

TATIANA HERRERIAS

**EFEITOS DE FLAVONÓIDES SOBRE O METABOLISMO MITOCONDRIAL E
SUAS IMPLICAÇÕES NA VIABILIDADE E APOPTOSE DE CÉLULAS DE
MELANOMA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências: Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Eliane Merlin Rocha

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Benigna Martinelli Oliveira

Co-Orientadora: Profa. Dra. Glaucia Regina Martinez.

Curitiba

2009

Ao meu marido Wilson, meus filhos Ana Luiza e Augusto
À minha mãe Sally, minha irmã Thaisa e meu afilhado João Pedro
Obrigada por acreditarem tanto em mim...
Esse trabalho é pra vocês com muito amor...

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra Maria Eliane Merlin Rocha pelos seis anos de convivência que foram de muito aprendizado para mim. Muito obrigada pela paciência e extrema generosidade que teve comigo.

À Prof. Dra. Maria Benigna Martinelli de Oliveira pelo exemplo de dedicação e amor pelo seu trabalho, a senhora vai sempre fazer muita falta.

À Prof. Dra. Glaucia Regina Martinez, pois aprendi muito com você. Obrigada por sempre estar disposta a ensinar e principalmente por me permitir explorar novas possibilidades.

As demais integrantes do Grupo de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular: Prof. Dra. Silvia Maria Suter Correia Cadena, Profa. Dra Eva G. Carnieri, Profa. Dra. Guilhermina R. Noletto e Profa. Dra. Sheila B. Winnischofer por sempre estarem mais que dispostas a ajudar e esclarecer quaisquer dúvidas.

Ao Prof. Brás Heleno de Oliveira pela gentileza em abrir seu laboratório para extração da hispidulina e eupafolina e por sempre responder minhas dúvidas de “iniciante” com tanta paciência.

Aos meus amigos Maurício Lacerda Belem e Alexandre Augusto de Oliveira por extraírem eupafolina e hispidulina tão generosamente para meus experimentos.

À Profa. Lucélia Donatti pelo auxílio nos experimentos de microscopia eletrônica, obrigada por ter me atendido tão prontamente e com tanta boa vontade.

À Profa. Célia Regina Cavichiolo Franco por ceder a fibronectina para os experimentos de adesão celular.

À minhas amigas Silvia Romão, Rosilene Rebeca com certeza vocês tornaram esse tempo muito mais agradável.

À minha amiga Stelia Carolina obrigada por ser tão minha amiga e parceira. Vou sentir muita falta das suas risadas e do seu inabalável otimismo.

Aos meus amigos Glaucio e Paulo, pois mais que colegas, sempre fomos parceiros, sentirei falta de nossas conversas na cantina.

À Marilza Lamour, secretária do Curso de Pós-Graduação pelo seus préstimos.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. MELANOMA	18
2.2. TRATAMENTO DO MELANOMA	20
2.3. FLAVONÓIDES	22
2.3.1. Classes	24
2.3.2. Absorção, metabolização e excreção	27
2.3.3. Propriedades e Atividade antitumoral.....	28
2.3.4. Flavonas	31
2.3.4.1. Luteolina	34
2.3.4.2. Apigenina	35
2.3.4.3. Flavona	36
2.3.4.4. Eupafolina e Hispidulina	36
2.4. RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE	38
2.5 MITOCÔNDRIA, ESTRESSE OXIDATIVO E APOPTOSE	39
3. OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4. EXTRATÉGIA EXPERIMENTAL	45
5. MATERIAIS E MÉTODOS	47
5.1 REAGENTES	47
5.2 ISOLAMENTO DOS FLAVONÓIDES EUPAFOLINA E HISPIDULINA	47
5.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE FLAVONÓIDES	48
5.4 ANIMAIS	48
5.5 ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO	48
5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ATPÁSICA EM MITOCÔNDRIAS INTACTAS	49
5.7. DETERMINAÇÃO DO INCHAMENTO (<i>SWELLING</i>) MITOCONDRIAL NA PRESENÇA DE ACETATO DE SÓDIO UTILIZANDO MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS	50
5.8. EFEITOS DA HISPIDULINA E EUPAFOLINA SOBRE A TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL INDUZIDA POR CÁLCIO EM MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS	51
5.9. EFEITOS DA HISPIDULINA E EUPAFOLINA SOBRE A FLUIDEZ DE MEMBRANAS ARTIFICIAIS E NATURAIS VERIFICADOS POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA	51

5.9.1. Preparo das Membranas Artificiais (liposomas de dimiristoilfosfatidil-colina - DMPC)	51
5.9.2 Preparo das Membranas Naturais (liposomas de membranas mitocondriais).....	52
5.9.3 Incorporação das Sondas as Membranas Artificiais e Naturais	53
5.9.4 Medições Fluorimétricas	54
5.9.5 Determinação da Temperatura Média de Transição de Fase (T _m)	56
5.10. CULTURA CELULAR	58
5.10.1 Esterilização de Materiais	58
5.10.2. Soluções Tampão e Meios de Cultura	58
5.10.2.1. Solução Salina Tamponada (PBS)	58
5.10.2.2. Meio de Cultura	58
5.10.2.3. Solução de Tripsina-EDTA	59
5.10.2.4. Manutenção das Células B16-F10 e MelanA	59
5.11. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR	60
5.12. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	61
5.13. ESTUDOS MORFOLÓGICOS	61
5.13.1. Microscopia Eletrônica de Varredura	61
5.13.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	62
5.14. ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DE CITOCROMO C	63
5.15. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES	64
5.15.1 Obtenção do extrato livre de células.....	64
5.15.2 Superóxido Dismutase	64
5.15.2 Catalase	65
5.15.3 Glutathiona Redutase (Gred)	65
5.15.4 Glutathiona Peroxidase (Gpx)	66
5.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
6.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EUPAFOLINA E HISPIDULINA SOBRE A BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E FLUIDEZ DE MEMBRANAS.....	68
6.1.1 Efeito da eupafolina sobre a atividade da ATPase em mitocôndrias intactas	68
6.1.2 Efeito da eupafolina sobre o inchamento (<i>swelling</i>) mitocondrial na presença de acetato de sódio utilizando-se mitocôndrias energizadas	71
6.1.3 Efeitos dos flavonóides eupafolina e hispidulina sobre a fluidez de membranas artificiais e naturais	74
6.1.4 Efeitos dos flavonóides eupafolina e hispidulina sobre a transição de permeabilidade mitocondrial	83
6.2. EXPERIMENTOS COM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10	89
6.2.1. Ensaio de viabilidade celular	89
6.2.2. Efeito das flavonas sobre a proliferação de células B16 - F10	92
6.2.3 Efeitos de flavonóides sobre a morfologia das células de melanoma murino B16-F10	95

6.2.3.1 Avaliação dos efeitos de flavonóides sobre a morfologia das células B16 – F10 através da técnica de microscopia eletrônica de varredura	96
6.2.3.2 Avaliação dos efeitos de flavonóides sobre a morfologia das células B16- F10 através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão	99
6.2.4. Efeitos das flavonas sobre a liberação de citocromo <i>c</i>	105
6.2.5. Efeitos das flavonas sobre a atividade de enzimas antioxidantes	107
6.2.5.1 Superóxido Dismutase	108
6.2.5.2. Catalase	113
6.2.5.3 Glutaciona peroxidase	114
6.2.5.4 Glutaciona redutase	116
6.3. Experimentos com melanócitos normais de camundongo (Melan A)	118
7. DISCUSSÃO FINAL	122
8. CONCLUSÕES	126
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
10. ANEXOS	146

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: NUMERAÇÃO DE UM FLAVONÓIDE COM ANEL C (FLAVONA)	25
FIGURA 2: ESTUTURA GERAL DE ALGUMAS CLASSES DE FLAVONÓIDES	26
FIGURA 3: FÓRMULAS ESTRUTURAIS DAS FLAVONAS	33
FIGURA 4: FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	46
FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO DAS MEDIÇÕES DE POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA	57
FIGURA 6: EFEITO DA EUPAFOLINA SOBRE O INCHAMENTO (SWELLING) E CONTRAÇÃO DE MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS COM GLUTAMATO NA PRESENÇA DE ACETATO DE SÓDIO	73
FIGURA 7: EFEITO DA EUPAFOLINA E HISPIDULINA SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DA SONDA DPH EM MEMBRANA ARTIFICIAL EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA	78
FIGURA 8: EFEITO DA EUPAFOLINA E HISPIDULINA SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DA SONDA DPH - PA EM MEMBRANA ARTIFICIAL EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA	79
FIGURA 9: EFEITO DA EUPAFOLINA E HISPIDULINA SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DA SONDA DPH EM MEMBRANA NATURAL EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA	80
FIGURA 10: EFEITO DA EUPAFOLINA E HISPIDULINA SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DA SONDA DPH-PA EM MEMBRANA NATURAL EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA	81
FIGURA 11: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL.....	86
FIGURA 12: EFEITO DA EUPAFOLINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO PELA ADIÇÃO DE CÁLCIO	87
FIGURA 13: EFEITO DA HISPIDULINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO PELA ADIÇÃO DE CÁLCIO	88
FIGURA 14: EFEITO DAS FLAVONAS SOBRE A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS B16-10	94

FIGURA 15: EFEITO DE FLAVONÓIDES SOBRE A MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16-F10 UTILIZANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	97
FIGURA 16: EFEITO DE FLAVONÓIDES SOBRE A MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16-F10 UTILIZANDO-SE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	98
FIGURA 17: EFEITO DE FLAVONÓIDES SOBRE A MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16-F10 UTILIZANDO-SE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	100
FIGURA 18: EFEITO DE FLAVONÓIDES SOBRE A MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16-F10 UTILIZANDO-SE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	101
FIGURA 19: EFEITO DA EUPAFOLINA SOBRE A MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16-F10 UTILIZANDO-SE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	103
FIGURA 20: EFEITO DE FLAVONÓIDES SOBRE A MORFOLOGIA DE CÉLULAS B16-F10 UTILIZANDO-SE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	104
FIGURA 21: EFEITO DAS FLAVONAS SOBRE A LIBERAÇÃO DE CITOCROMO C EM CÉLULAS B16-F10	106
FIGURA 22: EFEITO DE FLAVONAS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE TOTAL EM CÉLULAS B16-F10	110
FIGURA 23: EFEITO DE FLAVONAS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE EM CÉLULAS B16-F10	113
FIGURA 24: EFEITO DE FLAVONAS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA PEROXIDASE	115
FIGURA 25: EFEITO DE FLAVONAS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA REDUTASE	117

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ALGUNS FLAVONÓIDES E SUAS FONTES NA DIETA	24
TABELA 2: EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ATPase MITOCONDRIAL	70
TABELA 3: EFEITO DE FLAVONAS SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10	90
TABELA 4: EFEITO DE FLAVONAS SOBRE A VIABILIDADE DE MELANÓCITOS NORMAIS DE CAMUNDONGO (MELAN-A)	119
TABELA 5: EFEITOS DE FLAVONAS SOBRE CÉLULAS TUMORAIS (B16-F10) E CÉLULAS NORMAIS DE CAMUNDONGO	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	adenosina 5'-difosfato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BSA	Albumina bovina sérica
CsA	Ciclosporina A
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DPH-PA	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno-ácido propiônico
EGTA	Ácido etilenoglicol bis (éter 2-aminoetil)-N, N, N', N' tetracético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FCCP	carbonilcianida <i>p</i> -trifluorometoxifenilhidrazona
Gpx	Glutaciona peroxidase
Gred	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2'-etanossulfônico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
MTT	Brometo de 3-(4,5-demitiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotideo reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzida
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
PMA	Forbol 12-miristato-13-acetato
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluoreto
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
TRIS	Tris (hidroximetil) amino metano

RESUMO

Flavonóides são compostos fenólicos encontrados em diversas plantas. Vários são os estudos que relatam as suas inúmeras propriedades biológicas e relacionam esses efeitos com a estrutura química desses compostos. Nesse trabalho foram alvo de investigação os flavonóides da classe das flavonas, entre eles, a eupafolina e hispidulina (extraídas do *Eupatorium litorale*), seus correspondentes estruturais sem grupo metoxi, luteolina e apigenina e a representante da classe sem substituintes, a flavona. Os objetivos desse trabalho foram: a) avaliar os efeitos da eupafolina sobre a atividade enzimática da ATPase e sobre o inchamento mitocondrial energizado; b) determinar os efeitos da hispidulina e eupafolina sobre a fluidez de membranas e transição de permeabilidade mitocondrial c) comparar os efeitos citotóxicos das cinco flavonas (hispidulina, eupafolina, apigenina, luteolina e flavona) sobre células de melanoma murino (B16-F10) e melanócitos murinos Melan-A, relacionando-os com suas estruturas químicas e d) determinar o provável mecanismo de morte celular em B16-F10 induzido pelas flavonas testadas. Verificou-se que eupafolina não altera a atividade da enzima ATPase em mitocôndrias intactas com e sem o desacoplador FCCP e inibe completamente o inchamento mitocondrial energizado ($75 - 200 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Através de experimentos de polarização de fluorescência verificou-se que hispidulina e eupafolina afetam a fluidez das membranas de dimiristoilfosfatidilcolina e mitocondriais, especialmente nas suas regiões mais hidrofóbicas. A eupafolina promoveu inibição de $\sim 35\%$ na transição de permeabilidade mitocondrial ($200 \mu\text{mol.L}^{-1}$), já hispidulina não alterou esse parâmetro. Apigenina, flavona, luteolina e eupafolina reduziram a viabilidade das células B16-F10 em 40 - 80% na dose de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$. O número de células viáveis foi reduzido pelas flavonas hispidulina (20%), eupafolina (55%), apigenina (45%) e luteolina (70%) em 48 h de tratamento e por eupafolina (30%), apigenina (30%) e luteolina (65%) em 72 h indicando que di-hidroxilas 3',4' aumentam o efeito citotóxico. Foram obtidas evidências de morte celular por apoptose, nas células tratadas com eupafolina, apigenina e luteolina, quando avaliadas as alterações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura e transmissão e a liberação de citocromo c. O efeito das flavonas ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) sobre a atividade das enzimas antioxidantes em 24 h de tratamento mostrou que hispidulina e apigenina estimulam a atividade de superóxido dismutase em 40%, enquanto que hispidulina (25%), eupafolina (45%), apigenina (40%) e luteolina (35%) inibem a atividade da catalase. Além disso, apigenina e luteolina inibem a atividade da glutathione redutase em 20 e 30%, respectivamente. Os efeitos das flavonas sobre a viabilidade de células Melan-A também foram verificados. Somente a eupafolina e a luteolina, reduziram a viabilidade das células Melan-A, contudo, a eupafolina demonstrou o mais importante efeito citotóxico seletivo promovendo maiores reduções de viabilidade nas células tumorais do que nas células normais. Pode-se concluir que os efeitos biológicos verificados dependem da estrutura das flavonas e os resultados obtidos nos experimentos mitocondriais podem explicar, pelo menos em parte, os efeitos citotóxicos promovidos por elas. Os resultados sugerem a possibilidade desses compostos serem considerados para estudos de terapias anticâncer no futuro.

Palavras-chave: flavonas, membranas, B16-F10, apoptose, enzimas antioxidantes, Melan-A

ABSTRACT

Flavonoids are phenolic compounds found in many plants. There are several works reporting their biologic properties and the relationship with their structures. In this work, we investigated flavonoids from Flavone's class: eupafolin and hispidulin (extracted from *Eupatorium litoralle*) and their structural analogs without methoxy group, luteolin and apigenin, and the class representative without substituents, flavone. The main goals were: a) to evaluate the effects of eupafolin on ATPase activity and energy-dependent mitochondrial swelling; b) to determine the effects of hispidulin and eupafolin on membrane fluidity and mitochondrial permeability transition (MPT); c) to compare the cytotoxicity of five flavones (hispidulin, eupafoline, apigenin, luteolin and flavone) on murine melanoma cells (B16-F10) and melanocytes (Melan-A), relating the effects to their chemical structures; and d) to determine the possible mechanism of cell death in B16-F10 promoted by these flavones. We verified that eupafolin did not change ATPase activity on intact mitochondria with or without FCCF and it inhibited energy-dependent mitochondrial swelling (75 - 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Hispidulin and eupafolin affected dimyristoylphosphatidylcholine and mitochondrial membranes fluidity, in particular at their hydrophobic regions, when evaluated by polarization of fluorescence. Eupafolin reduced by ~35% MPT (200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), while hispidulin did not alter this parameter. Apigenin, flavone, luteolin and eupafolin reduced B16-F10 viability on 40 - 80% at 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Viable cells were reduced by hispidulin (20%), eupafolin (55%), apigenin (45%) and luteolin (70%) with 48 h of treatment and by eupafolin (30%), apigenin (30%) and luteolin (65%) with 72 h, indicating that 3',4'-di-hydroxyl substituents raise the cytotoxic effect. Evidences of cell death by apoptosis were obtained by morphology alterations evaluated by scanning and transmission electronic microscopy and cytochrome *c* release in cells treated with eupafolin, apigenin and luteolin. Effect of flavones (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 24h) on antioxidant enzymes activity showed that hispidulin and apigenin increased superoxide dismutase activity by 40%, while catalase activity was reduced with hispidulin (25%), eupafolin (45%), apigenin (40%) and luteolin (35%). Furthermore, apigenin and luteolin inhibited glutathione reductase activity by 20% and 30%, respectively. Effect of flavones on Melan-A cell viability was also checked. Only eupafolin and luteolin reduced cell viability, yet eupafolin showed the most important selective effect, with higher toxicity on tumor than normal cells. We can conclude that the biological effects studied are dependent on flavone's structure and that effects on mitochondrial metabolism may explain, in part, the cytotoxicity. Our results also indicate the possible use of these compounds on cancer therapy studies in the future.

Keywords: flavones, membranes, B16-F10, apoptosis, antioxidant enzymes, Melan-A

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas sejam diagnosticadas com câncer no mundo inteiro e aproximadamente 6 milhões morram dessa doença por ano (PARKIN, 2001). Entre os tipos de câncer, os mais comuns são os de pele (KYRIAZI *et al.*, 2006), destes, 4% são do tipo melanoma, um tipo de alta letalidade (INCA, 2005) para o qual o tratamento utilizando quimioterápicos não possui grande eficácia (WACK *et al.*, 2001). Em 2008, estavam previstos, para o Brasil, 2950 casos novos em homens e 2970 em mulheres, sendo a maioria na região Sudeste (INCA, 2008).

Nos últimos anos têm-se intensificado as pesquisas de novos compostos que possam atuar no tratamento de diversos tipos de câncer. Entre os possíveis agentes com atividade antitumoral estão alguns flavonóides, compostos fenólicos amplamente distribuídos na natureza e presentes na maioria dos alimentos da dieta humana (HEIM *et al.*, 2002). Os flavonóides possuem diversas atividades biológicas já documentadas, sendo sua propriedade antioxidante extensivamente estudada (ARORA *et al.*, 1998; COTELLE *et al.*, 1992; FERRALI *et al.*, 1997; ZHOU & ZENG, 1991), entretanto, estudos têm mostrado que alguns desses compostos também apresentam efeitos pró-oxidantes (LEUNG *et al.*, 2006), inclusive com ação indutora de apoptose em diversos tipos de tumores (LEE *et al.*, 2005a; MICHELS *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2005; HSU *et al.*, 2004).

Além disso, Hodnick *et al.* (1987) sugeriram que alguns flavonóides podem exercer seus efeitos biológicos, como a citotoxicidade, pela alteração do metabolismo mitocondrial. Sabe-se também que os efeitos biológicos

dependem das estruturas químicas dos flavonóides (JIN *et al.*, 2007; COMALADA *et al.*, 2006; LOTITO & FREI, 2006; ABE *et al.*, 2002).

Os flavonóides são classificados de acordo com sua estrutura química e a classe das flavonas foi estudada nesse trabalho. A eupafolina e hispidulina são duas flavonas encontradas em diversas plantas, entre elas, algumas de uso medicinal no Brasil como a carqueja (*Baccharis trimera less*) (SOICKE *et al.*, 1987), a artemísia (*Artemisia vulgaris L*) (LEE *et al.*, 1998) e a arnica (*Arnica Montana L*) (SANTOS *et al.*, 1998). Já foram descritas inúmeras atividades biológicas da eupafolina, entre elas: atividade antioxidante em neurônios (KIM *et al.* 2002), atividade antiinflamatória (SALA *et al.* 2000) e uma potente ação inibitória sobre a atividade da enzima xantina oxidase e sobre a lipoperoxidação *in vitro* (SANZ *et al.* 1994). A hispidulina promove inibição da agregação plaquetária (BOURDILLAT *et al.* 1988), proteção contra hepatotoxicidade promovida por bromobenzeno (FERRÁNDIZ *et al.* 1984) e citotoxicidade em células de carcinoma de nasofaringe (KUPCHAN *et al.* 1969). Os efeitos dessas flavonas sobre o metabolismo mitocondrial já foram estudados previamente no Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular da UFPR. Verificou-se que elas promovem inibições de enzimas da cadeia respiratória e redução na velocidade de consumo de oxigênio (DABAGUI-BARBOSA *et al.*, 2005; HERRERIAS *et al.*, 2008). Contudo, seus efeitos sobre propriedades de membrana e sobre células de melanoma murino ainda não foram descritos.

Tendo em vista a ausência de drogas eficazes para o tratamento do melanoma e os importantes efeitos biológicos já descritos para as flavonas em estudo, os objetivos deste trabalho visaram contribuir para o melhor

entendimento dos mecanismos de ação destes compostos sobre parâmetros relacionados com o metabolismo energético mitocondrial e avaliar seus efeitos sobre as células de melanoma murino B16-F10. Luteolina, apigenina e flavona foram também utilizadas nesse estudo, devido a suas semelhanças estruturais com as flavonas eupafolina e hispidulina, com a finalidade de estabelecer a importância dos substituintes nos efeitos promovidos em células de melanoma murino. Além disso, as mesmas foram usadas para uma avaliação comparativa dos efeitos citotóxicos sobre células tumorais (B16-F10) e melanócitos normais (Melan-A).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MELANOMA

Os melanócitos humanos normais aderem na membrana basal da epiderme e, apesar de se manterem normalmente em repouso, mantêm um potencial de proliferação de longo prazo. Estas células se diferenciam a partir de células pluripotentes da crista neural (HERLYN e SATYAMOORTHY, 2001).

