÖLSCHLÄGER, C.; TREUTTER, D.; ELSTNER, E. F. Stimulated digestion of *vitis vinifera* seed powder: poliphenolic content and antioxidant properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 54, p. 4839 – 4848, 2006.

JUARRANZ, A.; JAÉN, P.; SANZ-RODRIGUEZ, F.; CUEVAS, J.; GONZÁLEZ, S. Photodynamic therapy of câncer. Basic principles and applicatios. **Clin. Transl. Oncol**, v. 10, p. 148-154, 2008.

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

KAJIWARA, T.; KEARNS, D.R. Direct spectroscopic evidence for a deuterium solvent effect on the lifetime of singlet oxygen in water. **Journal of the American Chemical Society**, v. 95, p. 5886-5890, 1973.

KAUR, P.; SHUKLA, S.; GUPTA, S. Plant flavonoid apigenin inactivates Akt to trigger apoptosis in human prostate cancer: an *in vitro* an *in vivo* study. **Carcinogenesis**, v. 29, p. 2210-2217, 2008.

KIMATA, M.; INAGAKI, N. NAGAI, H. Effects of luteolin and other flavonoids on IgE-mediated allergic reactions. **Plant Med**, v. 66, p. 25-29, 2000.

KLOTZ, L.; PILLIEUX, C.; BRIVIBA, K.; PIERLOT, C.; AUBRY, J. SIES, H. Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA. **European Journal of Biochemical**, v. 260, p. 917-922, 1999.

KOLAROVA, H.; NEVRELOVA, P.; BAJGAR, R.; JIROVA, D.; KEJLOVA, K.; STRNAD, M. In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. **Toxicology in vitro**, v. 21, p. 249-253, 2007.

KULIG, M.J.; SMITH, L.L. Sterol metabolism. XXV. Cholesterol oxidation by singlet molecular oxygen. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 38, p. 3639-3642, 1973.

LABERGE, R.; KARWATSKY, J.; LINCOLN, M.C.; LEIMANIS, M.L.; GEORGES, E. Modulation of GSH levels in ABCC1 expressing tumor cells triggers apoptosis through oxidative stress. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, p. 1727-1737, 2007.

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

LAVRENTIADOU, S. N.; CHAN, C.; KAWCAK, T.; RAVID, T.; TSABA, A.; VLIET, A.; RASOOLY, R.; GOLDKORN, T. Ceramide-mediated apoptosis in lung epithelial cell is regulated by glutathione. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 25, p. 676-684, 2001.

LEBEDEVA, I.V.; WASHINGTON, I.; SARKAR, D.; CLARK, J.A.; FINE, R.L.; DENT, P.; CURIEL, D.T.; TURRO, N.J.; FISHER, P.B. Strategy for reversing resistance to a

single anticancer agent in human prostate and pancreatic carcinomas. **PNAS**, v. 104, p. 3484-3489, 2007.

LESLIE, E.M.; BOWERS, R.J.; DEELET, R.G.; COLE S. P. C. Structural requirements for functional interaction of glutathione tripeptide analogs with the human multidrug resistance protein 1 (MRP1). **The Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, p. 643-653, 2003.

LIANG, Y.; HUANG, Y.; TSAI,S.; SHIAU, S.L.; CHENC.; LIN, J. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 1945-1952, 1999.

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

LIN, J. Y.; FISHER, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, v. 445, p. 843-850, 2007.

LOTITO, S. B.; FREI, B. Consumption of flavonoid-rich foods and increase plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 1727-1746, 2006.

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

MARTINEZ, G. R. Geração química de oxigênio-18 molecular no estado singlete  $^{18}\text{O}_2$  ( $^1\Delta_g$ ), e estudos de lesões em DNA. 170f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARTÍNEZ, C.; YAÑES, J.; ALCARAZ, M.; BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILO, J.; LORENTE,J.; LOZANO, J.A. Effect of several polyhydroxylated flavonoids on the growth of B16-F10 melanoma and Melan-a melanocyte cell lines: influence of the sequential oxidation state of the flavonoid skeleton. **Melanoma Research**, v. 13, p. 3-9, 2003.