Os melanócitos são responsáveis pela síntese do pigmento melanina na pele. A melanogênese é realizada por enzimas melanogênicas como a tirosinase, que catalisa a hidroxilação da tirosina a 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) e a oxidação do DOPA a DOPAquinona (NAGATA *et al.*, 2004). Após a síntese, a melanina é distribuída nos queratinócitos presentes nas camadas superiores da epiderme através dos dendritos dos melanócitos e promove proteção contra os efeitos danosos da radiação ultravioleta (HERLYN e SATYAMOORTHY, 2001).

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer que tem origem nos melanócitos e tem predominância em adultos brancos (INCA, 2008). O desenvolvimento do melanoma é um processo de muitas etapas, no qual melanócitos maduros da epiderme progressivamente sofrem mutações em oncogenes ou genes supressores de tumor, as quais geram uma proliferação acelerada sem os mecanismos de controle de crescimento de uma célula normal (ZABIEROWSKI & HERLYN, 2008).

Melanomas do tipo *in situ* e microinvasivo consistem de agrupamentos únicos e de tamanho variável de melanócitos atípicos que demonstram um padrão de crescimento radial. O mais agressivo e potencialmente letal melanoma invasivo é caracterizado por um crescimento vertical penetrando a

camada superior da epiderme e a camada subjacente da derme, uma condição com alto potencial metastático (JHAPPAN *et al.*, 2003).

A profundidade da invasão do tumor é o parâmetro de prognóstico histológico mais importante a ser avaliado no tumor primário (MARKOVIC *et al.*, 2007) e o sistema de classificação utilizado atualmente foi publicado na sexta edição do American Joint Committee on Cancer (AJCC) - Cancer Staging Manual em 2002.

O estadio I do câncer é diagnosticado em pacientes que tem lesões primárias de cerca de 1 mm ou menos de profundidade e não possuem evidência de metástase. No estadio II o melanoma é diagnosticado em pacientes com lesões primárias profundas sem evidência de metástase e no estadio III há espalhamento para os linfonodos. Já no estadio IV o melanoma encontra-se em sítios distantes, incluindo pele, tecido subcutâneo, linfonodos e órgãos.

A incidência de melanoma na população branca dos Estados Unidos da América aumentou drasticamente de 1/100.000 em 1935 para 15/100.000 em 2000 (LOTZE *et al.*, 2001).

A exposição ao sol é geralmente aceita como o maior fator causador dos melanomas, contudo, o mecanismo de geração de melanomas pela exposição à luz ultravioleta é desconhecido e complexo. Nas pessoas de pele clara, o grupo mais predominantemente afetado, os tumores apresentam-se mais comumente em áreas que são menos expostas ao sol, como pernas, braços e tronco do que em áreas que são constantemente expostas ao sol, como o rosto (CURTIN *et al.*, 2005).

Alterações genéticas foram correlacionadas ao aparecimento das lesões de melanoma. Mutações no gene *braf* são encontradas em 66% dos melanomas malignos (DAVIES *et al.*, 2002). Além disso, 24% das culturas de melanomas malignos analisados por Albino *et al.* (1989) tinham mutações no gene *ras* e não foram encontradas alterações nesse gene em nevos normais e displásicos.

Curtin *et al.* (2005) demonstraram uma importante correlação entre o tipo de mutação e o local de aparecimento das lesões melanocíticas. Esses autores relataram que 81% dos melanomas encontrados em locais da pele sem exposição crônica ao sol possuem mutações nos genes *braf* ou *n-ras*. Já em melanomas com esses genes não mutados, ocorrem alterações freqüentes nos genes para ciclinas dependentes de quinase-4 (CDK-4) e ciclina D1.

Outro oncogene envolvido com o desenvolvimento do melanoma é o oncogene Akt, uma serina/treonina quinase que estimula a proliferação celular e inibe a apoptose. O aumento da expressão de Akt ocorre com o processo de metastização do melanoma e é inversamente correlacionado com a sobrevivência dos pacientes, podendo ser utilizado como um marcador de prognóstico (DAI *et al.*, 2005).

2.2. TRATAMENTO DO MELANOMA

A intervenção cirúrgica é o tratamento mais definitivo para o melanoma primário, pois os pacientes com tumores primários menores do que 1 mm de profundidade tem um baixo risco de metástase (MARKOVIC *et al.*, 2007). Quando diagnosticado nas fases iniciais, sem metástase, 85% dos pacientes portadores do melanoma apresentam um bom prognóstico após excisão cirúrgica. Entretanto, no estadio disseminado, esse índice é de cerca de 50%

para os pacientes com melanoma no estadio III e de 10-20% para aqueles com melanoma no estadio IV (BUSSEL & ZITELLI, 1996).

Os agentes quimioterapêuticos mais utilizados na doença metastática são a dacarbazina, análogos da platina, nitrosuréias e toxinas microtubulares (LOTZE *et al.*, 2001).

A dacarbazina (5-3,3-dimetiltriazeno-imidazol-4-carboxamida - DTIC) foi a primeira droga aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento do melanoma no estadio IV (MARKOVIC *et al.*, 2007). Essa droga é um agente alquilante do DNA. No fígado, a dacarbazina é metabolizada pelo sistema P-450 ao seu metabólito ativo 5-(3-metil 1- triazeno) imidazol-4-carboxamida, o qual espontaneamente se decompõe ao metabólito ativo 5-aminoinidazol-4-carboxamida através de uma reação de N-desmetilação. A dacarbazina, que é o quimioterápico referência para o tratamento do melanoma disseminado, apresenta um índice de resposta positiva à medicação de 20-26%, e menos de 2% dos pacientes sobrevivem até seis anos (CARTER & FRIDMAN, 1972).

Novas estratégias de tratamento têm sido buscadas. Uma das novas drogas utilizadas é a lenalidomida (RevlimidTM), pertencente a classe dos análogos da talidomida, que possuem ação imunomodulatória e antiangiogênica (BARTLETT *et al.*, 2004). Também estão sendo testadas drogas inibidoras da expressão de Bcl-2, um proteína antiapoptótica, como o oblimersen juntamente com a dacarbazina (JANSEN *et al.*, 2000) e drogas inibidoras da cascata RAF-quinases, como o sorafenib juntamente com outros quimioterápicos (MOLHOEK *et al.*, 2005), obtendo um índice de sucesso superior a utilização desses compostos isoladamente (AHMAD *et al.*, 2004).

Inibidores do proteassoma, como o bortezomib, também foram testados contra o melanoma, entretanto, não se demonstraram ativos em pacientes com melanoma metastático em um teste de fase III (MARKOVIC *et al.*, 2005).

Desta forma, o desenvolvimento de novas drogas com atividade antimelanoma é importante, pois a quimioterapia com um único agente tem sido ineficaz na grande maioria dos casos, em função da alta capacidade adaptativa das células tumorais quanto à sobrevivência e proliferação (KASPER *et al.*, 2007).

Os produtos naturais representam uma excelente fonte de substâncias que possuem uma grande variedade de atividades biológicas (CRAGG *et al.*, 2000). Muitas vezes consistem em metabólitos secundários produzidos pelas plantas como parte de um mecanismo de defesa contra microorganismos, insetos e outros animais, além de mecanismos de adaptação e regulação às condições ambientais (MONTANARI & BOLZANI, 2001). Entre as classes de metabólitos secundários de plantas que possuem atividades biológicas antitumorais, encontramos os flavonóides, os quais foram o objeto de estudo nesse trabalho.

2.3. FLAVONÓIDES

Flavonóides são metabólitos secundários de plantas vasculares como angiospermas e gimnospermas. São compostos fenólicos de baixo peso molecular derivados de benzo- γ -pironas (HEIM *et al.*, 2002). São os fitoquímicos mais abundantes na dieta humana e são responsáveis juntamente com outros compostos pela cor e odor de frutas e vegetais. Mais de 4000 diferentes flavonóides já foram identificados em frutas, vegetais e alimentos de origem vegetal. Na Tabela 1 encontram-se alguns exemplos de flavonóides e

de suas fontes na dieta. Estima-se que populações de países europeus consumam cerca de 1 g diário de flavonóides (RUSAK *et al.*, 2005).

Esses compostos estão presentes em muitas plantas medicinais utilizadas pela população para o tratamento de diversas patologias e o consumo de alguns flavonóides tem sido relacionado à redução do risco de câncer (KALE *et al.*, 2008).

Os flavonóides são classificados de acordo com a sua estrutura e diversos estudos demonstraram uma importante correlação entre suas estruturas e suas atividades biológicas (QUINTIN *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2007; RUSAK *et al.*, 2005; BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 2005; ABE *et al.*, 2002).

Flavonóide	Fonte	Quantidade (mg/Kg)
Quercetina 3 - 4' glucosídeo	cebola	284-486
Rutina	chá preto	10-25
Quercetina 3 - galactosídeo	maçã	21-72
Luteolina - 7 - apiosilglucosídeo	pimenta vermelha	7-14
Hesperidina	suco de laranja	116-201
Narirutina	suco de laranja	15-42
Naringina	suco de grapefruit	68-302
(+) Catequina	maçã	4-16
(-) Epicatequina	maçã	67-103
(+) Catequina	vinho tinto	16-53
(-) Epicatequina	vinho tinto	9-42
Genisteína - 7 - glicosídeo	soja	480

TABELA 1: ALGUNS FLAVONÓIDES E SUAS FONTES NA DIETA

Fonte: Erlund, (2004).

2.3.1 Classes

Flavonóides consistem de dois anéis benzênicos (A e B), os quais estão conectados por um anel pireno (C) contendo oxigênio (ERLUND, 2004). A numeração dos anéis A e C é feita com números ordinários, enquanto que o anel B é numerado utilizando-se apóstrofo (BRAVO,1998). Na Figura 1 pode-se observar como exemplo a numeração de uma flavona, classe a qual pertencem os compostos que serão utilizados neste estudo.

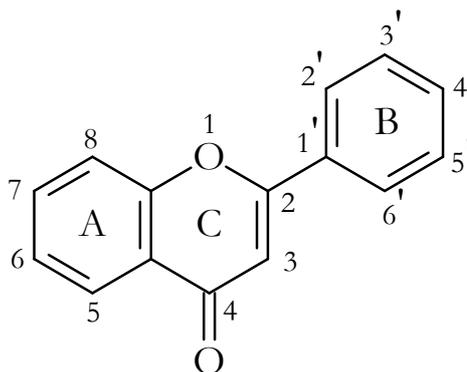


FIGURA 1: NUMERAÇÃO DE UM FLAVONÓIDE COM ANEL C (FLAVONA)

FONTE: Bravo (1998)

São conhecidas dez classes de flavonóides que possuem o mesmo núcleo básico (MARKHAM, 1982; MARCANO & MASAHISA, 1991) e, entre elas, encontram-se as flavonas e os flavonóis. Na Figura 2 estão representadas as estruturas básicas de algumas classes de flavonóides. Flavonóides contendo um grupamento hidroxil em C-3 no anel C são classificados como 3-hidroxiflavonóides (flavonóis, antocianidinas, leucoantocianidinas e catequinas) e aqueles sem este grupamento em 3-desoxiflavonóides (flavanonas e flavonas). Nos isoflavonóides o anel B é ligado ao anel C pela posição C-3 (ERLUND, 2004).

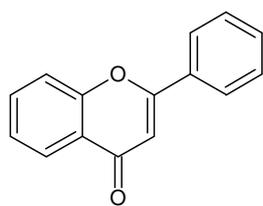
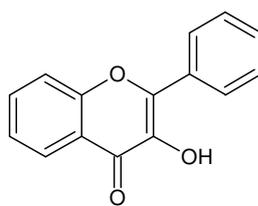
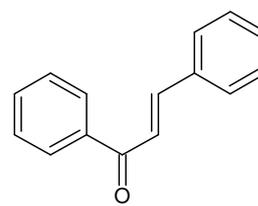
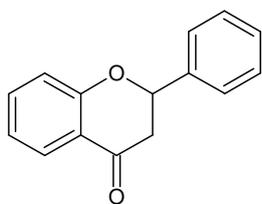
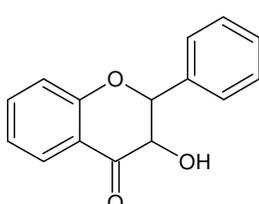
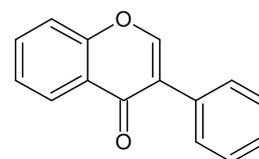
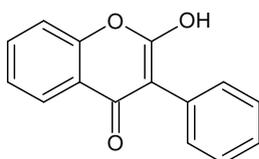
**Flavonas****Flavonóis****Chalconas****Flavanonas****Flavanonóis****Isoflavonas****Isoflavonóis**

FIGURA 2: ESTRUTURA GERAL DE ALGUMAS CLASSES DE FLAVONÓIDES

Fonte: O autor (2009)

2.3.2 Absorção, metabolização e excreção

Nas plantas, a forma aglicona, sem resíduos de açúcar, é pouco freqüente, os flavonóides estão geralmente na forma glicosilada. Pelo menos oito monossacarídeos ou combinações desses (di e trissacarídeos) podem se ligar a diferentes grupamentos hidroxila das agliconas, resultando em uma grande quantidade de flavonóides diferentes (ERLUND, 2004).

Em geral, a absorção dos flavonóides glicosilados é baixa, necessitando-se hidrólise prévia para a sua forma aglicona para poderem ser absorvidos (DAY et al., 1998, GEE et al., 1998). Quando ingerimos flavonóides glicosilados, a β -ligação desses açúcares resiste à hidrólise pelas enzimas pancreáticas, sendo a microbiota intestinal responsável pela quebra das ligações glicosídicas (HEIM et al., 2002).

A biodisponibilidade dos flavonóides é extremamente baixa, variando em torno de 3 a 5%, apesar da grande quantidade de flavonóides consumidos na dieta humana, (COLDHAM et al., 2002).

Liu e Hu (2002) demonstraram que genisteína e apigenina, uma isoflavona e flavona respectivamente, eram muito bem absorvidas no intestino e que sua absorção não era a causa da sua baixa disponibilidade e sim o intenso metabolismo sofrido por esses flavonóides.

Por outro lado, Zhu et al. (2000) relataram que apesar da baixa disponibilidade obtida após a administração oral e intravenosa de catequinas, esses flavonóides permanecem na circulação por um longo período.

Além disso, flavonas metiladas têm uma biodisponibilidade oral superior, bem como um maior acúmulo tecidual do que as suas correspondentes estruturais não-metiladas (WALLE et al., 2007).

A distribuição destes compostos no organismo é complexa, sendo extensivamente metabolizados no intestino e fígado e os metabólitos formados são excretados pela urina e fezes (ABRAHAMSE *et al.*, 2005).

2.3.3 Propriedades e atividade antitumoral

Grande parte dos efeitos biológicos protetores dos flavonóides pode ser atribuída as suas habilidades seqüestradoras de radicais livres e sua capacidade de transferir elétrons para radicais livres através da formação de radicais fenoxil de baixa reatividade (ARORA *et al.*, 1998; COTELLE *et al.*, 1992; FERRALI *et al.*, 1997; ZHOU & ZENG, 1991). Outra propriedade importante de alguns flavonóides é a de quelar metais de transição como o ferro, suprimindo a geração de radicais hidroxila através da reação de Fenton (ARORA *et al.*, 1998). Flavonóides também podem inibir a lipoperoxidação através da restrição do acesso de oxidantes às membranas (VERSTRAETEN *et al.*, 2003).

Compostos da classe das flavonas também possuem importantes atividades antioxidantes. Em uma série de flavonas testadas quanto a sua atividade antioxidante, observou-se que compostos que não possuíam substituintes no anel B, como a crisina (5, 7, dihidroxiflavona), e aqueles com a presença de determinados grupamentos, como o grupamento hidroxila no anel A, poderiam ser capazes de aumentar a eficiência antioxidante (ARORA *et al.*, 1998). Flavonas orto-dihidroxiladas inibem a peroxidação lipídica e são seqüestradoras de radicais superóxido gerados pelo sistema xantina-oxidase em neutrófilos humanos (MONTESINOS *et al.*, 1995). Entretanto, alguns flavonóides podem atuar como pró-oxidantes e interferir nos sistemas

antioxidantes, induzindo indiretamente o estresse oxidativo na célula (CRESPO *et al.*, 2008; LEUNG *et al.*, 2006). Além disso, radicais hidroxil gerados pela autooxidação e pelo ciclo-redox dos flavonóides podem iniciar a peroxidação de lipídeos de membrana celular (MICHELS *et al.*, 2005).

Devido às suas propriedades anti e pró-oxidantes, os flavonóides exercem um amplo espectro de atividades biológicas, as quais afetam funções celulares básicas, entre elas, o crescimento e diferenciação celulares, além da apoptose (RUSAK *et al.*, 2005; SON *et al.*, 2005; MICHELS *et al.*, 2005). Esses compostos também têm sido reconhecidos como agentes quimiopreventivos, com inibição da progressão de tumores (HSU *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2005).

Os efeitos protetores dos flavonóides contra o câncer podem ser atribuídos a uma grande variedade de mecanismos, entre eles, aqueles envolvendo a modificação de enzimas que ativam ou detoxificam carcinógenos e aqueles relacionados à alteração de vias de sinalização celular (MOON *et al.*, 2006; LAMY *et al.*, 2008; MARTIN *et al.*, 2009).

A modulação por flavonóides de enzimas metabolizadoras de drogas como o sistema P-450 é importante porque tanto estas enzimas podem inativar carcinógenos, contribuindo para a prevenção do câncer, como aumentar ou diminuir o metabolismo de drogas quimioterapêuticas usadas no tratamento do câncer (MOON *et al.*, 2005). Si *et al.* (2009) demonstraram que diversos flavonóis e flavonas testados promovem inibição do tipo competitiva, atuando como substratos para a isoforma CYP2C9 do sistema P-450.

Alguns exemplos da atividade anti-tumoral de flavonóides estão citadas na literatura. A buteína (3, 4, 2', 4' - tetrahidroxichalcona), um flavonóide pertencente a classe das chalconas, promove inibição do crescimento de

células MCF-7, uma linhagem de câncer de mama que possui receptor de estrógeno (ER positiva), provavelmente através de uma inibição da enzima aromatase (WANG *et al.*, 2005). A 2', 4'-dihidroxi-6'-metoxi-3', 5'-dimetilchalcona (DMC) induz apoptose em diversas linhagens tumorais humanas, sendo mais citotóxica contra a linhagem de células SMMC-7721 de tumor hepático humano (YE *et al.*, 2004).

A fração metanol-clorofórmio da planta *Rhus verniciflua* contendo os flavonóides fustina (5, 4', 5'-flavanonol), buteína, fisetina (5, 4', 5'-flavonol), quercetina, além do ácido protocatecólico e sulfuretina promove inibição do crescimento e induz apoptose em células hepáticas embrionárias de rato (BNL SV A.8) (SON *et al.*, 2005).

Linhagens de leucemia humana tiveram indução de apoptose induzida por flavonóides naturais como a genisteína, quercetina, fisetina, luteolina, apigenina e rutina de maneira dose-dependente acompanhada de queda do potencial de membrana mitocondrial e ativação da caspase-3 (MATSUI *et al.*, 2005).

A quercetina, um flavonol, promove inibição do crescimento de células hepáticas tumorais (BNL SV A.8) (SON *et al.*, 2004) e induz a via mitocondrial da apoptose em células de melanoma murino B16-BL6 (ZHANG *et al.*, 2005). Além disso, a quercetina juntamente com a (-) galato epigallocatequina inibe a expressão de duas chaperonas a Hsp70 e GRP78, promovendo um efeito citotóxico sinérgico em células de câncer de mama humano (LI *et al.*, 2009). A (-) galato epicatequina e a genisteína também apresentaram efeito sinérgico inibidor do crescimento de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano juntamente com retinóides (DAS *et al.*, 2009). Outro flavonol que apresentou

atividade citotóxica foi a isorhamnetina, um flavonol metoxilado (5, 7, 4' trihidroxi 3' metoxiflavonol), que inibiu a proliferação de células de carcinoma escamoso de esôfago humano (Eca-109) em concentrações de até 80 µg/ml (MA *et al.*, 2007).

2.3.4 Flavonas

A classe das flavonas, a qual pertencem, os compostos estudados nesse trabalho, apresenta uma grande quantidade de compostos promotores de atividade citotóxica contra células cancerosas.

Flavonas como a tangeretina (4', 5, 6, 7, 8 - pentametoxiflavona) e nobiletina (3', 4' 5, 6, 7, 8 - hexametoxiflavona) apresentaram atividade antiproliferativa nas doses de 54 e 100 µmol.L⁻¹ em linhagens celulares de câncer de mama (MDA-MB-435 e MCF-7) e de cólon (HT-29) (MORLEY *et al.*, 2006).

A acacetina (5,7 - dihidroxi - 4' - metoxiflavona) inibe a proliferação de células A549 de pulmão humano, induz apoptose através de um mecanismo de aumento do ligante de Fas e da expressão de p53 e bloqueia o ciclo celular na fase G1 do ciclo celular (HSU *et al.*, 2004).

A flavona crisina (5,7- dihidroxiflavona) exerce um efeito inibitório do crescimento em células de glioma de rato mediante inibição do proteassoma (WENG, *et al.*, 2005) e o envolvimento do proteassoma no mecanismo antitumoral de flavonóides também foi demonstrado por Chen *et al.* (2005). Esses autores sugeriram que a inibição do proteassoma poderia ser um dos mecanismos pelos quais os flavonóides atuariam prevenindo o câncer. Pois, células tumorais seriam dependentes da função proteassomal e inibidores do

proteassoma levariam a parada do crescimento na fase G1 e/ou indução de apoptose (AN *et al.*, 1998; Li & DOU , 2000).

As flavonas luteolina e apigenina foram utilizadas nesse estudo devido a suas semelhanças estruturais com eupafolina e hispidulina para avaliar a importância dos substituintes metoxil e hidroxila para o efeito citotóxico nas células de melanoma murino B16-F10. Além disso, utilizou-se a flavona, representante da classe, sem substituintes na estrutura básica. As estruturas das cinco flavonas utilizadas nesse estudo: flavona, hispidulina, eupafolina, apigenina e luteolina estão demonstradas na Figura 3. A seguir são descritos alguns dos efeitos biológicos já conhecidos dessas flavonas.

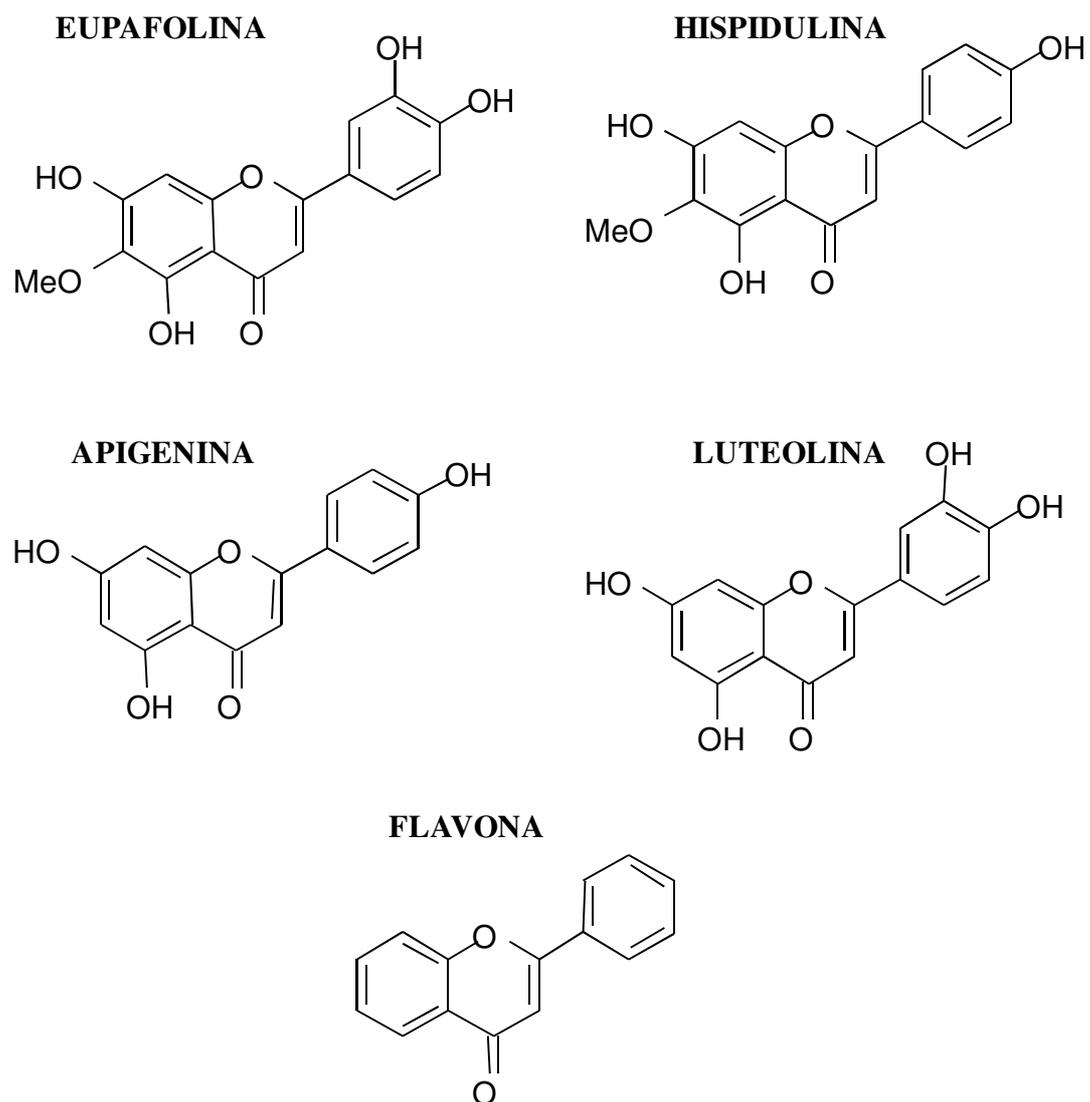


FIGURA 3: FÓRMULAS ESTRUTURAIS DAS FLAVONAS UTILIZADAS NESSE TRABALHO

FONTE: O autor (2009)

2.3.4.1 Luteolina

Luteolina (3', 4', 5, 7 – tetrahidroxiflavona), uma flavona muito comum na dieta humana, possui efeitos protetores contra o câncer e / ou antitumorais já descritos na literatura.

A luteolina induz a via mitocondrial da apoptose, aumentando cerca de seis vezes a atividade de enzimas apoptóticas como a caspase-9, e promove a fragmentação da fita de DNA em células H4IIE de hepatoma de rato (MICHELS *et al.*, 2005). A luteolina também induz a apoptose em células de hepatoma humano HepG2 (LEE *et al.*, 2005a) e em células CH27 de carcinoma de pulmão (LEUNG *et al.*, 2006). Zhou *et al.* (2009) demonstraram que a luteolina inibe a invasão de células de câncer prostático - PC3 através da indução da expressão da molécula de adesão E-caderina.

Além disso, essa flavona promove redução na expressão do fator IGF-1 (fator-1 de crescimento relacionado com a insulina) em células de tumor de endométrio humano, e conseqüente diminuição da proliferação e indução de apoptose, já que a expressão deste fator está relacionada com o crescimento seletivo do tumor (KIM *et al.*, 2005).

O efeito protetor da luteolina também foi avaliado. A luteolina protege células de cultura de retina do estresse oxidativo promovido por Fe/ascorbato (AREIAS *et al.*, 2001) e demonstra efeito protetor da carcinogênese de colón induzida por azoximetano (ASHOKKUMAR & SUDHANDIRAN, 2008). Além disso, protege as células OLN-93 contra o dano oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio, reduz a expressão da NO sintase induzida (iNOS) e a produção de NO em macrófagos NR8383 (MEETEREN *et al.*, 2004).

A luteolina também inibe a fagocitose de mielina por macrófagos *in vitro* sugerindo que esse composto pode ser utilizado no futuro no tratamento do processo desmilenizante da esclerose múltipla (HENDRIKS *et al.*, 2003).

2.3.4.2. Apigenina

A apigenina também é uma flavona muito estudada quanto aos seus efeitos indutores de apoptose em células tumorais.

A apigenina (4', 5, 7 - trihidroxiflavona) promove apoptose através da liberação de citocromo *c* e rápida indução da atividade da caspase-3 em linhagens Mb-453, BT-474, SKBr-3 de câncer de mama humano que superexpressam a proteína HER2/neu. Além disso, estimula a clivagem proteolítica do DFF-45, um fator que desencadeia a fragmentação do DNA (WAY *et al.*, 2005). Essa flavona bloqueia o ciclo celular e induz apoptose em células de carcinoma cervical humano através de uma via dependente de p53 (ZHENG *et al.*, 2005). A ativação de p53 também ocorre na apoptose induzida por apigenina em células de câncer prostático (SHUKLA & GUPTA, 2008)

Além disso, a 4', 5, 7 - trihidroxiflavona induz apoptose em células HL-60 leucêmicas liberando citocromo *c* e ativando caspases 9 e 3 (WANG *et al.*, 1999).

A apigenina demonstrou um efeito protetor sobre o dano cromossomal induzido por radiação em linfócitos humanos (RITHIDECH *et al.*, 2005). Também demonstrou seu efeito protetor em células de medula quando o dano genotóxico foi induzido por mitomicina C utilizando-se trocas de cromátide e aberrações cromossomais como parâmetros de dano (SIDDIQUE & AFZAL , 2009).

2.3.4.3. Flavona

A flavona (2-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona), estrutura básica sem substituintes, já foi previamente estudada no Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular da UFPR e apresentou efeitos sobre o metabolismo mitocondrial. Verificou-se que a flavona diminui a velocidade respiratória no estado 3 e estimula a velocidade respiratória do estado 4 com ambos os substratos. Reduz a relação ADP/O e o coeficiente de controle respiratório (CCR). Inibe a atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial entre o complexo I e III e reduz a amplitude e velocidade do inchamento mitocondrial induzido por valinomicina e o potencial elétrico transmembrana (VALDAMERI, 2008).

Além disso, a flavona promove inibição da contração muscular através de inibição da atividade da miosina fوسفatase (JEON *et al.*, 2007) e também induz apoptose de células de câncer cólon-retal (WENZEN *et al.*, 2000).

A flavona alterou a atividade de enzimas do sistema P450 no metabolismo do benzopireno (HUANG *et al.*, 1981).

2.3.4.4 Eupafolina e Hispidulina

Os efeitos da eupafolina e hispidulina sobre parâmetros relacionados com o transporte de elétrons na cadeia respiratória foram avaliados em trabalhos anteriores do Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular da UFPR (DABAGUI-BARBOSA *et al.*, 2005; HERRERIAS *et al.*, 2008). A hispidulina (5, 7, 4'- trihidroxi - 6 - metoxiflavona) difere da eupafolina (5, 7, 3', 4'- tetrahidroxi - 6 - metoxiflavona) pela presença de uma hidroxila em 3' formando um anel catecol (anel B).

As duas flavonas inibem o consumo de oxigênio e alteram atividades de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial (DABAGUI-BARBOSA *et al.*, 2005; HERRERIAS *et al.*, 2008). Os efeitos da hispidulina sobre a cadeia respiratória são decorrentes de inibições dos complexos enzimáticos (DABAGUI-BARBOSA *et al.*, 2005), já os efeitos da eupafolina são gerados não somente por inibições enzimáticas, mas também por alterações na membrana mitocondrial. A eupafolina demonstrou, ainda, capacidade de reagir com o radical livre DPPH, de promover a liberação de ferro da ferritina (DABAGUI-BARBOSA *et al.*, 2005) e de sofrer autooxidação, gerando ERO - espécies reativas de oxigênio (HERRERIAS *et al.*, 2008).

Para a eupafolina já foram descritas habilidades inibitórias do crescimento de células de carcinoma uterino e adenocarcinoma gástrico humano (ABE *et al.*, 2002), ação protetora contra o estresse oxidativo (KIM *et al.*, 2002) e atividade antiinflamatória (SALA, 2000). Diversos efeitos biológicos também foram descritos para hispidulina como inibição da agregação plaquetária (BOURDILLAT *et al.* 1988) e proteção contra hepatotoxicidade induzida por bromobenzeno em ratos (FERRÁNDIZ *et al.* 1984). Além disso, as duas flavonas foram citotóxicas contra células de carcinoma de nasofaringe humano (KUPCHAN *et al.* 1969). Em experimentos prévios de viabilidade celular realizados no Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular da UFPR pôde-se constatar que as duas flavonas testadas foram citotóxicas para a linhagem de células HeLa e esta citotoxicidade poderia, pelo menos em parte, ser explicada pelas alterações nos parâmetros respiratórios observadas (DABAGUI-BARBOSA *et al.*, 2005; HERRERIAS, 2005).

2.4. RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE

As diferenças entre os efeitos dos flavonóides ocorrem pelas diferenças nas suas estruturas químicas. Desta forma, é importante correlacionar à estrutura química e determinado efeito biológico na tentativa de prever a atividade biológica de um grupo particular de compostos (RACKOVA *et al.*, 2005). Na literatura são encontrados vários trabalhos comparando o efeitos de flavonóides pertencentes a classes diferentes. Nestes trabalhos são encontradas algumas sugestões de correlações entre as suas estruturas e seus efeitos biológicos.

A presença de grupamentos hidroxil, *O*-metil, e de dupla ligação, no esqueleto básico dos flavonóides é fundamental para as atividades seqüestradoras de radicais livres, quelante de metais e antioxidante (HEIM, 2002; HUSAIN, 1987)

Rusak e cols. (2005) demonstraram a importância do número de grupamentos hidroxil no anel B para atividade seqüestradora de radicais DPPH. Também demonstraram que a presença da dupla ligação entre C2-C3 e do grupamento 3'-hidroxil e a ausência do 6-hidroxil são importantes para os efeitos antiproliferativos em células humanas leucêmicas. A presença dos grupamentos 3',4'-dihidroxil no anel B de alguns flavonóides pertencentes a diferentes classes (flavonas, flavonóis, flavanonas) parece aumentar a citotoxicidade contra células B16-F10 (ABE *et al.*, 2002).

A presença do grupamento 2'-hidroxil em derivados de chalconas é importante para a atividade inibitória da produção de NO em macrófagos (JIN *et al.*, 2007). A inibição da produção de marcadores pró-inflamatórios em macrófagos é maior com flavonóides contendo tetrahidroxilação em 5,7,3',4'

juntamente com a dupla ligação em C2-C3 e o anel B na posição 2 (COMALADA *et al.*, 2006).

A substituição em 5,7-dihidroxi no anel A, a dupla ligação em C2-C3 e o grupamento 4-ceto do anel C se mostraram necessários na estrutura para a inibição da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais aórticas humanas (LOTITO *et al.*, 2006).

Apesar de muitos flavonóides possuírem capacidade antioxidante dependente da sua estrutura, como citado anteriormente, alguns destes compostos são também conhecidos por seus efeitos citotóxicos causados por alterações na bioenergética mitocondrial, que levam a um aumento de ERO, geração de danos celulares e ao processo de apoptose. Neste contexto, a seguir serão descritas algumas informações sobre a relação existente entre o metabolismo mitocondrial, a geração de espécies reativas de oxigênio e o processo de indução da apoptose, visto que parâmetros relacionados a este processo foram avaliados neste trabalho.

2.5 MITOCÔNDRIA, ESTRESSE OXIDATIVO E APOPTOSE

A cadeia respiratória mitocondrial está continuamente gerando espécies reativas de oxigênio (ERO) (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999) e essas espécies promovem diversos danos a biomoléculas como proteínas, ácidos nucléicos e lipídios. Além da produção basal de ERO, compostos que promovem inibições de atividades de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, como alguns flavonóides (HERRERIAS *et al.*, 2008; DABAGUI-BARBOSA *et al.* 2005; HODNICK *et al.*, 1987), aumentam a produção de

radicais superóxido. Esse radical pode reagir com peróxido de hidrogênio em presença de ferro, e originar um radical livre extremamente reativo, o radical hidroxila.

Radicais hidroxila podem oxidar grupos tióis protéicos, promover a abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP) e a liberação de fatores pró-apoptóticos, como o citocromo *c* pela mitocôndria, desencadeando assim, o processo apoptótico (RASOLA & BERNARDI, 2007; SUSIN *et al.*, 1998). Outro fator importante para a perda da função mitocondrial é a lipoperoxidação de ácidos graxos insaturados presentes na membrana mitocondrial (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999; NICHOLLS & FERGUSON, 1992).

A classificação de morte celular mais utilizada distingue dois tipos principais: apoptose e necrose (KROEMER *et al.*, 2009). Autofagia, a qual propôs-se que seria um terceiro tipo de morte celular é um processo no qual a células gera energia e metabólitos através da digestão de organelas e macromoléculas (KLIONSKI, 2007). Diferenciações entre esses três tipos de morte celular são realizadas baseando-se em parâmetros bioquímicos, morfológicos e moleculares (GALLUZZI *et al.*, 2007).

A apoptose, ou “morte celular programada”, é uma das formas de morte celular que ocorre durante o desenvolvimento e a maturação celular. Foi inicialmente caracterizada baseando-se em critérios morfológicos, os quais incluem: encolhimento celular, condensação citoplasmática, segregação e condensação da cromatina, projeções da membrana plasmática e a formação de corpos apoptóticos (KROEMER *et al.*, 2005; WYLLIE, 1980). A morte celular por apoptose pode ser desencadeada através de duas vias. A primeira via é mediada por receptores de morte presentes na membrana plasmática como o

receptor TNF ou Fas (HOTCHKISS *et al.*, 2009). A ligação de proteínas específicas adaptadoras como FADD - proteína associada à Fas (WILSON *et al.*, 2009; CHINNAIYAN *et al.*, 1995) e RAIDD - proteína associada com o domínio de morte RIP (WILSON *et al.*, 2009; DUAN & DIXIT, 1997), dispara a cascata de caspases no interior da célula, mediante autoativação, e esse processo inicia-se pela caspase 8 (HOTCHKISS *et al.*, 2009; MUZIO *et al.*, 1998; MARTIN *et al.*, 1998).

Outra via de indução de apoptose é a chamada via mitocondrial, por esse mecanismo, ocorre liberação de citocromo *c* a partir da mitocôndria para o citoplasma (KLUCK *et al.*, 1997). O citocromo *c* liberado liga-se ao fator ativador de proteases apoptótico (Apaf-1), que, juntamente com a caspase 9, ativa a caspase 3 e dispara a apoptose (BRAS *et al.*, 2005; ZOU *et al.*, 1997).

Iniciadores dessa via incluem as espécies reativas de oxigênio, danos ao DNA, a resposta a proteínas “unfolded” e a privação de fatores de crescimento. Esses iniciadores levam a um aumento na transição de permeabilidade mitocondrial promovendo liberação de fatores próapoptóticos como o citocromo *c* a partir do espaço intermembranas mitocondrial para o citosol (LI *et al.*, 1997). Proteínas pró-apoptóticas denominadas SMAC/DIABLO, antagonizam inibidores citosólicos de proteínas pró-apoptóticas, disparando assim, a cascata de caspases (DU *et al.*, 2000).

A caspase 8 ativada (via de receptor de morte) e caspase 9 ativada (via mitocondrial) mobilizam as caspases 3, 6 e 7, proteases responsáveis pela degradação de diversas proteínas celulares e também ativam DNases (SHERIDAN & MARTIN, 2008; STRASSER, 2005).

Embora a relação entre o aumento de ERO e o processo de apoptose já seja conhecido, cabe destacar que as células podem se proteger do dano oxidativo alterando a expressão e/ou atividade das enzimas antioxidantes como um mecanismo de defesa e proteção. Shull e cols. (1991) demonstraram que células epiteliais traqueobrônquicas respondem a diversos agentes oxidantes aumentando a expressão da glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase – Mn (MnSOD) e catalase. Martin e cols. (2009) demonstraram que a apoptose induzida por *t*-butil-hidroperóxido em células HepG2 ocorria por um mecanismo dependente de ERO e que o extrato polifenólico do cacau protegia a morte dessas células através do estímulo da expressão de glutathione peroxidase e redutase .

Desta forma, torna-se importante avaliar o efeito dos flavonóides também sobre a atividade de enzimas antioxidantes.

3. OBJETIVOS

Na busca de novos agentes terapêuticos para o tratamento de diferentes tipos de câncer, em especial o melanoma, diversos compostos foram testados. Os flavonóides demonstraram efeitos importantes sobre patologias desencadeadas pela superprodução de radicais livres, como o câncer, e alguns autores sugerem que suas propriedades citotóxicas podem ser decorrentes de alterações na bioenergética mitocondrial. Estudos anteriores demonstraram a capacidade de duas flavonas, eupafolina e hispidulina, de alterar o metabolismo energético mitocondrial e reduzir a viabilidade de células HeLa (HERRERIAS *et al.*, 2008; DABAGUI-BARBOSA *et al.*, 2005), entretanto, não são conhecidos ainda os efeitos dessas flavonas sobre células de melanoma. Dessa forma, torna-se importante elucidar o mecanismo de ação, destas flavonas avaliando-se as suas propriedades pró e antioxidantes como causa de efeitos inibitórios do crescimento tumoral *in vitro*. Tal abordagem pode contribuir com informações importantes quanto à possibilidade da aplicação terapêutica de flavonóides no tratamento do melanoma.

Portanto, este trabalho tem como objetivos gerais: analisar os efeitos da hispidulina e eupafolina sobre a fluidez de membranas e metabolismo energético mitocondrial e realizar uma análise comparativa dos efeitos citotóxicos de cinco compostos pertencentes à classe das flavonas (hispidulina, eupafolina, apigenina, luteolina e flavona) sobre células de melanoma murino relacionando-os com suas estruturas químicas, além de determinar a citotoxicidade destas flavonas também sobre melanócitos murinos não

tumorais - Melan-A, buscando verificar uma possível seletividade desses compostos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em mitocôndrias intactas isoladas de fígado de rato avaliar:

- Os efeitos da eupafolina sobre a atividade do complexo F_1F_0 ATPase na ausência e presença de FCCP;
- A influência da eupafolina sobre o inchamento energizado em presença de acetato de sódio;
- Os efeitos da eupafolina e hispidulina sobre a transição de permeabilidade mitocondrial.

Em membranas naturais (mitocôndria) e artificiais (dimiristoilcolina) avaliar os efeitos da eupafolina e hispidulina sobre a fluidez;

Em células de melanoma murino B16-F10 cultivadas avaliar os efeitos de flavona, hispidulina, eupafolina, apigenina e luteolina sobre:

- A viabilidade e a proliferação celular;
- A morfologia das células através de técnicas de microscopia eletrônica de varredura e transmissão;
- A atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, catalase, glutathione redutase e glutathione peroxidase;
- A liberação de citocromo c;

Verificar os efeitos das cinco flavonas sobre a viabilidade de células de melanócitos normais murinos (Melan-A) e comparar estes efeitos com os obtidos em células de melanoma (B16-F10) com o intuito de verificar se as flavonas estudadas tem um efeito seletivo de indução de morte sobre as células tumorais.

4. EXTRATÉGIA EXPERIMENTAL

O estudo da ação de flavonóides foi conduzido em duas linhas, estudos em mitocôndrias e estudos em células, tumorais (B16-F10) e normais (Melan-A). Na Figura 4 encontra-se um fluxograma que demonstra a estratégia experimental que foi utilizada nesse trabalho. Realizaram-se experimentos para avaliar os efeitos da eupafolina sobre a atividade enzimática da ATPase e sobre o inchamento de mitocôndrias energizadas com glutamato para complementar estudos anteriores dos efeitos dessa flavona sobre o metabolismo energético mitocondrial. Também se avaliou a ação das flavonas hispidulina e eupafolina sobre a fluidez de membranas naturais e artificiais.. Além disso, verificou-se a influência desses compostos sobre a formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial devido a sua importância no processo de indução da apoptose.