MATSUI, J.; KIYOKAWA, N.; TAKENOUCI, H.; TAGUCHI, T.; SUZUKI, K.; SHIOZAWA, M.; TANG, W.; KATAGIRI, Y. U.; OKITA, H. FUJIMOTO, J. Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. **Leukemia Research**, v. 29, p. 573-581, 2005.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-760, 1983.

MERCER, L. D.; KELLY, B. L.; HORNE, M. K.; BEART, P. M. Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 339-345, 2005.

MEYSKENS JR, F. L.; FARMER, P.; FRUEHAUF, J. P. Redox regulation in human melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Res**, v. 14, p. 148-154, 2001.

MEYSKENS, F.L.; BUCKMEIER, J.A.; McNULTY, S.E.; TOHIDIAN, N.B. Activation of nuclear factor- $\kappa$ B in human metastatic melanoma cells and the effect of oxidative stress. **Clinical Cancer Research**, v.5, p. 1197-1202, 1999.

MICHELS, G.; WÄTJEN, W.; NIERING, P.; STEFFAN, B.; THI, Q. T.; CHOVOLOU, Y.; KAMPKÖTTER, A.; BAST, A.; PROKSCH, P.; KAHL, R. Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells. **Toxicology**, v. 206, p. 337-348, 2005.

MOAN, J.; BERG, K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. **Photochemical and Photobiology**, v. 53, p. 549-553, 1991.

MOLINA-JIMENEZ, M.F.; SANCHEZ-REUS, M.I.; CASCALES, M.; ANDRÉS, D.; BENEDI, J. Effect of fraxetin on antioxidant defense and stress proteins in human neuroblastoma cell modelo f rotenona neurotoxicity. Comparative study with myricetin and N-acetylcysteine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 209, p. 214-225, 2005.

MOON, M J.; NAKATA, R.; OSHIMA, S.; INAKUMA, T.; TERAOKA, J. Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by



women. **American Journal Physiol Regulatory Integrative Physiol**, v. 279, p. r461-r467, 2000.

MORGAN, P. E.; DEAN, R. T.; DAVIES, M. J. Protective mechanism against peptide and protein peroxides generated by singlet oxygen. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 4, p. 484-496, 2004.

NAGATA, H.; TAKEKOSHI, S.; TAKEYAMA, R.; HOMMA, T. Quercetin enhances melanogenesis by increasing the activity an synthesis of tyrosinase in human melanoma cells and in normal human melanocytes. **Pigment Cell Res**, v. 17, p. 66-73, 2004.

NELSON, A.A.; TSAO, H. Melanoma and genetics. **Clinical in Dermatology**, v. 27, p. 46-52, 2009.

NIJHOFF, W.A.; BOSBOOM, M.A.; SMIDT, M.H.; PETERS, W.H.M. Enhancement of rat hepatic and gastrointestinal glutathione and glutathione S-transferases by  $\alpha$ -angelicalactone and flavone. **Carcinogenesis**, v. 16, p. 607-612, 1995.

NITODA, T.; ISOBE, T.; KUBO, I. Effects of phenolic compounds isolated from *Rabdosia japonica* on B16-F10 melanoma cells. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 867-872, 2008.

NO, J. K. ; KIM, Y. J.; LEE, J. S.; CHENG, H. Y. Inhibition of melanogenic activity by, 4,4'-dihydroxibiphenil in melanoma cells. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, p. 14-16, 2006.

OTSU, K.; SATO, K.; IKEDA, Y.; IMAIS, H.; NAKAGAWA, Y.; OHBA, Y.; FUJII, J. Na abortive apoptotic pathway induced by singlet oxygen is due to the suppression of caspase activation. **Biochemical Journal**, v. 389, p. 1197-206, 2005.