Para verificar o efeito citotóxico das flavonas foram realizados experimentos de viabilidade e proliferação celular utilizando como modelo células de melanoma murino (B16-F10). Para determinar a influência dos grupamentos substituintes metoxil e hidroxil e do anel catecol na estrutura básica das flavonas sobre o efeito biológico. Escolheu-se a apigenina e a luteolina por serem as correspondentes estruturais, sem o grupamento 6-metoxil, da hispidulina e eupafolina, além da flavona, sem substituintes.

Para determinar o provável mecanismo de morte celular induzido por essas flavonas foram realizados estudos morfológicos de microscopia eletrônica de varredura e transmissão e análises de liberação de citocromo c . Também se avaliou a influência dos compostos testados sobre a atividade das enzimas antioxidantes que aliados aos efeitos mitocondriais poderiam

colaborar para a geração de estresse oxidativo e indução de morte celular. Uma das características importantes de um provável quimioterápico é possuir seletividade de ação citotóxica sobre células tumorais e afetar o mínimo possível células normais. Para avaliar um provável efeito seletivo dos compostos testados, foi realizado também o experimento de viabilidade celular em melanócitos normais (Melan A) de camundongo.

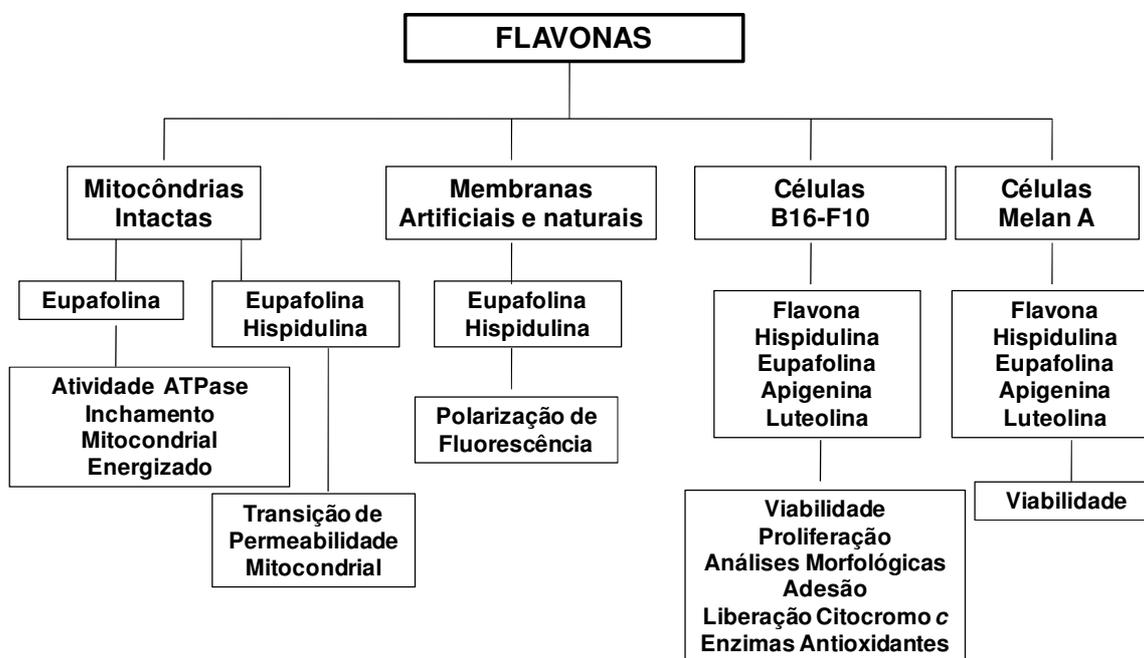


FIGURA 4: FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Fonte: O autor (2009)

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 REAGENTES

Flavona, luteolina, apigenina, DMSO, D-manitol, HEPES, EGTA, albumina de soro bovino, DPH, DPH-PA, ácido glutâmico, ADP, ATP, rotenona, citocromo *c*, FCCP e TRIS, foram adquiridos da Sigma Chemical Co. O meio RPMI 1640 foi adquirido da Cultilab, soro fetal bovino estéril da Invitrogen e tripsina da DIFCO.

Os demais reagentes utilizados foram do melhor grau analítico comercialmente disponível. As soluções dos reagentes foram preparadas com água ultrapurificada através de sistema purificador Gehard[®].

5.2 ISOLAMENTO DOS FLAVONÓIDES EUPAFOLINA E HISPIDULINA

A eupafolina e hispidulina foram extraídas das folhas secas do *Eupatorium littorale*, segundo Oliveira e cols. com algumas modificações (2001) no laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná com a colaboração do professor Brás Heleno de Oliveira. O extrato etanólico das folhas (5g) foi incorporado em 10 g de sílica e esta amostra incorporada foi adicionada à uma coluna de separação cromatográfica à vácuo. Diferentes proporções dos solventes hexano e acetato de etila foram preparadas e eluídas sequencialmente pela coluna (100:0, 80:20, 75:25, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90: 0:100). Alíquotas de cerca de 200 mL foram recolhidas e utilizadas para a realização de cromatografia de camada delgada para verificação da fração de eluição dos flavonóides. As frações de interesse foram reunidas e o solvente evaporado. As etapas de purificação foram feitas utilizando-se das técnicas de cristalização e cromatografia em

camada preparativa centrífuga – chromatotron). A pureza das amostras foi checada por HPLC em 339 nm.

5.3. PREPARO DAS SOLUÇÕES DE FLAVONÓIDES

Para o preparo das soluções usadas nos experimentos, todos os flavonóides foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). As concentrações utilizadas variaram de 1 - 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, dependendo do experimento. Cabe ressaltar que em todos os experimentos realizados foram feitos controles somente com o solvente DMSO.

5.4. ANIMAIS

Para o isolamento de mitocôndrias, foram utilizados ratos albinos, da linhagem Wistar, machos, pesando de 200-300 g, mantidos pelo biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram alimentados com ração Nuvilab e, antes dos experimentos, foram colocados em jejum por 12 h com água *ad libitum*. Os animais foram mortos por decapitação, e o fígado foi rapidamente retirado e colocado no meio de isolamento (descrito no item 5.5), sendo mantido em banho de gelo durante todo o processamento. Os experimentos com esses animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (certificado em anexo).

5.5. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO

Mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas como descrito por Voss *et al.* (1961), utilizando como meio de isolamento: manitol 210 mmol.L^{-1} , sacarose

70 mmol.L⁻¹, Tris-HCl 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,4) , EDTA 0,5 mmol.L⁻¹ e BSA (0,05%). Após a morte, o fígado foi removido, lavado com o meio de isolamento e conservado em banho de gelo. O material foi picado com tesoura em pequenos pedaços e lavado pelo menos três vezes com o mesmo meio. A homogeneização foi feita utilizando-se o homogeneizador van Potter-Elvehjem por três vezes com o pistilo frouxo e duas vezes com o pistilo normal. O homogenizado obtido foi centrifugado em centrífuga Hitachi Himac CR21E refrigerada a 4°C e 2.500 x g por 5 minutos. Nesta primeira etapa de centrifugação, desprezou-se o sedimento, que continha restos de células intactas, membranas e núcleos, e o sobrenadante, que continha as mitocôndrias, foi centrifugado novamente a 12.500 x g por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspenso com meio de isolamento e centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos, procedimento repetido duas vezes. A suspensão mitocondrial obtida teve a concentração protéica final dosada através do método de Lowry *et al.* (1951).

5.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ATPÁSICA EM MITOCÔNDRIAS INTACTAS

A atividade da F₁F₀ ATPase (ATP fosfohidrolase) em mitocôndrias intactas foi determinada na presença de FCCP e/ou flavonóide dosando-se o fosfato inorgânico (P_i) decorrente da hidrólise de ATP, segundo o método descrito por Pulmann *et al.* (1960). O ensaio foi realizado a 37°C, em sistema de reação constituído por: sacarose 50 mmol.L⁻¹, tampão Tris-HCl 12 mmol.L⁻¹ (pH 7,4), KCl 50 mmol.L⁻¹ e proteína mitocondrial na concentração de 2 mg.mL⁻¹. O volume final da reação foi de 1 mL e a temperatura foi mantida em 28°C. A

reação foi iniciada pela adição de ATP 3 mmol.L⁻¹ (T₀) e mantida sob constante agitação, sendo interrompida após 10 minutos pela adição de TCA a 10% (v/v). O material foi centrifugado a 10.000 x g por 1 minuto, sendo então o fosfato inorgânico do sobrenadante dosado pelo método de Sumner (1944). A atividade da ATPase foi expressa em micromol de Pi liberado.min⁻¹.mg⁻¹ proteína.

5.7. DETERMINAÇÃO DO INCHAMENTO (*SWELLING*) MITOCONDRIAL NA PRESENÇA DE ACETATO DE SÓDIO UTILIZANDO MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS

A determinação do inchamento mitocondrial foi realizada através do método espectrofotométrico descrito por Seppala *et al.* (1973). Mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas como descrito por Voss *et al.* (1961), porém utilizando meio de isolamento modificado contendo: sacarose 330 mmol.L⁻¹, Tris-HCl 1 mmol.L⁻¹ (pH 7,4), EDTA 1 mmol.L⁻¹, omitindo-se da última lavagem o EDTA. O meio de reação foi constituído de sacarose 100 mmol.L⁻¹ HEPES-NaOH 30 mmol.L⁻¹ (pH 7,4), e EDTA 0,5 mmol.L⁻¹ e suplementado com acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, glutamato 15 mmol.L⁻¹, rotenona 4 µmol.L⁻¹ e mitocôndria 1 mg.mL⁻¹. As variações na absorbância foram acompanhadas em espectrofotômetro Hitachi modelo U-2001 UV/VIS no comprimento de onda de 546 nm a 28 °C em um volume final de 3 mL.

5.8. TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL INDUZIDA POR CÁLCIO EM MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS

A suspensão mitocondrial ($0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$) foi incubada em meio contendo: sacarose 250 mmol.L^{-1} , tampão HEPES 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), suplementado com KH_2PO_4 $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$, CaCl_2 20, 50 e $75 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, rotenona $6 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, e succinato de potássio 3 mmol.L^{-1} . Ciclosporina A (CsA) foi utilizada como um inibidor específico do fenômeno de transição de permeabilidade na concentração final de $1 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$. Os experimentos de transição de permeabilidade mitocondrial foram realizados a 28°C , acompanhando-se o decréscimo da absorbância em 540 nm relativa ao inchamento da organela na presença de cálcio, como descrito por Bernardi *et al.* (1992) e Gunter & Pfeifer (1990). Os efeitos dos flavonóides foram determinados após um tempo de incubação de 2 min com a suspensão mitocondrial em espectrofotômetro Hitachi modelo U-2001 UV/VIS.

5.9. FLUIDEZ DE MEMBRANAS ARTIFICIAIS E NATURAIS

5.9.1. Preparo das Membranas Artificiais (liposomas de dimiristoilfosfatidilcolina -DMPC)

Os liposomas de DMPC foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Antunes-Madeira *et al.* (1980), utilizando-se DMPC em concentração final de $345 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$. O fosfolípido foi dissolvido em clorofórmio e o solvente foi evaporado até a secura, em evaporador rotatório, a 25°C . O filme lipídico foi então hidratado com volume adequado de tampão Tris-maleato 10 mmol.L^{-1} (pH 7,0), KCl 50 mmol.L^{-1} , e disperso por agitação manual, em banho a 30°C (7°C acima da temperatura média de transição de fase do

fosfolípido). A amostra foi agitada vigorosamente durante um minuto e então submetida a ultrasonicação suave em banho de ultra-som (THORTON T 7), visando dispersar agregados e tornar a suspensão homogênea. O tempo de sonicação foi controlado pela medida da turbidez da suspensão, a 600 nm em espectrofotômetro HITACHI, modelo U2001 UV/VIS, até atingir uma absorbância de aproximadamente 0,2. Segundo Antunes-Madeira *et al.* (1995) os lipossomas preparados nestas condições são multilamelares.

5.9.2 Preparo das Membranas Naturais (lipossomas de membranas mitocondriais)

As membranas naturais foram preparadas de acordo com a metodologia utilizada por Antunes-Madeira *et al.* (1980), padronizando a concentração de mitocôndrias com relação à concentração de lipídios em $345 \mu\text{mol.L}^{-1}$. O procedimento foi realizado como descrito no item anterior, exceto que as mitocôndrias foram diluídas em volume adequado de tampão Tris-maleato 10 mmol.L^{-1} , pH 7,0, contendo KCl 50 mmol.L^{-1} , e PMSF 10 mmol.L^{-1} , em banho a 30°C . A amostra foi agitada vigorosamente durante um minuto e submetida a sonicação suave em banho de ultra-som (THORTON T 7). O tempo de sonicação foi controlado pela turbidez da suspensão a 600 nm em espectrofotômetro HITACHI, modelo U 2001 UV/VIS, até atingir uma absorbância de aproximadamente 0,2. A concentração de fosfolípidios nas preparações mitocondriais foi determinada seguindo o método de BARTLETT (1959).

5.9.3 Incorporação das Sondas às Membranas Artificiais e Naturais

Foram utilizadas duas sondas o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), que se localiza no interior hidrofóbico da membrana, e o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno-ácido propiônico (DPH-PA), que permanece ancorado à superfície da membrana. Estas sondas foram solubilizadas em tetrahidrofurano e dimetilformamida, respectivamente. Alíquotas das soluções concentradas das sondas foram injetadas, sob agitação vigorosa em vórtex, nas suspensões de membranas (DMPC e mitocôndrias), mantidas a 28°C. A concentração final da sonda e o quociente sonda/lipídeo foram ajustados para 1,73 mmol.L⁻¹ e 1/200 respectivamente, tanto na situação do DPH quanto do DPH-PA. Ambas as sondas incorporam-se rapidamente às membranas multilamelares, atingindo intensidade de fluorescência constante ao fim de 90 minutos de incubação (LENTZ *et al.*, 1976). As preparações de membranas artificiais e naturais, já em presença das sondas, foram incubadas no escuro, durante aproximadamente 19 h, a 8°C (membranas naturais) e 28 °C (membranas artificiais). Para cada amostra (suspensão de membranas contendo sonda) foi preparado um controle sem sonda, contendo volume correspondente de tetrahidrofurano ou dimetilformamida (controle branco) e que sofreu tratamento igual ao da amostra. Estes controles foram utilizados na correção das medições fluorimétricas, para descontar a interferência da luz dispersa pelas partículas em suspensão (light scattering). As suspensões de membrana contendo as sondas foram incubadas por 2 h na presença de hispidulina ou eupafolina na dose de 10 µmol.L⁻¹. Controles com o solvente utilizado na presença e ausência das sondas também foram realizados.

5.9.4 Medições Fluorimétricas

As medições fluorimétricas foram realizadas em espectrofluorímetro modelo RF-5031PC (Shimadzu Scientific Instruments, Inc.), equipado com agitação constante e célula termostatazada pela circulação de água a partir de banho de circulação (PHARMACIA). O controle de temperatura foi de $\pm 0,1$ °C. Para as medições de polarização de fluorescência (P) foram utilizados polarizadores Polaroid: um, entre a amostra e o monocromador de excitação, para interceptar o feixe de excitação; outro, entre a amostra e o monocromador de emissão, para interceptar o feixe de emissão (analisador). A amostra foi excitada pelo componente vertical da luz monocromática e foram medidas as intensidades da luz emitida quando o analisador estava orientado paralela (I_{\parallel}) e perpendicularmente (I_{\perp}) à direção de polarização da luz de excitação. As direções de polarização de I_{\parallel} e I_{\perp} foram, respectivamente, as dos eixos Z e X (Figura 5). O índice de polarização de fluorescência (P) foi calculado como recomendado por Litman & Barenholz (1982), pelo quociente descrito na equação 1.

$$P = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp}) \text{ (Equação 1)}$$

A intensidade de I_{\parallel} e I_{\perp} foi medida depois que o feixe de luz atravessa a rede de difração do monocromador de emissão, onde ocorrem dispersão e alteração da polarização. A dispersão da luz, dependente do comprimento de onda, resulta em transmissão desigual dos dois componentes da luz polarizada. Assim, foi necessário introduzir ainda um fator de correção nesta equação. A correção matemática desta distorção instrumental foi feita conforme recomendado por Toplak *et al.* (1990), introduzindo-se na equação anterior o fator:

$$G = I_{\perp}^* / I_{\parallel}^* \text{ (Equação 2)}$$

em que I_{\perp}^* e I_{\parallel}^* correspondem às intensidades dos componentes vertical e horizontal da luz emitida quando o polarizador estiver orientado horizontalmente. A amostra excitada com o componente horizontal da luz proveniente do monocromador de excitação deverá produzir componentes da luz emitida, vertical e horizontal idênticos, porque as probabilidades de reorientação das moléculas excitadas, durante o tempo de vida da excitação, são idênticas em todas as direções horizontal e vertical. A diferença dos componentes vertical e horizontal, depois de atravessarem o monocromador de emissão, deve-se à dispersão e, portanto, transmissão desigual desses componentes. O valor corrigido do índice de polarização visualizado na equação 3, é:

$$P = (I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}) / (I_{\parallel} + G \cdot I_{\perp}) \text{ (Equação 3)}$$

Deve-se salientar que a interferência da dispersão da luz pelas partículas em suspensão da amostra foi descontada de todas as intensidades de fluorescência medidas (I_{\parallel} , I_{\perp} , I_{\parallel}^* , I_{\perp}^*) subtraindo-lhes as correspondentes intensidades de luz emitida por um controle branco (sem sonda), nas mesmas condições da amostra. Assim, para cada amostra, a determinação do índice de polarização exigiu oito leituras independentes da quantidade de luz emitida nas diversas condições (LITMAN & BARENHOLZ, 1982). As medições de polarização de fluorescência foram realizadas selecionando 365 nm para o comprimento de onda de excitação e 450 nm para o comprimento de emissão (LITMAN & BARENHOLZ, 1982). As fendas de excitação e emissão foram selecionadas em 3 nm. Para cada preparação os valores de polarização foram determinados no intervalo de 10°C a 40°C, variando-se a temperatura a cada

1°C ou 2°C. As temperaturas foram medidas com precisão de $\pm 0,1^\circ\text{C}$ utilizando-se termômetro digital Minipa, modelo APPA-MT 510.

5.9.5 Determinação da Temperatura Média de Transição de Fase (T_m)

Para a determinação da T_m , a curva de polarização foi decomposta em três segmentos lineares e a T_m foi considerada como o ponto médio da projeção vertical do segmento com maior inclinação (ANTUNES-MADEIRA *et al.*, 1980).

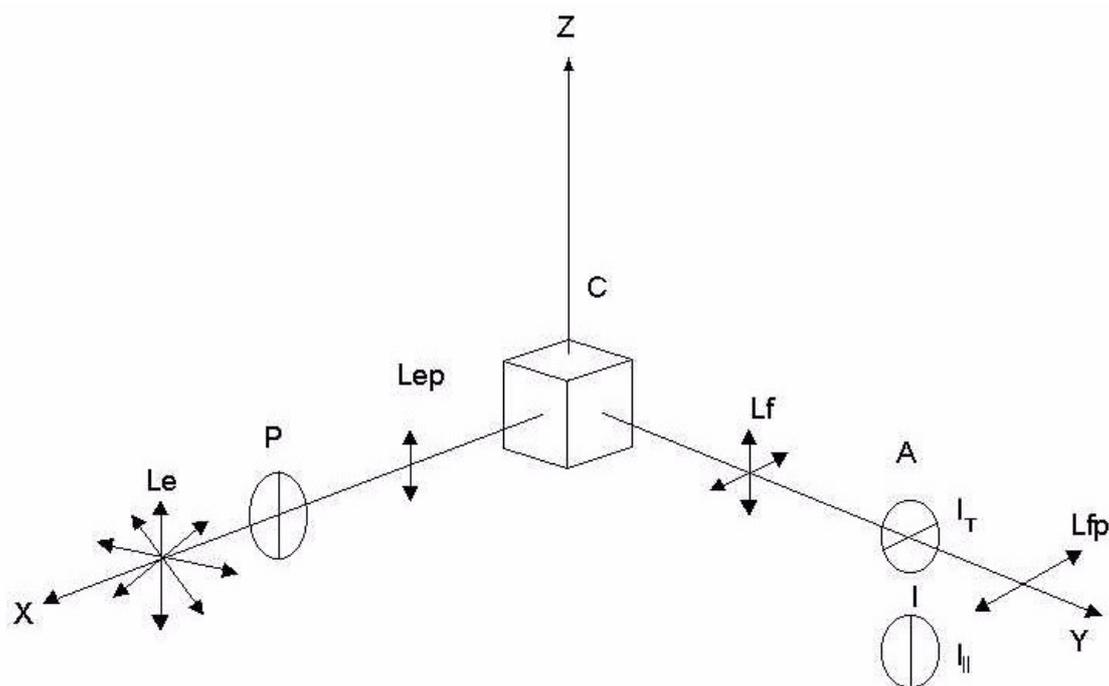


FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DAS MEDIÇÕES DE POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA

FONTE: Adaptado de Van Holde (1975)

NOTA: A luz monocromática de excitação (L_e), ao passar pelo polarizador (P), orientado na vertical, dá lugar a um componente vertical da luz polarizada (L_{ep}) que excita a amostra contida na célula C. A luz emitida (L_f), ao passar pelo analisador (A), dá lugar a componentes da luz polarizada (L_{fp}), $I_{||}$ ou I_{\perp} conforme o analisador estiver colocado paralelamente ou a 90° à direção de polarização da luz de excitação. No processo, são preferencialmente excitadas as moléculas da amostra que se encontram alinhadas com o vetor eletromagnético do feixe polarizado de excitação. Estas moléculas, devido a difusão, vão depois se orientar em várias direções no período de tempo do estado excitado e, por isso, é possível detectar na emissão componentes polarizados paralelamente ($I_{||}$) e perpendicularmente (I_{\perp}) à excitação. Isto é, as moléculas excitadas vão reorientar-se em todas as direções do espaço e, assim, a fluorescência emitida é despolarizada.

5.10. CULTURA CELULAR

5.10.1. Esterilização de Materiais

Todo material de vidro 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, eppendorfs e ponteiros de pipetas automáticas) foram esterilizados em autoclave (Fanen) a 120°C, durante 45 minutos, a 1 atm.

5.10.2. Soluções Tampão e Meios de Cultura

5.10.2.1. Solução Salina Tamponada (PBS)

A solução salina-fosfato tamponada (PBS) foi preparada como solução estoque concentrada 5x. Esta solução concentrada contém: NaCl 680 mmol.L⁻¹, KCl 13,4 mmol.L⁻¹, Na₂HPO₄ 40,5 mmol.L⁻¹ (pH 7,5). A solução foi esterilizada em autoclave (120°C, 1 atm, 30 minutos). Para o uso, a solução foi diluída com água ultrapurificada.

5.10.2.2. Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado neste trabalho foi o meio RPMI (Cultilab, Campinas, Brasil), reconstituído em água ultrapurificada e esterilizado por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm (Millipore®) sob pressão em aparelho Sartorius. Após o procedimento de filtração, alíquotas do meio foram deixadas em estufa a 37°C, para acompanhamento do aparecimento de eventuais contaminantes. Os meios foram mantidos em geladeira a 4°C. Para os experimentos os meios foram

suplementados com quantidade adequada de soro fetal bovino estéril (Laborclin). O pH do meio foi ajustado com solução de bicarbonato de sódio (7,5%, p/v) - esterilizado em autoclave a 120°C e 1 atm por 30 minutos. O tampão utilizado foi HEPES 20 mmol.L⁻¹ (pH 7,0) esterilizado por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm (Millipore®).

5.10.2.3. Solução de Tripsina-EDTA

A solução de tripsina-EDTA foi constituída de: NaCl 137 mmol.L⁻¹, KCl 5,4 mmol.L⁻¹, glucose 5 mmol.L⁻¹, Na₂HPO₄ 0,42 mmol.L⁻¹, KH₂PO₄ 0,44 mmol.L⁻¹, NaHCO₃ 2,3 mmol.L⁻¹, EDTA 0,53 mmol.L⁻¹, 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 à vácuo e armazenada a - 20°C.

5.10.2.4. Manutenção das Células B16-F10 e Melan-A

As linhagens celulares tiveram suas condições de cultivo adaptadas para o Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. A linhagem Melan-A foi gentilmente cedida pelo Prof. Roger Chammas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). A linhagem B16-F10 foi cultivada em RPMI contendo 7,5% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e a linhagem Melan-A em RPMI com 7,5% (v/v) SFB e 10 µmol.L⁻¹ de PMA. As culturas foram mantidas em estufa (Sanyo), em atmosfera contendo 5% de CO₂, com umidade relativa 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, as células (10^6 células. mL⁻¹) foram suspensas em meio de cultura, acrescido de soro fetal bovino 40% (v/v) e DMSO 10% (v/v), 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).

5.11. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

As células B16-F10 (5×10^4 células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços e deixadas por 18 h em estufa de CO₂ a 37°C para aderirem. Após esse tempo, as células foram mantidas na presença e na ausência dos compostos em estudo. Foram utilizadas diferentes concentrações (25 - 200 μ mol.L⁻¹) das flavonas. Nos controles, o meio continha quantidades adequadas de DMSO 0,1% (v/v). A viabilidade celular foi quantificada através do corante cristal violeta, preparado a 0,2% (p/v) em etanol 2% (v/v), o qual cora os ácidos nucléicos das células aderidas e fixadas com metanol 100% (KUENG *et al.*, 1989). Após 2 a 5 minutos de coloração, os poços foram exaustivamente lavados (10 vezes com PBS) e o corante foi eluído com 200 μ L de solução de citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ em etanol 50%, durante 10 minutos. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Micro-Elisa Reader, Bio-Rad) utilizando filtro de 540-550 nm. Os resultados foram expressos em percentagem de células viáveis em relação ao controle (100%).

5.12. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os ensaios de proliferação celular foram realizados na ausência e presença dos flavonóides. As células (5×10^3 células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços e deixadas por 16 h em estufa de CO_2 a 37°C para aderirem. O meio foi substituído por outro sem adição de SFB para que todas as células permanecessem na fase G_0 do ciclo celular. Após 24 h, o meio sem soro foi trocado por meio contendo SFB e as células foram mantidas na presença e na ausência do composto em estudo. Nos controles, o meio continha quantidades adequadas de veículo. A proliferação celular foi quantificada através do corante cristal violeta. Após o tempo determinado as células não viáveis foram aspiradas e aquelas aderidas à placa foram fixadas em metanol 100% por 10 minutos em temperatura ambiente. Às células aderidas foi acrescentada a solução do corante cristal violeta, preparado a 0,2% (p/v) em etanol 2% (v/v). Após 2 a 5 minutos, os poços foram exaustivamente lavados (10 vezes com PBS) e, o corante eluído com $200 \mu\text{L}$ de solução de citrato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ em etanol 50%, durante 10 minutos. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Micro-Elisa Reader, Bio-Rad) utilizando filtro de 540-550 nm. Os resultados foram expressos em número de células, que foi determinado através de curva padrão (número de células x absorbância).

5.13. ESTUDOS MORFOLÓGICOS

5.13.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

As células B16-F10 (5×10^4) foram plaqueadas sobre lamínulas circulares (Glass Técnica - Brasil) de 12 mm de diâmetro, contidas em placas de 24

poços. Após 18 h as células foram tratadas com $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ das flavonas por 24 h. As lamínulas foram então lavadas com PBS e fixadas em fixador Karnowski (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,2 a 4°C) e o material foi desidratado em série alcoólica crescente e acetona, sendo o ponto crítico obtido em um Balzers CPD - 010 com gás carbônico. Em seguida, foi realizada a metalização em ouro obtida em um Balzers SCD - 030. As análises e a documentação do material foram feitas no microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM 6360 LV do Centro de Microscopia Eletrônica - Universidade Federal do Paraná com a colaboração da Profa. Lucélia Donatti do Departamento de Biologia Celular.

5.13.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As células B16-F10 (5×10^4) foram plaqueadas em placas de 24 poços. O tratamento com as flavonas foi realizado na dose de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ por 24 h. Após o tempo de tratamento as células foram lavadas com PBS e descoladas com EDTA/PBS 2 mmol.L^{-1} e fixadas em Karnowiski (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH (7.2) a 4°C . Após a fixação, as células foram lavadas em tampão cacodilato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7,2) a 4°C . Em seguida, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7,2) durante 1 hora. A contrastação em blocos foi feita com acetato de uranila 2 % durante 2 h. O material foi desidratado em série alcoólica crescente e em seguida colocado em acetona. A impregnação e inclusão ocorreram em resina Epon-812 (LUFT, 1961). Os cortes foram feitos em ultramicrótomo Sorval Porter Blum MT-2 com utilização de navalhas de vidro e de diamante. Os cortes ultrafinos foram contrastados

em solução aquosa de acetato de uranila 2% (Watson, 1958) e nitrato/acetato de chumbo (REYNOLDS, 1963). A observação do material foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200EX II do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR com a colaboração da Profa. Lucélia Donatti do Departamento de Biologia Celular.

5.14 ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DE CITOCROMO C

Para a detecção da liberação de citocromo *c*, foi usada a metodologia descrita por Appaix *et al.* (2000). As células (1×10^6) foram plaqueadas e deixadas por 18 h em estufa a 37°C e atmosfera de 5% CO₂ para aderirem. O tratamento foi realizado com 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ das flavonas pelo período de 24 h. Após o tratamento, as células foram soltas, centrifugadas e lavadas com PBS, mantendo um volume final de 1 mL. Uma alíquota de 30 μL foi separada para quantificação de proteína pelo método de Bradford (1956). A segunda alíquota foi centrifugada a 4.500 x g durante 15 minutos, o precipitado foi ressuspensão em 1 mL de solução A (Tris-HCl 10 mg.mL^{-1} , pH 7,2, EGTA 3 mg.mL^{-1} e sacarose 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e digitonina 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foi adicionada e incubada durante 30 minutos a 4°C. Após o período de incubação, a suspensão celular foi centrifugada a 10.000 x g durante 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado usando membrana de poliestireno com diâmetro de poro de 0,22 μm , sendo sua absorbância lida a 414 nm. A concentração de citocromo *c* liberada foi calculada usando $\epsilon = 100 \text{ mmol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$, e os resultados expressos em percentagem de citocromo *c* liberado em relação ao controle (100%).

5.15. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Todos os ensaios para avaliar a atividade das enzimas antioxidantes foram acompanhados em espectrofotômetro Shimadzu UV-2450, como descrito a seguir. A dosagem de proteínas em todos os ensaios enzimáticos foi realizada pelo método de Bradford (1956).

5.15.1. Obtenção do extrato livre de células

Após a incubação por 24 h com os flavonóides na dose de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ as células (1×10^6) foram lavadas com PBS para eliminar as células mortas, coletadas com EDTA/PBS 2 mmol.L^{-1} , ressuspensas em PBS e sonicadas em gelo por três vezes (20 V / 20 s). A solução foi centrifugada por 10 min a 13000 rpm a 4°C em microcentrífuga e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios de atividade enzimática.

5.15.2 Superóxido Dismutase (EC 1.15.1.1)

A atividade de superóxido dismutase foi avaliada espectrofotometricamente através da autooxidação da epinefrina em 480 nm em sistema de reação contendo tampão carbonato de sódio (pH 10,2) e adrenalina 1 mmol.L^{-1} dissolvida em ácido acético (1:3) (MISRA & FRIDOVICH, 1972). Em pH básico (10,2) a adrenalina se autooxida através de um mecanismo gerador de radical superóxido que por sua vez ativa a reação de autooxidação. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína capaz de inibir 50% da atividade e essa quantidade de proteína foi utilizada em todos os ensaios. Os resultados foram expressos em relação ao controle (100%).



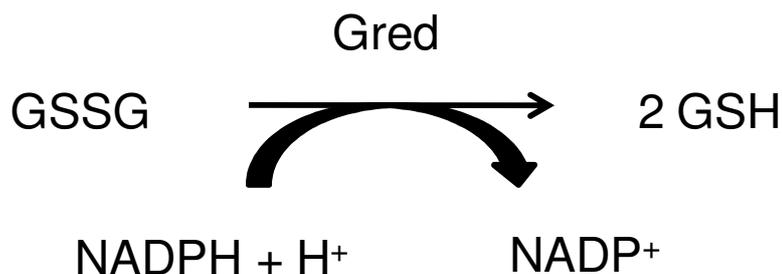
5.15.3 Catalase (E.C 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi acompanhada pelo decréscimo da absorvância a 240 nm (AEBI, 1984) em sistema de reação constituído de tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹ (pH 7,0), H₂O₂ 20 mmol.L⁻¹ e 200 µg de proteína.mL⁻¹. O ensaio foi iniciado pela adição do H₂O₂ e acompanhado durante 5 minutos. Os resultados expressos como porcentagem em relação ao controle, foram calculados considerando-se o coeficiente de extinção molar do H₂O₂ em 240 nm (3,94 µmol⁻¹.L.cm⁻¹).



5.15.4 Glutathiona Redutase (Gred) (EC 1.6.4.2)

A atividade da Gred foi avaliada de acordo com a técnica proposta por Sies *et al.* (1979). Neste ensaio, a Gred catalisa a redução da glutathiona na sua forma oxidada na presença de NADPH. O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato 100 mmol.L⁻¹ (pH 7,0) EDTA 1 mmol.L⁻¹, GSSG 0,66 mmol.L⁻¹, NADPH 0,075 mmol.L⁻¹ e 100 µg de proteína.mL⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de GSSG e acompanhada durante 5 minutos a 340 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle (100%), considerando o coeficiente de extinção molar do NADPH em 340 nm (6220 mol⁻¹.L.cm⁻¹).



5.15.5 Glutathione Peroxidase (Gpx) (E.C. 1.11.1.6)

A atividade da Gpx foi avaliada de acordo com a técnica proposta por Flohé & Gunzler (1984). Neste ensaio a Gpx catalisa a redução do peróxido em presença de GSH gerando glutathione oxidada (GSSG), a GSSG na presença de NADPH e Gred purificada reduz novamente a glutathione. A atividade enzimática foi acompanhada pelo decréscimo da absorvância do NADPH a 340 nm. O sistema de reação foi composto de tampão fosfato 100 mmol.L⁻¹ (pH 7,0) EDTA 1 mmol.L⁻¹, GSH 4 mmol.L⁻¹, NADPH 0,15 mmol.L⁻¹, Gred purificada 0,2 U, *t*-butil hidroperóxido 0,5 mmol.L⁻¹ e 100 µg de proteína.mL⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de *t*-butil hidroperóxido e acompanhada durante 1 minuto. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle, considerando o coeficiente de extinção molar do NADPH em 340 nm (6220 mol⁻¹.L.cm⁻¹).



5.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. EFEITOS DA EUPAFOLINA E HISPIDULINA SOBRE A BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E FLUIDEZ DE MEMBRANAS

6.1.1 Efeito da eupafolina sobre a atividade da ATPase em mitocôndrias intactas

Anteriormente, verificou-se que a eupafolina é capaz de inibir a atividade das enzimas da cadeia respiratória (entre os complexos I e III), reduzir a velocidade respiratória no estado 3, estimular a velocidade respiratória no estado 4 (na dose de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e reduzir a razão ADP/O e o coeficiente de controle respiratório (RCC) (HERRERIAS *et al.*, 2008). Entretanto, os efeitos da eupafolina sobre a atividade enzimática da ATPase em mitocôndrias intactas ainda não haviam sido determinados.

A ATPsintase mitocondrial, também chamada F_1F_0 ATPsintase ou complexo IV, está localizada na membrana mitocondrial interna juntamente com os demais complexos da cadeia respiratória mitocondrial (Wittig & Schägger, 2008). É uma ATPase do tipo F, que catalisa a formação de ATP a partir de ADP e P_i , utilizando o potencial eletroquímico gerado pelo fluxo de elétrons da cadeia respiratória através da membrana mitocondrial interna. O complexo enzimático é constituído por: F_1 , componente periférico de membrana, voltado para a matriz mitocondrial e F_0 , componente integral de membrana (ERNSTER *et al.*, 1963; CHANCE & HOLLINGER, 1963; BOYER, 2000). O componente F_1 possui nove subunidades com cinco diferentes tipos, com composição $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$. Cada uma das subunidades β possui um sítio catalítico para a síntese de ATP. O complexo F_0 é composto por três

subunidades, a, b e c na proporção de ab_2c_{10-12} o qual forma um poro de passagem de prótons (BOYER, 1997).

A eupafolina não altera a atividade de ATPase utilizando mitocôndrias rompidas (HERRERIAS *et al.*, 2008), o que descarta o efeito direto desse flavonóide sobre o complexo enzimático. A determinação da atividade ATPásica em mitocôndrias intactas aqui proposta, tem por objetivo verificar se o composto possui efeito desacoplador sobre a fosforilação oxidativa ou ainda, se o translocador ADP/ATP poderia estar sendo afetado. Quando se utiliza mitocôndrias acopladas pode-se indiretamente verificar possíveis efeitos da flavona na permeabilidade da membrana mitocondrial a prótons.

Os efeitos da eupafolina sobre a atividade ATPásica em mitocôndrias intactas estão descritos na Tabela 2.

Nas doses testadas não foram encontrados efeitos significativos da eupafolina sobre a atividade do complexo ATPase em mitocôndrias intactas (Tabela 2), indicando que essa flavona não tem atividade desacopladora. Além disso, também não foi observado efeito significativo sobre a atividade da ATPase em mitocôndrias intactas em presença de FCCP (um desacoplador clássico).

TABELA 2: EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ATPase MITOCONDRIAL

Eupafolina ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	ATPase intacta (%)	ATPase intacta + FCCP (%)
0	100	100
25	99 \pm 18	93 \pm 13
50	94 \pm 6	90 \pm 14
75	98 \pm 15	98 \pm 7
100	97 \pm 13	101 \pm 13
200	101 \pm 7	102 \pm 10

FONTE: O autor (2009)

NOTA: As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos item 5.5. O ensaio foi realizado em sistema de reação constituído por: sacarose 50 mmol.L^{-1} , tampão Tris-HCl 12 mmol.L^{-1} (pH 7,4), KCl 50 mmol.L^{-1} e mitocôndria 2 mg.mL^{-1} . O volume final da reação foi de 1 mL e a temperatura foi mantida em 28°C. A reação foi iniciada pela adição de ATP 3 mmol.L^{-1} (T_0). Controle (100%) corresponde a: 34,2 \pm 2 $\mu\text{mol Pi}$ liberado e com FCCP: 64 \pm 5 $\mu\text{mol Pi}$ liberado. Os resultados são média \pm DP de quatro experimentos realizados em triplicata e estão expressos como % em relação ao controle.

6.1.2 Efeito da eupafolina sobre o inchamento (*swelling*) mitocondrial na presença de acetato de sódio utilizando-se mitocôndrias energizadas

A capacidade da mitocôndria de inchar sobre uma grande variedade de condições é uma propriedade intensamente estudada. O inchamento osmótico causado pelo fluxo de água e íons através da membrana é um valioso meio de estudo do transporte de íons (NICHOLLS & FERGUSON, 1992). A permeação de água é rápida o suficiente para assegurar que o equilíbrio osmótico seja mantido e que a velocidade do inchamento seja limitada pela velocidade do transporte de soluto (GARLID & BEAVIS, 1985).

No inchamento mitocondrial energizado em presença de acetato de sódio a oxidação do substrato gera uma diferença de potencial eletroquímico que favorece a entrada do sal de sódio, e conseqüentemente de água, atingindo o estado de equilíbrio osmótico em alguns minutos. A capacidade de contração da membrana mitocondrial interna também pode ser avaliada, promovendo-se a reversão do inchamento pela utilização de inibidores da cadeia respiratória ou da ATPsintase (SEPPALA *et al.*, 1973).

O inchamento mitocondrial induzido por substrato depende diretamente do potencial e da permeabilidade da membrana. O potencial determina a amplitude e a permeabilidade é fator importante na determinação da velocidade do inchamento. A velocidade da contração depende da velocidade em que o potencial é colapsado e a amplitude da contração pode refletir a elasticidade da membrana (MUSTAFA *et al.*, 1966). Desta forma, esta técnica permite avaliar indiretamente a capacidade de elasticidade e permeabilidade da membrana mitocondrial e observar a interferência sobre processos geradores da força próton motriz.

Neste trabalho o experimento de inchamento mitocondrial na presença de acetato de sódio e glutamato foi utilizado para avaliar indiretamente o efeito da eupafolina sobre o fluxo de elétrons na cadeia respiratória e sobre a fluidez da membrana mitocondrial.

Os efeitos da eupafolina sobre a amplitude do inchamento de mitocôndrias isoladas de fígado de rato e energizadas com o substrato glutamato estão representados na Figura 6. A eupafolina inibiu o inchamento mitocondrial induzido por glutamato e acetato de sódio de maneira dose-dependente. Nas menores doses (25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), a eupafolina causou uma redução na amplitude do inchamento em torno de 60%, nas demais doses (75, 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) não ocorreu inchamento mitocondrial. Os valores da amplitude de contração foram semelhantes aos do inchamento quando ao meio de reação foi adicionada rotenona, um inibidor do fluxo de elétrons dos centros Fe-S do Complexo I para a ubiquinona. Os resultados aqui obtidos estão de acordo com os verificados anteriormente nos quais a eupafolina (25 - 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) era capaz de inibir (15 - 80%) de forma dose-dependente a velocidade respiratória no estado III quando o glutamato era utilizado como substrato e cerca de 20 a 75% a atividade da NADH-oxidase. Além disso, a eupafolina nas doses de 75, 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ promovia uma inibição de cerca de 30% na amplitude do inchamento mitocondrial induzido por valinomicina, indicando indiretamente que esta flavona afeta a fluidez da membrana mitocondrial (HERRERIAS *et al.*, 2008). Desta forma, a intensa inibição promovida pela eupafolina sobre a amplitude do inchamento mitocondrial na presença de substrato seria reflexo dos efeitos da eupafolina sobre atividades enzimáticas da cadeia respiratória e possivelmente sobre a fluidez da membrana mitocondrial interna mitocondrial.

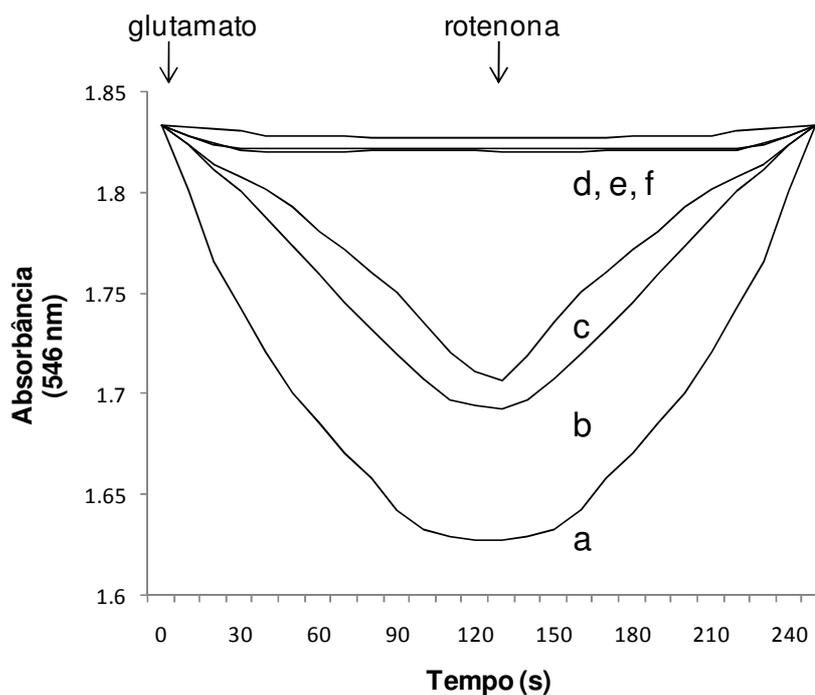


FIGURA 6: EFEITO DA EUPAFOLINA SOBRE O INCHAMENTO (SWELLING) E CONTRAÇÃO DE MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS COM GLUTAMATO NA PRESENÇA DE ACETATO DE SÓDIO

Fonte: O autor (2009)

Nota: O sistema de reação foi constituído de: sacarose 100 mmol.L^{-1} , HEPES-NaOH 30 mmol.L^{-1} (pH 7,4), e EDTA $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ e suplementado com acetato de sódio 50 mmol.L^{-1} , glutamato de sódio 15 mmol.L^{-1} e $0,3 \text{ mg}$ de proteína mitocondrial em volume final de 3 mL . A preparação mitocondrial foi incubada por 2 min antes da adição do glutamato na ausência (controle) (a) e na presença de eupafolina nas concentrações indicadas: (b) $25 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$; (c) $50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$; (d) $75 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$; (e) $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ e (f) $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, conforme procedimento descrito em materiais e métodos, item 5.6. A rotenona $4 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ foi adicionada no tempo de 120 s como indicado para promover a contração da organela. O controle (100%) constituiu-se somente de sistema de reação. Os traçados são representativos de três experimentos independentes.