OZAWA, N.; YAMAZAKI, S.; CHIBA, K.; AOYAMA, H.; TOMISAWA, H.; TATEISHI, M.; WATABE, T. Occurrence of cholesterol 7 $\alpha$ - and 7 $\beta$ -hydroperoxidess in rat skin as aging markers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 178, p. 242-247, 1991.

PENG, L.; WANG, B.; REN, P. Reduction of MTT by flavonoids in absence of cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 45, p. 108-111, 2005.

RADHAKRISHNAN, S. K.; KAMALAKARAN. Pro-apoptotic role of NF-kB: implications for cancer therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1766, p. 53-62, 2006.

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

RAMOS, A.M.; ALLER, P. Quercetin decrease intracellular GSH content and potentiates the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide in human leukemia cell lines. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 1912-1923, 2008.

RAPPA, G.; LORICO, A.; FLAVELL, R.A.; SARTORELLI, A.C. Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural products toxins. **Cancer Research**, v.57, p. 5232-5237, 1997.

ROBASZKIWICZ, A.; BALCERCZYK, A.; BARTOSZ, G. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biology International*, v. 31, p. 1245-1250, 2007.

ROSATI, A.; AMMIRANTE, M.; GENTILLELA, A.; BASILE, A.; FESTA, M. PASCALE, M.; MARZULLO, L.; BELISARIO, M. A.; TOSCO, A.; FRANCESCHELLI, S.; MOLTEDO, O.; PAGLIUCA, G.; LEROSE, R.; TURCO, M.C. Apoptosis inhibition in cancer cells: A novel molecular pathway that involves BAG3 protein. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 1337-1342, 2007.

ROSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; MARTINEZ, G. R.; BECHARA, E.; DI MASCIO, P. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n.3, p. 563-568, 2006.

ROTHNIE, A.; CONSEIL, G.; LAU, A.Y.T.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P.C. Mechanistic differences between GSH transport by multidrug resistance protein 1 (MRP1/

ABCC1) and GSH modulation of MRP1- mediated transport. **Molecular Pharmacology**, v. 74. p. 1630-1640, 2008.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

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

SANTOS, V. A. dos. O efeito da melanina em células tratadas com oxigênio molecular singlete. 96f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SAVIC-RADOJEVIC, A.; MIMIC-OKA, J.; PLJESA-ERCEGOVA, M.; OPACIC, M.; DRAGICEVIC, D.; KRAVIC, T.; DJORIC, M.; MICIC, S.; SIMIC, T. Gluthatione S-Transferase –P1 expression correlates with increase antioxidant capacity in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **European Urology**, v. 27, p. 470-477, 2007.

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

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p. 916-921, 1999.

SLOMINSKI, A.; TOBIN, D. J.; SHIBAHARA, S. WORTSMAN, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation, **Physiol Rev**, v. 84, p. 1155-1228, 2004.

SON, Y.; LEE, K.; LEE, J.; JANG, H.; KIM, J.; JEON, Y.; JANG, Y. Selective antiproliferative and apoptotic effects of flavonoids purified from *Rhus verniciflua*

stokes on normal versus transformed hepatic cell lines. **Toxicology Letters**, Shannon, v. 155, p. 115-125, 2005.

SOUZA, R. P.S.; FISCHER, F. M.; SOUZA, J. M. P. Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo: revisão de literatura. **Rev Saúde Pública**, v. 38, p. 588-598, 2004.

TSUJI, P. A.; WALLE, T. Benzo[a]pyrene-induced cytochrome P450 1A and DNA binding in cultured trout hepatocytes-inhibition by plant polyphenols. **Chem Biol Interact**, v. 169, p. 25-31, 2007.

ULLMANNOVA, V.; POPESCU, N. Inhibition of cell proliferation induction of apoptosis, reactivation of DLC1, and modulation of the other gene expression by dietary flavone in breast cancer cell lines. **Cancer Detection and Prevention**, v. 31, p. 110-118, 2007.