Para confirmar os efeitos sobre propriedades da membrana mitocondrial, foram realizados experimentos de polarização de fluorescência utilizando sondas fluorescentes DPH e DPH-PA que se inserem em regiões distintas da membrana. Estas análises permitem avaliar os efeitos da eupafolina e hispidulina sobre a fluidez da membrana e os resultados estão descritos a seguir.

6.1.3 Efeitos da eupafolina e hispidulina sobre a fluidez de membranas artificiais e naturais

A fluidez de membranas biológicas influencia uma grande variedade de funções biológicas. Esse parâmetro é dependente da composição lipídica e da temperatura (LENTZ *et al.*, 1976). Além disso, a fluidez é dependente da flexibilidade das cadeias acil, da difusão lateral das moléculas no plano das membranas e da difusão transversa das moléculas entre uma camada e outra (GOLDSTEIN, 1984).

Em uma bicamada, na fase gel, a movimentação de uma cadeia de ácido graxo é transmitida para as próximas cadeias formando assim, uma unidade cooperativa. Desta forma, mudanças conformacionais podem ser transmitidas em uma unidade cooperativa (JAIN & WU, 1977).

Moléculas externas podem bloquear, ou atrapalhar esse sistema de transmissão, modificando o perfil de transição de fase do lipídio. Moléculas pequenas podem se inserir entre as cadeias acil e o efeito dessas moléculas podem influenciar o modo de empacotamento das cadeias hidrocarbônicas e promover desordem na transição de fase (JAIN & WU, 1977).

A mais importante alteração na fluidez de uma bicamada ocorre como resultado da transição de fase a partir da fase gel para a fase líquido-cristalina (LENTZ *et al.*, 1976). Durante a fase gel, as cadeias acil estão altamente ordenadas sendo que essa organização exige que todas as ligações carbono-carbono (C-C) estejam na conformação trans. Já no estado líquido - cristalino, algumas ligações C-C estão na conformação gauche (LEE, 1975).

A transição de fase é um processo endotérmico que pode ser detectado por diferentes metodologias (JAIN & WU, 1977). Nesse trabalho foi utilizada a técnica de polarização de fluorescência com lipossomas multilamelares de DMPC contendo duas sondas fluorescentes diferentes. Um aspecto comum dessas sondas é que a polarização de sua fluorescência reflete a mobilidade dessas sondas na membrana e pode ser monitorada como uma forma de estimar a fluidez da membrana (GOLDSTEIN, 1984). A sonda DPH localiza-se na região mais hidrofóbica da membrana, enquanto que a DPH-PA permanece em sua superfície devido a sua carga elétrica negativa conferida pela presença do ácido prôpionico na forma ionizada.

A realização de novos experimentos sobre a ação da hispidulina e eupafolina sobre membranas foram motivados por resultados anteriores. Eupafolina e hispidulina inibem atividades de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e o inchamento mitocondrial energizado (DABAGUI- BARBOSA *et al.*, 2005; HERRERIAS *et al.*, 2008). Além disso, a eupafolina promove inibição do inchamento não-energizado (HERRERIAS *et al.*, 2008).

Os perfis correspondentes da transição da fase gel para a fase líquido-cristalina de lipossomas de DMPC em presença ou não de eupafolina ou hispidulina estão apresentados na Figura 7 e 8. Na presença de flavonóides foi

realizada incubação com os lipossomas por 2 h. Utilizou-se a concentração de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pois, nessa dose, não ocorreu interação entre a fluorescência emitida pelas sondas e a emitida pelos flavonóides. A hispidulina aumentou os valores de P em ambas as fases, fluída e gel, com a sonda DPH quando comparados com os valores do controle (Figura 7), sugerindo que esta flavona diminui a fluidez da membrana de DMPC nessas condições. Contudo, quando utilizamos eupafolina as alterações do perfil de transição de fase do DMPC foram diferentes e mais sutis. Os valores de P na fase gel foram menores que o controle, enquanto que, na fase fluída eles foram levemente superiores (Figura 7). As alterações do perfil de transição de fase do DMPC causadas por eupafolina e hispidulina não alteraram a temperatura média de transição de fase (T_m), que permaneceu em $21,5^\circ \text{C}$. Este valor de temperatura é inferior aos $23,5^\circ \text{C}$ descritos por Antunes - Madeira *et al.* (1991), entretanto, esses autores utilizaram a metodologia da turbidimetria para determinação da transição de fase. A T_m corresponde à temperatura na qual os fosfolípidios passam do estado de gel para o estado líquido-cristalino e depende da sonda utilizada. Em valores de temperatura inferiores aos da T_m as cadeias acil dos ácidos graxos estão empacotadas de forma ordenada, entretanto em temperaturas superiores ocorre a desorganização dessas cadeias. Esse estado de organização das cadeias permite um menor ou maior movimento das sondas. Valores altos de P indicam menor movimento das sondas e, valores mais baixos de polarização, significam que as sondas estão se movimentando mais.

Quando utilizamos a sonda DPH-PA, tanto a eupafolina quanto a hispidulina afetaram discretamente o perfil de transição de fase dos lipossomas

de DMPC somente na fase fluida. Ambas as flavonas não afetaram a T_m (24°C) (Figura 8). É importante ressaltar que a concentração de DMSO utilizada (0,1%v/v) não afetou o perfil termotrópico quando comparado com o controle para ambas as sondas.

Para uma melhor correlação com os experimentos mitocondriais realizamos o experimento de polarização de fluorescência em membranas naturais, tendo como modelo a membrana mitocondrial. A membrana mitocondrial possui pouco colesterol e alto percentual de ácidos graxos insaturados (ANTUNES-MADEIRA & MADEIRA, 1984) desta forma, essas membranas não apresentam uma acentuada passagem do estado gel para o de líquido-cristalino como é observado nas membranas artificiais de DMPC.

O tratamento com eupafolina não afeta o perfil termotrópico de membranas mitocondriais com a sonda DPH, contudo, a hispidulina promove um aumento nos valores de polarização de fluorescência, em baixas temperaturas, em relação ao controle, indicando um enrijecimento da membrana e uma diminuição dos valores de P nas maiores temperaturas (FIGURA 9). Com DPH-PA, a hispidulina promove um discreto decréscimo na fluidez em resposta a um aumento da temperatura. Houve um pequeno aumento nos valores de P no tratamento com eupafolina também (FIGURA 10).

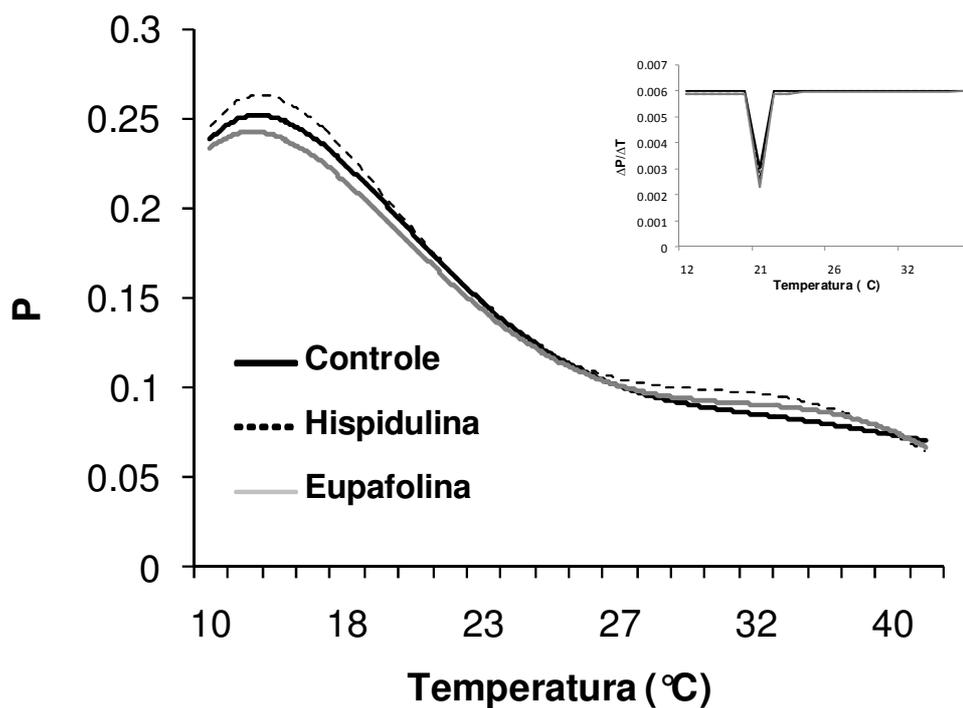


FIGURA 7: EFEITO DA EUPAFOLINA E HISPIDULINA SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DA SONDA DPH EM MEMBRANA ARTIFICIAL EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Membranas de DMPC foram preparadas conforme descrito em Materiais e Métodos item 5.8. As suspensões de membrana contendo a sonda DPH foram incubadas por 2 h na presença de eupafolina ou hispidulina na dose de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$. O inserto representa a polarização diferencial da sonda DPH ($\Delta P/\Delta T$) em função da temperatura. Os traçados são representativos de três experimentos independentes.

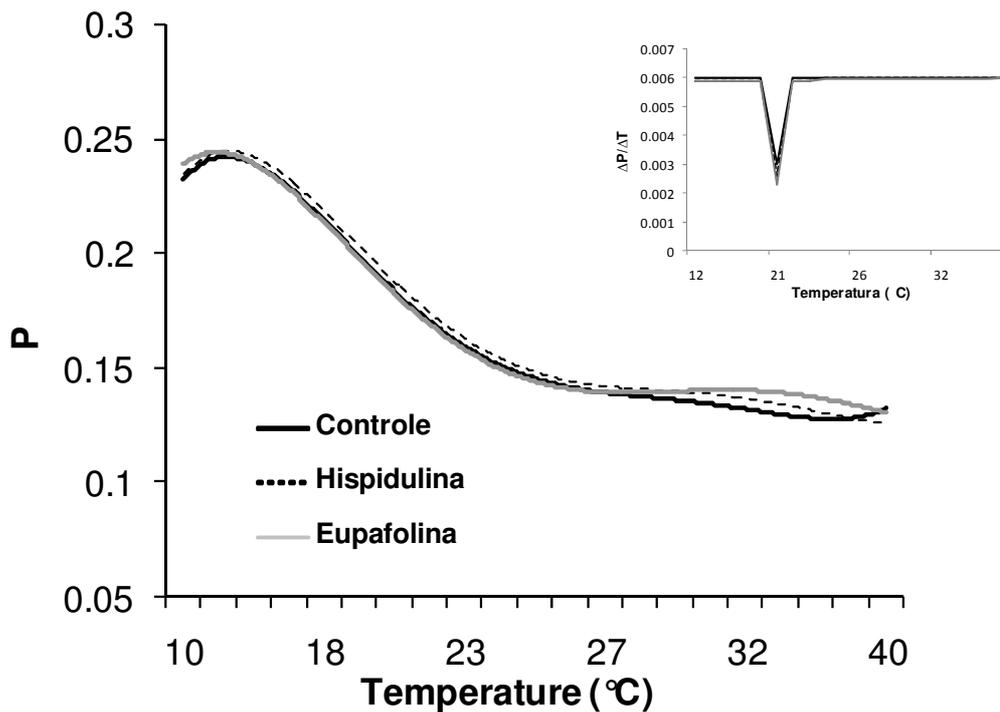


FIGURA 8: EFEITO DA EUPAFOLINA E HISPIDULINA SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DA SONDA DPH-PA EM MEMBRANA ARTIFICIAL EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Membranas de DMPC foram preparadas conforme descrito em Materiais e Métodos item 5.8. As suspensões de membrana contendo a sonda DPH-PA foram incubadas por 2 h na presença de eupafolina ou hispidulina na dose de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$. O inserto representa a polarização diferencial da sonda DPH-PA ($\Delta P/\Delta T$) em função da temperatura. Os traçados são representativos de três experimentos independentes.

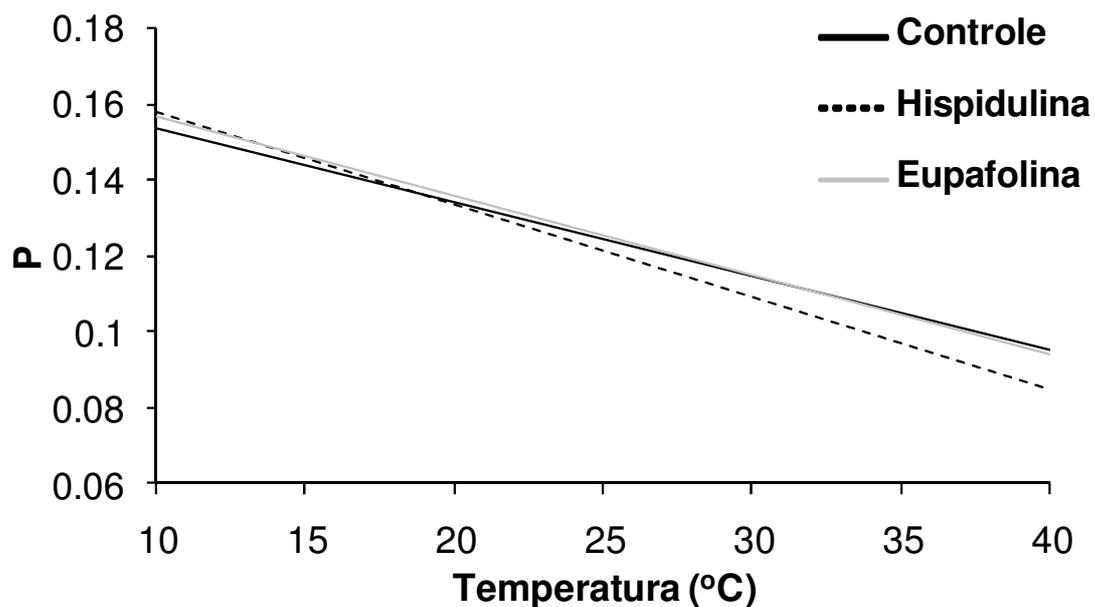


FIGURA 9: EFEITO DA EUPAFOLINA E HISPIDULINA SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DA SONDA DPH EM MEMBRANA NATURAL EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Membranas mitocondriais foram preparadas conforme descrito em Materiais e Métodos item 5.8. As suspensões de membrana contendo a sonda DPH foram incubadas por 2 h na presença de eupafolina ou hispidulina na dose de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Os traçados são representativos de três experimentos independentes.

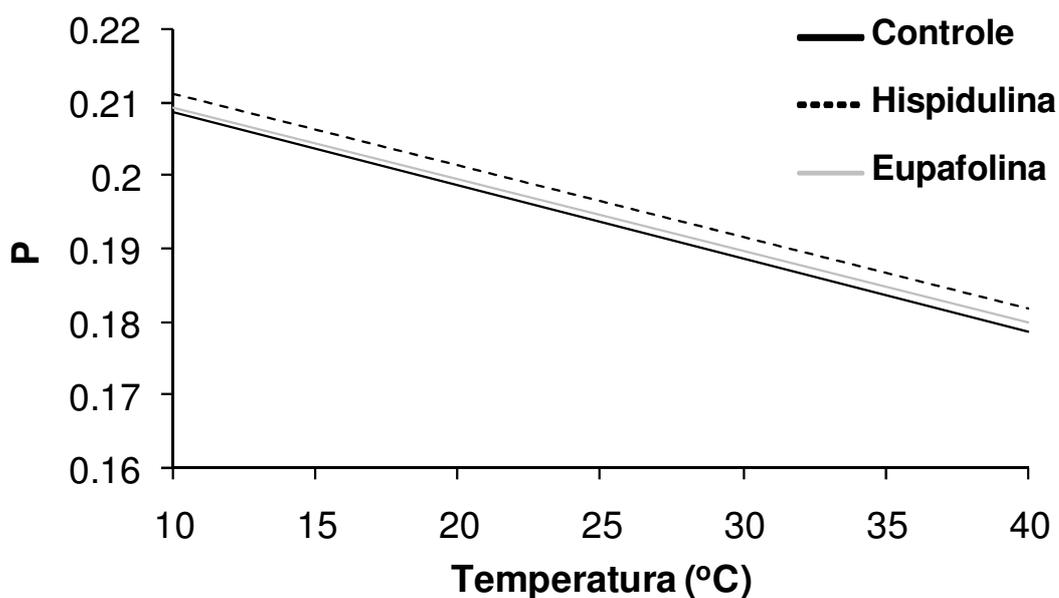


FIGURA 10: EFEITO DA EUPAFOLINA E HISPIDULINA SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DA Sonda DPH-PA EM MEMBRANA NATURAL EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Membranas mitocondriais foram preparadas conforme descrito em Materiais e Métodos item 5.8. As suspensões de membrana contendo a sonda DPH-PA foram incubadas por 2 h na presença de eupafolina ou hispidulina na dose de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Os traçados são representativos de três experimentos independentes.

A interação de flavonóides com determinados componentes da membrana celular ocorre através de duas maneiras: através da sua interação na interface lipídeo-água ou pela sua distribuição na porção hidrofóbica da membrana (OTEIZA *et al.* 2005). Estas diferenças na interação podem ocorrer por diferentes fatores, incluindo a estrutura química do composto. Scheidt *et al.* (2004) demonstraram que a quantidade e a posição de grupamentos hidroxila em flavonóides determinam a localização e a distribuição desses compostos em membranas.

Ao comparar-se a estrutura química das flavonas utilizadas neste estudo, a diferença consiste no anel catecol presente na eupafolina, o que torna sua estrutura um pouco mais hidrofílica quando comparada com a hispidulina e poderia explicar, pelo menos em parte, os maiores efeitos da hispidulina sobre os lipossomos de DMPC e sobre a membrana mitocondrial. Como foram utilizadas as sondas DPH-PA e DPH, que se inserem em regiões distintas da membrana, esses resultados permitem sugerir que, os principais sítios de interação da hispidulina com membranas situam-se na fase apolar da mesma, o que está de acordo com a característica hidrofóbica da sua estrutura. Cabe ressaltar que também ocorre interação com a fase polar.

Esses resultados de interação e alteração de determinadas propriedades de membranas tornam-se de fundamental importância, pois alterações na reologia de membranas podem afetar múltiplos eventos biológicos que ocorrem na membrana celular, incluindo a atividade de enzimas e transporte (OTEIZA *et al.* 2005).

Esses resultados sugerem que ambas as flavonas, em especial a hispidulina promovem pequenas alterações na fluidez de membranas. Os

valores maiores de P indicam uma possível redução da fluidez o que poderia afetar o transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. Isto poderia, pelo menos em parte, explicar a diminuição no consumo de oxigênio promovido pela eupafolina e hispidulina e ainda contribuir para as inibições do inchamento mitocondrial (DABAGHI-BARBOSA *et al.*, 2005; HERRERIAS *et al.*, 2008).

6.1.4 Efeitos dos flavonóides eupafolina e hispidulina sobre a transição de permeabilidade mitocondrial

A transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) é um processo caracterizado pela abertura de um canal na membrana mitocondrial interna, conhecido como poro de transição de permeabilidade (PTP), que é dependente de cálcio e sensível a ciclosporina A (KOWALTOVSKI & VERCESI, 1999).

A abertura do PTP compromete a permeabilidade da membrana mitocondrial interna, permitindo a entrada de íons e solutos. Como consequência, ocorre a dissipação do potencial transmembrana e o inchamento mitocondrial (DORTA *et al.*, 2005).

Esses eventos estão associados à morte celular apoptótica, e são induzidos por uma grande variedade de agentes ou condições, usualmente envolvendo ERO (PARDO-ANDREU *et al.*, 2006). Na mitocôndria, agentes pró-oxidantes e antioxidantes geralmente são indutores ou inibidores do TPM, respectivamente (DORTA *et al.*, 2005). Desta forma, compostos com conhecida ação antioxidante como os flavonóides teriam uma provável ação protetora sobre a abertura do PTP (TOREL *et al.*, 1986; ARORA *et al.*, 1998). Entretanto, a genistéina, uma isoflavona com estrutura semelhante à eupafolina, promove

apoptose via abertura do PTP, indicando uma provável ação pró-oxidante deste composto (YOON *et al.*, 2000). Salvi *et al.* (2002) também relataram a indução da TPM pela genisteína através da geração de ERO decorrente de uma inibição do complexo III da cadeia respiratória pelo flavonóide.

A avaliação dos efeitos da hispidulina e eupafolina sobre a transição de permeabilidade mitocondrial é importante, pois, essas flavonas inibem atividades de enzimas da cadeia respiratória, são citotóxicas em células HeLa e ainda, a eupafolina pode sofrer autooxidação gerando ERO (DABAGUI-BARBOSA *et al.*, 2005; HERRERIAS *et al.*, 2008).

Inicialmente foi determinada qual a concentração de cálcio que seria utilizada nos demais experimentos. Optou-se por utilizar a concentração de cálcio de $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$ por esta ser a concentração que promoveu o inchamento mais significativo (Figura 11). Os efeitos dessas flavonas sobre a TPM estão demonstrados nas Figuras 12 e 13.

A eupafolina não promoveu alteração na amplitude do inchamento mitocondrial induzido por cálcio nas doses de 25 - $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$, entretanto, para a maior dose ($200 \mu\text{mol.L}^{-1}$) houve uma inibição do TPM de aproximadamente 35% (Figura 12). A hispidulina não alterou o inchamento induzido por cálcio em todas as doses testadas (25 - $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (Figura 13).

Os resultados obtidos com a hispidulina estão de acordo com os obtidos por Dorta *et al.* (2005) que verificaram que flavonóides como quercetina (flavonol) e galangina (flavona) que também possuem ação inibitória do fluxo de elétrons da cadeia respiratória não interferiam significativamente sobre o inchamento induzido por cálcio. Contudo, o efeito inibitório promovido pela eupafolina na dose de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ poderia ser explicado devido à

desenergização da mitocôndria decorrente da inibição promovida pelos flavonóides, a qual prejudicaria a captação do cálcio necessário para o processo da TPM (DORTA *et al.*, 2005). Para comprovação dessa hipótese seria necessária a realização de estudos adicionais sobre a captação de cálcio em presença dos flavonóides.

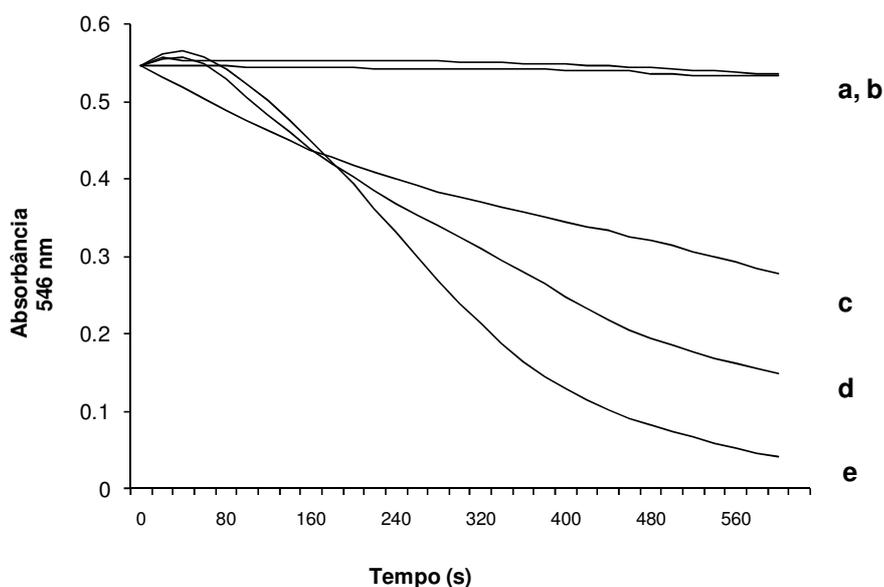


FIGURA 11: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR CÁLCIO

FONTE: O autor (2009)

NOTA: O experimento foi realizado conforme descrito em Materiais e Métodos item 5.7. (a) Controle sem cálcio; (b) CsA; (c) $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ CaCl_2 ; (d) $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ CaCl_2 ; (e) $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$ CaCl_2 . O sistema de reação foi constituído de: sacarose 250 mmol.L^{-1} , tampão HEPES 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), suplementado com KH_2PO_4 $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$, rotenona $6 \mu\text{mol.L}^{-1}$, succinato de potássio 3 mmol.L^{-1} , proteína mitocondrial $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ e CsA $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e diferentes concentrações de CaCl_2 conforme indicado. Os traçados são representativos de três experimentos independentes em triplicata. O inchamento é representado pela diminuição na absorbância.

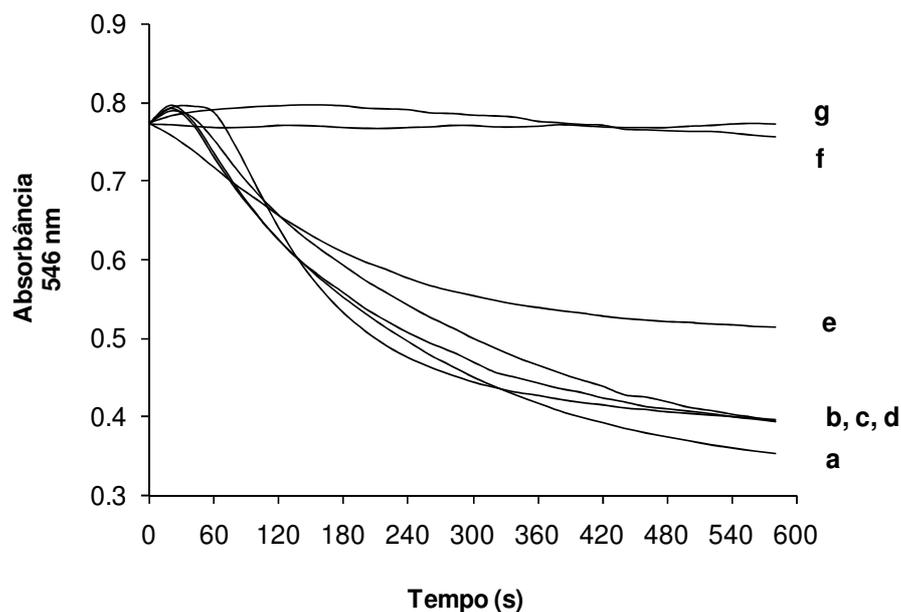


FIGURA 12: EFEITO DA EUPAFOLINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR CÁLCIO

FONTE: O autor (2009)

NOTA: O experimento foi realizado conforme descrito em Materiais e Métodos item 5.7. (a) Controle; (b) eupafolina $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (c) eupafolina $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (d) eupafolina $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (e) eupafolina $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (f) CsA; (g) EGTA. O sistema de reação foi constituído de: sacarose 250 mmol.L^{-1} , tampão HEPES 10 mmol.L^{-1} pH 7,2, suplementado com KH_2PO_4 $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$, CaCl_2 $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$, rotenona $6 \mu\text{mol.L}^{-1}$, succinato de potássio 3 mmol.L^{-1} , proteína mitocondrial $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$, EGTA 1 mmol.L^{-1} e CsA $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$. A eupafolina foi adicionada nas concentrações indicadas dois minutos antes da adição do substrato. O traçado representativo inicia-se após a adição do substrato. Os traçados são representativos de três experimentos independentes em triplicata. O inchamento é representado pela diminuição na absorbância.

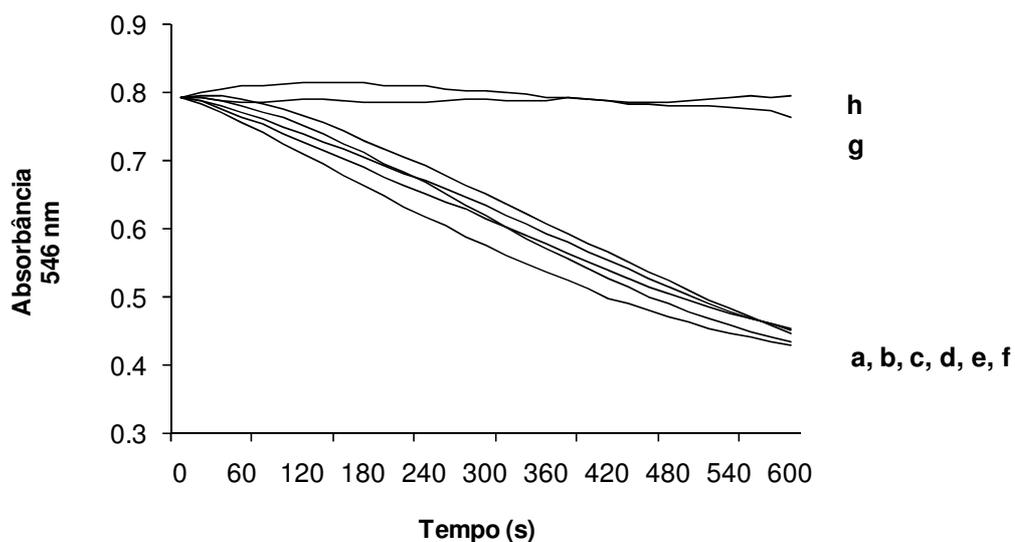


FIGURA 13: EFEITO DA HISPIDULINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR CÁLCIO

FONTE: O autor (2009)

NOTA: O experimento foi realizado conforme descrito em Materiais e Métodos item 5.7. (a) Controle; (b) hispidulina $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (c) hispidulina $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (d) hispidulina $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (e) hispidulina $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (f) CsA; (g) EGTA. O sistema de reação foi constituído de: sacarose 250 mmol.L^{-1} , tampão HEPES 10 mmol.L^{-1} pH 7,2, suplementado com KH_2PO_4 $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$, CaCl_2 $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$, rotenona $6 \mu\text{mol.L}^{-1}$, succinato de potássio 3 mmol.L^{-1} , proteína mitocondrial $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$, EGTA 1 mmol.L^{-1} , CsA $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$. A hispidulina foi adicionada dois minutos antes da adição do substrato. O traçado representativo inicia-se após a adição do substrato. Os traçados são representativos de três experimentos independentes em triplicata. O inchamento é representado pela diminuição na absorbância.

6.2. EXPERIMENTOS COM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10

6.2.1. Ensaios de viabilidade celular

Diversos estudos já documentaram a ação anti-tumoral de flavonóides em diversos tipos de tumores (LEE *et al.*, 2005b; MICHELS *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2005; HSU *et al.*, 2004). Neste trabalho nós testamos a influência da flavona, hispidulina, eupafolina, apigenina e luteolina sobre a viabilidade da linhagem B16-F10 no tempo de 24 h utilizando-se a metodologia do cristal violeta (KUENG *et al.*, 1989). A finalidade desse experimento é fazer uma comparação entre os efeitos dessas flavonas sobre a viabilidade celular e relacioná-los com suas estruturas químicas.

Na Tabela 3 estão demonstrados os efeitos das cinco flavonas sobre a viabilidade de células de melanoma murino. Entre as flavonas testadas, somente a hispidulina não foi citotóxica.

A flavona reduziu a viabilidade celular (50%) somente na dose de 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. A eupafolina diminuiu a viabilidade nas doses de 25 - 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ chegando a ~ 80% na maior dose. As flavonas apigenina e luteolina reduziram em ~ 40 e ~ 75% respectivamente, a viabilidade celular das células de melanoma murino no tempo de 24 h na dose de 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Cabe ressaltar que o efeito citotóxico máximo obtido com eupafolina e apigenina foi observado já na dose de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, tendo em vista que não existe diferença significativa entre as doses de 50, 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para essas flavonas. Com luteolina, não existe diferença entre os efeitos observados nas doses de 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Na presença do solvente das drogas (DMSO - 0,1%) não houve alteração na viabilidade das células quando comparado ao controle sem DMSO.

Eupafolina e luteolina, que possuem hidroxilas nas posições 3' e 4' formando uma anel catecol na sua estrutura, foram os compostos testados com maior efeito citotóxico. A eupafolina exerceu seu efeito máximo (80% de inibição) já na concentração de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e a luteolina com 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Os efeitos observados para esses dois compostos foram dependentes da concentração, contudo, no caso da apigenina, o efeito observado foi semelhante (~40%) nas doses de 50 - 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Concentração do flavonóide ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Células viáveis em relação ao controle (%)				
	Flavona	Hispidulina	Eupafolina	Apigenina	Luteolina
0	100	100	100	100	100
10	110 \pm 8	90 \pm 8,5	88 \pm 9	105 \pm 16	104 \pm 16
25	108 \pm 9	95 \pm 15	59 \pm 11*	98 \pm 11	78 \pm 17*
50	114 \pm 14	115 \pm 11	28 \pm 5*	73 \pm 7*	53 \pm 7*
100	90 \pm 13	117 \pm 13	26 \pm 3*	67 \pm 3*	28 \pm 7*
200	49 \pm 9*	97 \pm 16	19 \pm 4*	59 \pm 6*	26 \pm 11*

TABELA 3: EFEITO DE FLAVONAS SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Os experimentos foram realizados conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos item 5.10, com volume final de 200 μL em meio RPMI completo, no controle somente foi adicionado o meio acrescido de DMSO. Os flavonóides foram incubados nas doses indicadas por 24 h a 37°C. Os valores estão representados como percentagem em relação ao controle \pm DP de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. O volume de DMSO utilizado foi de 0,1% (v/v). * Valores com diferenças estatisticamente significativas do controle ($p < 0,05$).

A morte de 50% das células B16-F10 com a dose de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de luteolina foi inferior aos 75% encontrado por Benavente-Garcia *et al.* para a mesma linhagem celular (2005). Esses autores mediram a viabilidade celular através da metodologia do MTT, a qual se utiliza das desidrogenases mitocondriais para reduzir o MTT a formazan. A opção pela utilização da metodologia do cristal violeta nesse trabalho ocorreu porque eupafolina, hispidulina e flavona inibem enzimas da cadeia respiratória mitocondrial (DABAGUI-BARBOSA *et al.*, 2007; HERRERIAS *et al.*, 2008; VALDAMERI, 2008) e isso poderia interferir nos resultados obtidos. Além disso, já foi demonstrado que alguns flavonóides como luteolina e quercetina, podem reduzir o MTT na ausência de células (PENG *et al.*, 2005). Desta forma, a discrepância nos resultados pode ser decorrente das diferentes metodologias utilizadas.

Analisando os resultados obtidos a ordem crescente de toxicidade seria: hispidulina < flavona < apigenina < luteolina < eupafolina. Ao se relacionar a estrutura com a atividade, pode-se perceber que a presença das hidroxilas na posição 3', 4' está correlacionada com o aumento da citotoxicidade para este tipo celular, pois a luteolina e a eupafolina tiveram efeitos citotóxicos superiores ao da apigenina e hispidulina, suas correspondentes estruturais sem a hidroxila na posição 3'. Esses resultados estão de acordo com os relatados por Abe e cols. (2002) para a linhagem de melanoma murino B16-F10 que analisaram os efeitos citotóxicos de diferentes flavonóides. Estes autores determinaram a concentração inibitória necessária para promover morte celular de 50% das culturas (CI_{50}) e relataram que a presença dos grupos hidroxila em 3' e 4' nas flavonas estudadas (desmetoxicentauredidina, eupafolina e 6-

hidroxiluteolina) teria um importante papel na citotoxicidade destes compostos em células B16-F10. Benavente-Garcia *et al.* (2005) avaliaram o efeito de diferentes flavonóides sobre a viabilidade das linhagens B16-F10 e SK-Mel e relataram que a presença da dupla ligação em C2-C3, juntamente com o um anel catecol no anel B aumentam o efeito citotóxico nessas linhagens.

Casagrande *et al.* (2001) também relataram o maior efeito citotóxico da luteolina quando comparado a apigenina, pois a presença do grupamento hidroxila 3' na luteolina e ausente na apigenina seria importante para o bloqueio do ciclo celular em células de melanoma humano OCM - 1.

6.2.2. Efeito das flavonas sobre a proliferação de células B16-F10

Para avaliar o efeito anti-proliferativo e citotóxico das flavonas em tempos mais longos de tratamento e utilizando-se meio de cultivo contendo soro fetal bovino, realizaram-se experimentos de viabilidade das células de melanoma murino em 48 e 72 h. Na realização desses experimentos utilizou-se a dose de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ por não promover alterações na viabilidade celular com 24 h de tratamento.

A proliferação celular foi analisada através da metodologia do cristal violeta quantificando-se as células aderidas à placa. Como este é um método fotométrico, inicialmente foi realizada uma curva relacionando o número de células B16-F10 com a absorbância obtida após a coloração com o cristal violeta. Essa curva foi utilizada para determinação do número de células nos demais experimentos. Os efeitos das flavonas na dose de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ sobre a proliferação das células B16-F10 no tempo de 24, 48 e 72 h estão demonstrados na Figura 14.

A flavona não afetou o crescimento celular em nenhum dos tempos de tratamento. A hispidulina reduziu em 20% o crescimento celular em 48 h de tratamento, entretanto, com 72 h não afetou significativamente o número de células. O tratamento com $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de eupafolina reduziu o número de células após 48 e 72 h em ~ 55 e 30% respectivamente. Apigenina reduziu o número de células em 45% após 48 h e 30% após 72 h de tratamento. Luteolina foi a flavona que apresentou o efeito antiproliferativo mais intenso chegando a 70 e 65 % de redução do número de células com 48 e 72 h respectivamente. A intensidade do efeito antiproliferativo em ordem decrescente foi: luteolina > eupafolina > apigenina > hispidulina > flavona. Cabe salientar que luteolina e apigenina reduziram o número de células em relação ao controle com 48 h de tratamento, indicando que teria ocorrido morte celular e não somente um efeito antiproliferativo.

Ao relacionar a atividade antiproliferativa e a estrutura química das flavonas, pode-se observar que o grupamento 6-metoxil presente nas estruturas da hispidulina e eupafolina reduz o efeito antiproliferativo quando comparados seus efeitos aos das flavonas apigenina e luteolina. Além disso, a presença dashidroxilas em 3' e 4' aumenta o efeito antiproliferativo. Também pode-se observar a importância dos substituintes na estrutura básica da flavona para o efeito inibitório do crescimento de células de melanoma murino, pois a flavona não apresentou efeito diferente do controle em nenhum dos tempos testados.

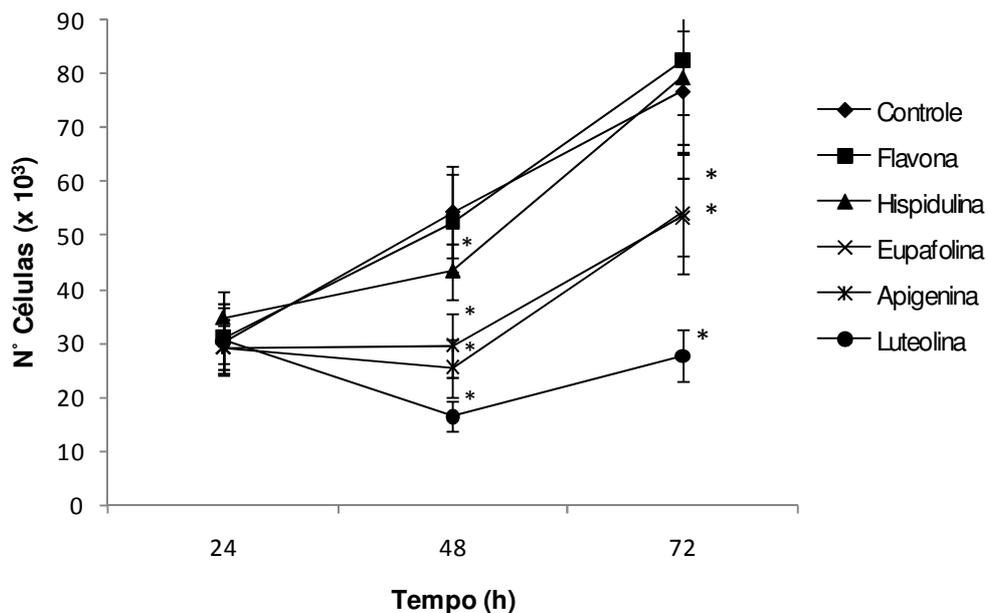


FIGURA 14: EFEITO DAS FLAVONAS SOBRE A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS B16-F10
 FONTE: O autor (2009).

NOTA: A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio do cristal violeta como descrito em Materiais e Métodos item 3.8. nos tempos de 24, 48 e 72 h na presença de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ das flavonas indicadas. Os resultados são média \pm desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata. * Valores com diferenças estatisticamente significativas do controle ($p < 0,05$).

6.2.3 Efeitos de flavonóides sobre a morfologia das células de melanoma murino B16-F10

A homeostase tecidual é mantida através de um rigoroso controle entre os processos de proliferação e morte celular. A morte celular pode ser desencadeada, entre outros mecanismos, por dois processos distintos: a necrose e a apoptose. A necrose pode ser desencadeada através de danos mecânicos ou químicos (BRAS *et al.*, 2005). A apoptose é um processo de “morte celular programada” estreitamente regulado fisiologicamente, e qualquer alteração no balanço entre a morte e a proliferação pode resultar em diversos distúrbios, entre eles, o câncer (JACOBSON *et al.*, 1997). A escolha da via de morte ocorre, pelo menos em parte, pela abundância dos estoques intracelulares de energia. Enquanto a apoptose necessita de uma quantidade mínima de energia, a necrose é geralmente acompanhada de uma depleção total de ATP (NICOTERA *et al.*, 1998).

Os diferentes tipos de morte celular são definidos por critérios morfológicos bem definidos. A apoptose é um tipo de morte celular marcado por redução do volume celular (picnose), condensação da cromatina, fragmentação do núcleo (cariorexis), pouca ou nenhuma modificação ultraestrutural das organelas citoplasmáticas, “blebbing” na membrana plasmática e manutenção de uma membrana plasmática intacta até as fases tardias do processo (KROEMER *et al.*, 2005). Além disso, ocorre a formação de corpos apoptóticos contendo organelas envoltas em membranas biológicas. Na necrose ocorre um aumento do volume citoplasmático que leva a ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo intracelular (KROEMER *et al.*, 2007).

A morte celular por apoptose pode ser desencadeada através de duas vias. A primeira via é mediada por receptores de morte presentes na membrana plasmática como o receptor TNF ou Fas (NAGATA, 1997) e a outra via é a chamada via mitocondrial, por esse último mecanismo ocorre liberação de citocromo c da mitocôndria para o citoplasma (KLUCK et al., 1997).

Os resultados obtidos nos experimentos de viabilidade e proliferação das células de melanoma murino indicam que as flavonas promovem morte celular. Para esclarecer os mecanismos pelos quais os flavonóides testados promoveram citotoxicidade, foram realizadas análises morfológicas das células de melanoma murino tratadas com as flavonas por 24 h.

6.2.3.1 Avaliação dos efeitos de flavonóides sobre a morfologia das células B16-F10 através da técnica de microscopia eletrônica de varredura

As alterações na morfologia das células B16-F10 promovidas pelas flavonas ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em 24h de tratamento estão demonstradas nas Figuras 15 e 16. Nas células do controle percebe-se grande quantidade de células aderidas ao substrato através dos filamentos de adesão (FIGURA 15 - 1A E 1B). Alterações na adesividade das células ao substrato foram visualizadas nos tratamentos com flavona (FIGURA 15 - 2B), eupafolina, apigenina e luteolina (FIGURA 16 - 4B, 5B e 6B). Observa-se uma expressiva diminuição no volume das células tratadas com eupafolina e luteolina (Figura 16- 4A, 5A, 6 A). Além disso, nas células tratadas com eupafolina percebem-se projeções citoplasmáticas compatíveis com aquelas visualizadas nos processos apoptóticos (FIGURA 16 - 4 A e B).