VALDAMERI, G. Efeitos da flavona sobre o metabolismo mitocondrial. 75f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

VAN ZANDEN, J. J. ; WORTELBOER, H. M.; BIJLSMA, S.; PUNT, A.; USTA, M.; BLADEREN, P. J. van; RIETJENS, I. M. C. M.; CNUBBEN, N. H. P. Quantitative structure activity relationship studies on the flavonoid mediated inhibition of multidrug resistance proteins 1 and 2. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 699-708, 2005.

VAN ZANDEN, J.J.; GARAETS, L.; WORTELBOER, H. M.; VAN BLADEREN, P. J.; RIETJENS, I.M.C.M.; CNUBBEN, N.H.P. Structural requirements for the flavonoid-mediated modulation of glutathione S-transferase P1-1 and GS-X pump activity in MCF7 breast cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 1607- 1617, 2004.

VÁSQUEZ-GARZÓN, V.R.; ARELLANES-ROBLEDO, J.; GARCÍA-ROMÁN, R.; APARICIO-BAUTISTA, D.I.; VILLA-TREVIÑO, S. Inhibition of reactive oxygen species and pré-neoplastic lesions by quercetin through an antioxidant defense mechanism. **Free Radical Research**, v. ?, p.1-10, 2009.

WANG, S. Q.; SETLOW, R.; BERWICK, M.; POLSKI, D.; MARGHOOB, A. A.; KOPF, A. W.; BART, R. S. Ultraviolet A and melanoma: A review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, p. 837-846, 2001.

WATSON, A.J.; ASKEW, J.N.; SANDLE, G.I. Characterisation of oxidative injury to an intestinal cell line (HT-29) by hydrogen peroxide. **Gut**, v. 35, p. 1575-1581, 1994.

WAY, T.; KAO, M.; LIN, J. Degradation of HER2/neu by apigenin induces apoptosis through cytochrome c release and caspase-3 activation in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. **FEBS Letters**, v. 579, p. 145-152, 2005.

WENZEL, U.; NICKEL, A.; DANIEL, H. Increase mitochondrial palmitoylcarnitine/carnitine countertransport by flavone causes oxidative stress and apoptosis in colon cancer cells. **Cellular and Molecular Life Science**, v.62. p. 3100-3105, 2005.

WILMS, L. C. HOLLMAN, P. C. H.; BOOTS, A. W.; KLEINJANS, J. C. S. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE\_DNA adducts in human lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 582, p. 155-162, 2005.

YAMAZAKI, S.; OZAWA, N.; HIRATZUKA, A.; WATABE, T. Photogeneration of 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -cholest-6-ene-5-hidroperoxide in rat skin: evidence for occurrence of singlet oxygen *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 3/4, p. 301-308, 1999.

YANG, J.; LIU, B.; LIANG, G.; NING, Z. Structure-activity relationship of flavonoids active against lard oil oxidation based on quantum chemical analysis. **Molecules**, v. 14, p. 46-52, 2009.

YEH, S.; WANG, W.; HUANG, C.; HU, M. Pro-oxidative effect of  $\beta$ -carotene and the interaction with flavonoids on UVA-induced DNA strands breaks in mouse fibroblast C3H10T1/2 cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 729-735, 2005.

YOSHIDA, M.; SAKAI, T.; HOSOKAWA, N.; MARUI, N.; MATSUMOTO, K.; FUJIOKA, A.; NISHINO, H.; AOIKE, A. The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. **FEB**, v. 260, p. 10-13, 1990.

YOSHIDA, M.; YAMAMOTO, M.; NIKAIDO, T. Quercetin arrest human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. **Cancer Research**, v. 52, p. 6676-6681, 1992.

YOSHIDA, T. Determination of reduced and oxidized glutathione in erythrocytes by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography B**, v. 678, p. 157-164, 1996.

ZHENG, P.; CHIANG, L.; LIN, C. Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. **Life Sciences**, v. 76, p. 1367-1379, 2005.