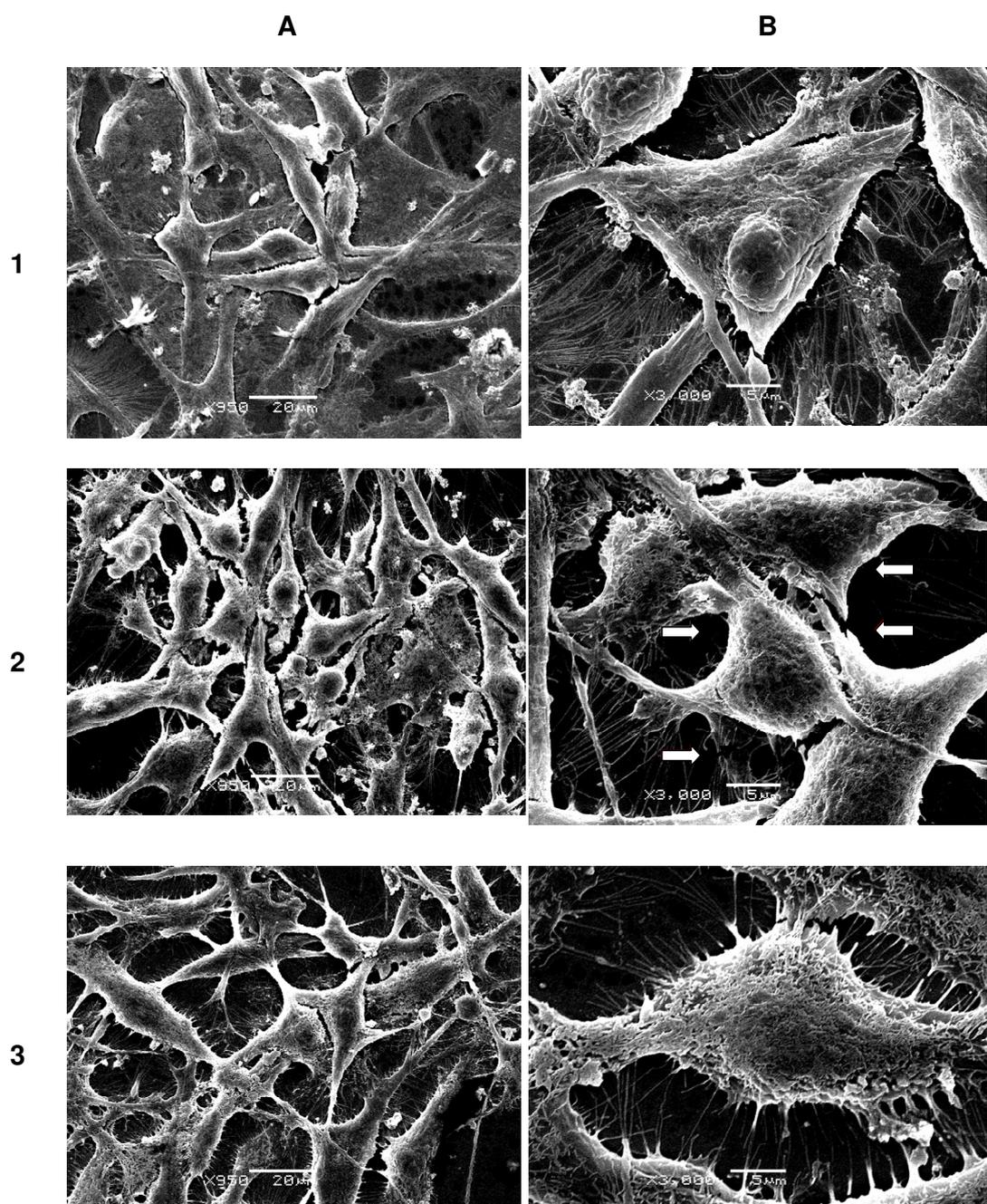


FIGURA 15: EFEITO DE FLAVONÓIDES SOBRE A MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16-F10 UTILIZANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.

FONTE: O autor (2009)

NOTA: As células foram tratadas por 24 horas com $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ das flavonas testadas: 1 – Controle com DMSO; 2 – Flavona; 3 - Hispidulina. As amostras foram observadas em aumento de A – 950 x e B – 3000 x. (\Rightarrow) alteração na adesividade ao substrato

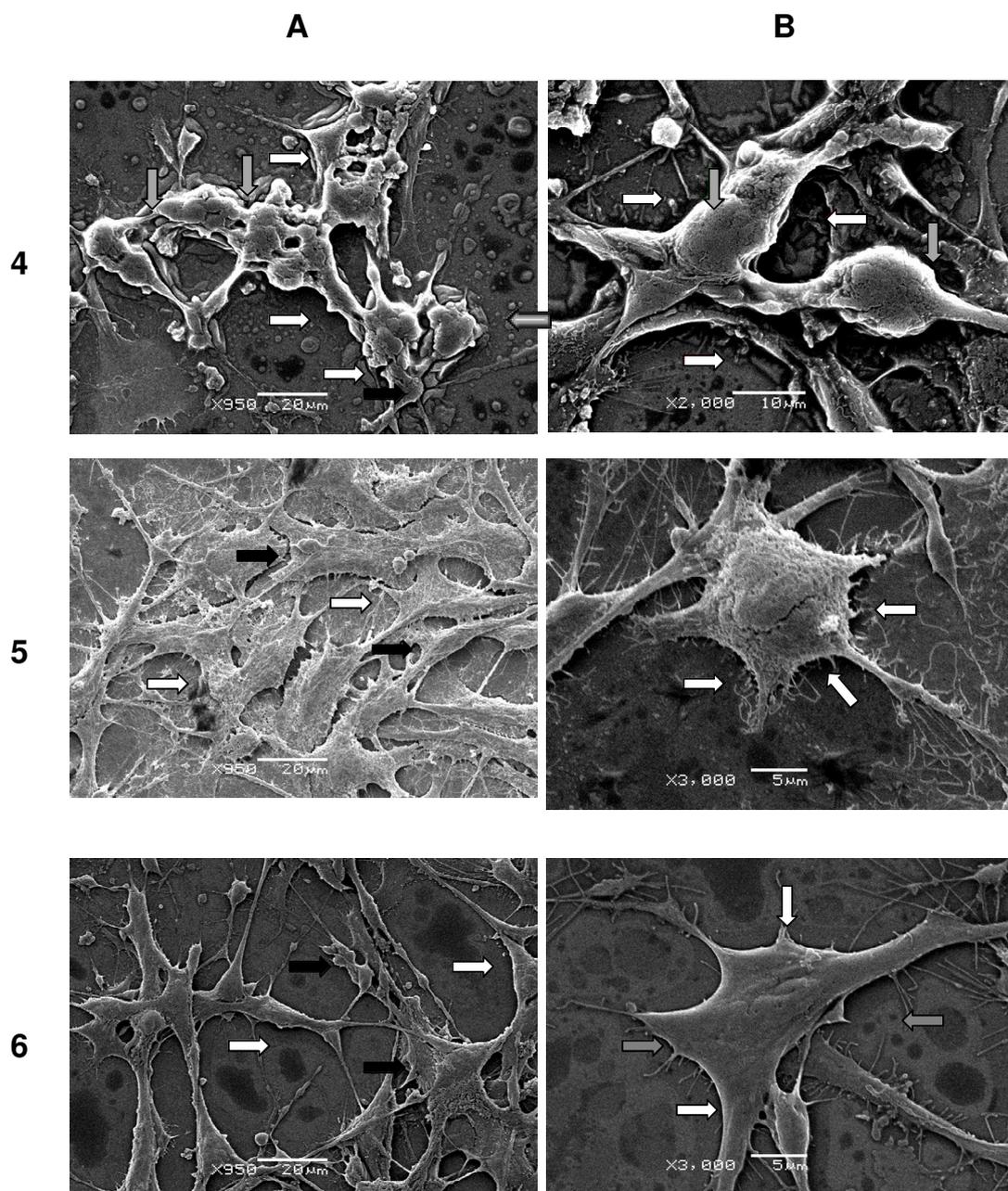


FIGURA 16: EFEITO DE FLAVONÓIDES SOBRE A MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16 - F10 UTILIZANDO-SE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.

FONTE: O autor (2009)

NOTA: As células foram tratadas por 24 horas com $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ das flavonas testados: 4 – Eupafolina; 5 – Apigenina; 6 - Luteolina. As amostras foram observadas em aumento de A – 950 x e B – 3000 x. (➡) perda do volume celular (⇨) alteração na adesividade ao substrato (➡) alterações morfológicas.

6.2.3.2 Avaliação dos efeitos de flavonóides sobre a morfologia das células

B16-F10 através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão

As micrografias obtidas, no microscópio eletrônico de transmissão, a partir das células B16-F10 tratadas com as flavonas estão representadas nas Figuras 17, 18, 19 e 20. As células do controle apresentam grande quantidade de mitocôndrias intactas, retículo endoplasmático rugoso e envoltório nuclear bem delimitados, além de eucromatina e nucléolo evidentes. Observa-se, também, ausência de projeções citoplasmáticas (FIGURA 17, 1A e 1B). O tratamento com flavona induziu a formação de vacúolos citoplasmáticos contendo membranas biológicas em seu interior e projeções citoplasmáticas, sugerindo a formação de corpos apoptóticos (FIGURA 17, 2A e 2B). Hispidulina induziu a formação de grande quantidade de vacúolos no citoplasma das células B16-F10 (FIGURA 17, 3A e 3B). Na Figura 18, micrografias 4A e 4B, são evidentes as alterações na membrana celular, a formação de projeções citoplasmáticas e corpos apoptóticos promovidos pelo tratamento com eupafolina. Cabe ressaltar na micrografia 4B a presença de membranas biológicas envolvendo organelas no citoplasma desta célula. A apigenina induziu a formação de grande quantidade de vacúolos citoplasmáticos (FIGURA 18 - 5A e 5B) e vacúolos contendo material eletrodense semelhante às mitocôndrias observadas no controle (FIGURA 18 - 5B). Nas micrografias relativas ao tratamento com luteolina, percebem-se alterações da morfologia celular (FIGURA 18 - 6A) e a formação de uma projeção citoplasmática contendo membranas biológicas em seu interior (FIGURA 18 - 6B).

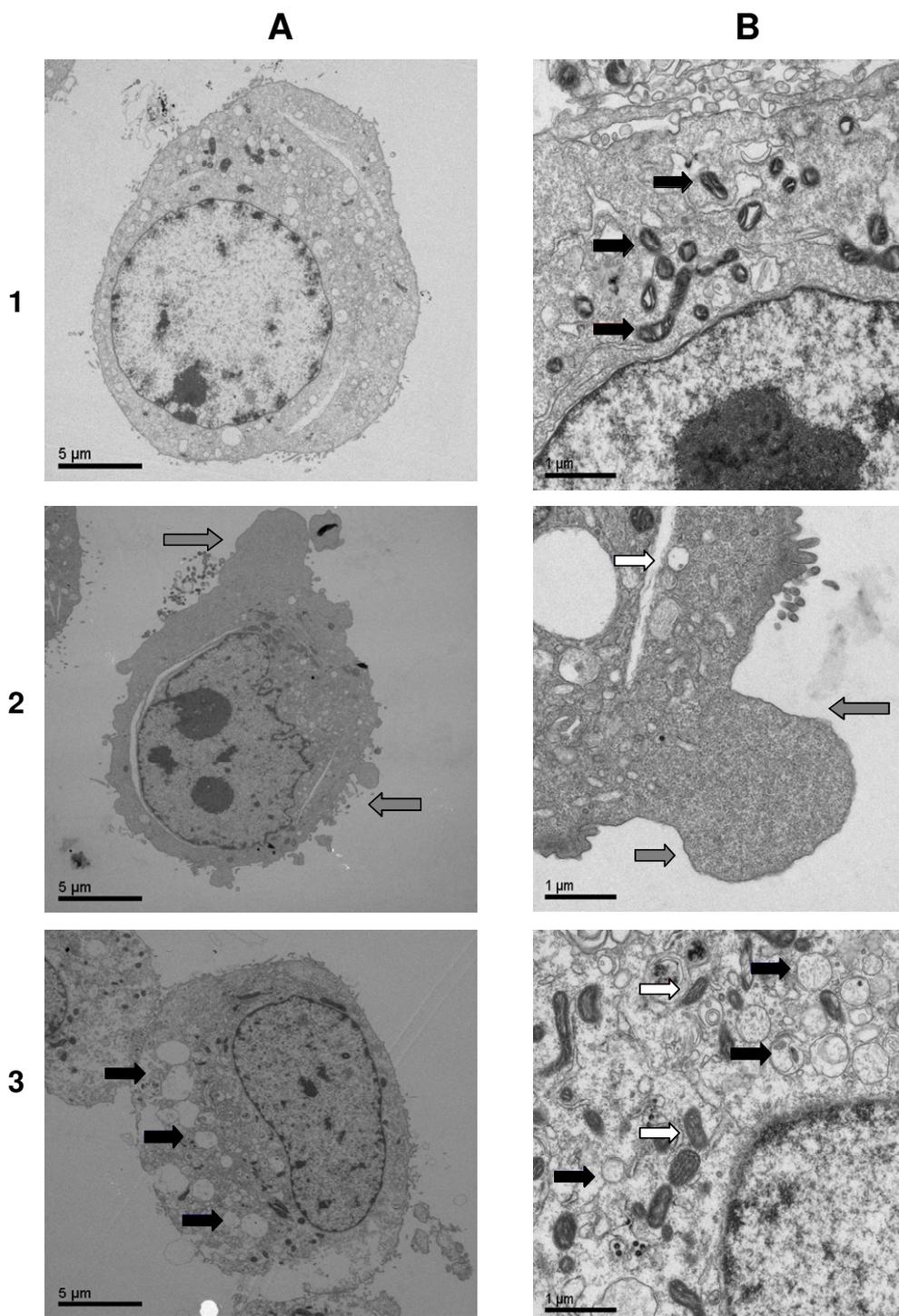


FIGURA 17: EFEITO DE FLAVONÓIDES SOBRE A MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16 - F10 UTILIZANDO-SE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.

FONTE: O autor (2009)

NOTA: As células foram tratadas por 24 horas com $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dos compostos testados: 1 – Controle; 2 – Flavona; 3 - Hispidulina. As amostras foram observadas em aumento de A – 5000 x e B – 25000 x. (➡) vacúolos citoplasmáticos (⇔) mitocôndrias (⇨) projeções citoplasmáticas.

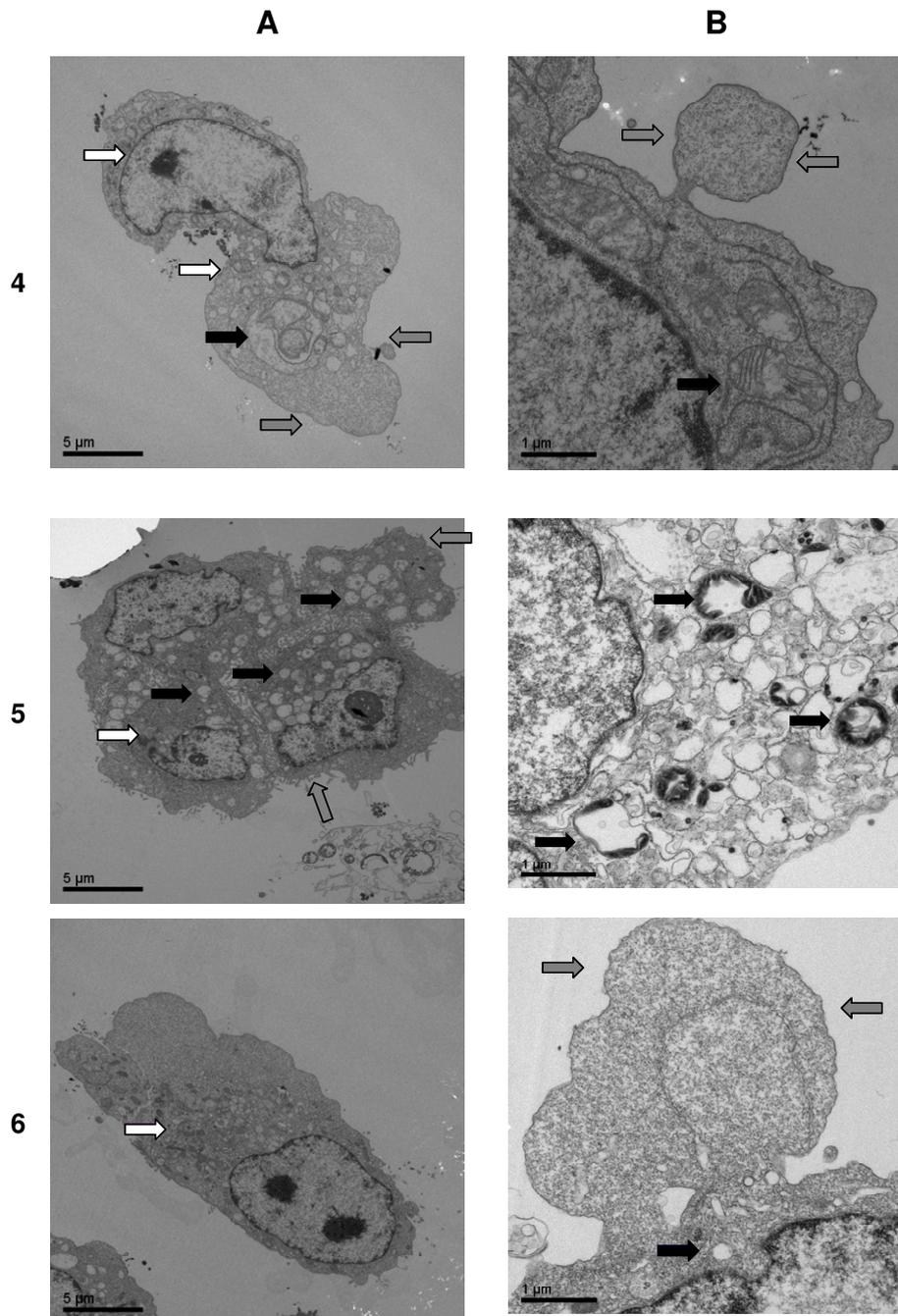


FIGURA 18: EFEITO DE FLAVONÓIDES SOBRE A MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16 - F10 UTILIZANDO-SE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.

FONTE: O autor (2009)

NOTA: As células foram tratadas por 24 horas com $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dos compostos testados: 4 – Eupafolina; 5 – Apigenina; 6 - Luteolina. As amostras foram observadas em aumento de A – 5000 x e B – 25000 x. (➡) vacúolos citoplasmáticos (⇨) alterações morfológicas (⇨) projeções citoplasmáticas.

A eupafolina apresentou alterações morfológicas significativas (Figura 19 - A e B) sendo verificadas a presença de vacúolos contendo material biológico em seu interior.

Na Figura 20 - A-E, estão representadas micrografias nos aumentos de 5000 e 25000 x dos tratamentos realizados com as cinco flavonas onde podemos visualizar a heterocromatização nuclear em diversas intensidades. Esta heterocromatização é uma massa finamente granular de textura uniforme, que pode se concentrar na superfície interna do envelope nuclear e é uma evidência morfológica inequívoca do princípio da apoptose (KERR *et al.*, 1995).

As alterações morfológicas encontradas sugerem que as flavonas induzem morte celular por apoptose e alteram a adesividade das células de melanoma murino. Para confirmar a hipótese de que a morte celular estaria ocorrendo através do mecanismo de apoptose foram realizadas análises de liberação de citocromo *c*, um marcador bioquímico desse processo.

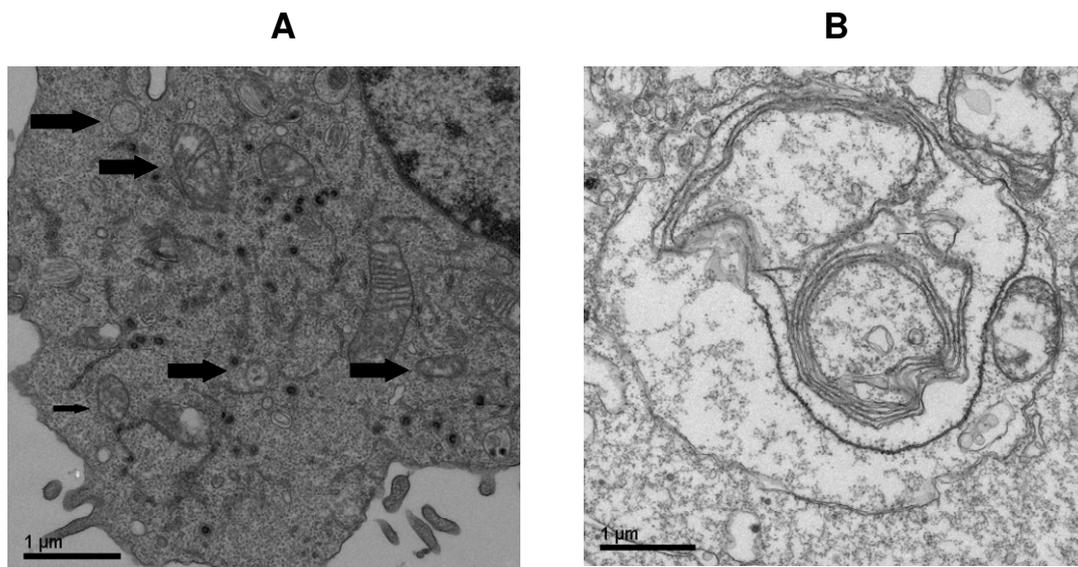


FIGURA 19: EFEITO DA EUPAFOLINA SOBRE A MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16 – F10 UTILIZANDO-SE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Micrografias das células tratadas com $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de eupafolina no tempo de 24 horas no aumento de 25000 x. Amostras analisadas utilizando-se microscópio eletrônico de transmissão. **A** - As setas indicam a presença de vacúolos citoplasmáticos com membranas biológicas em seu interior. **B** - Grande vacúolo citoplasmático com grande quantidade de membranas em seu interior.

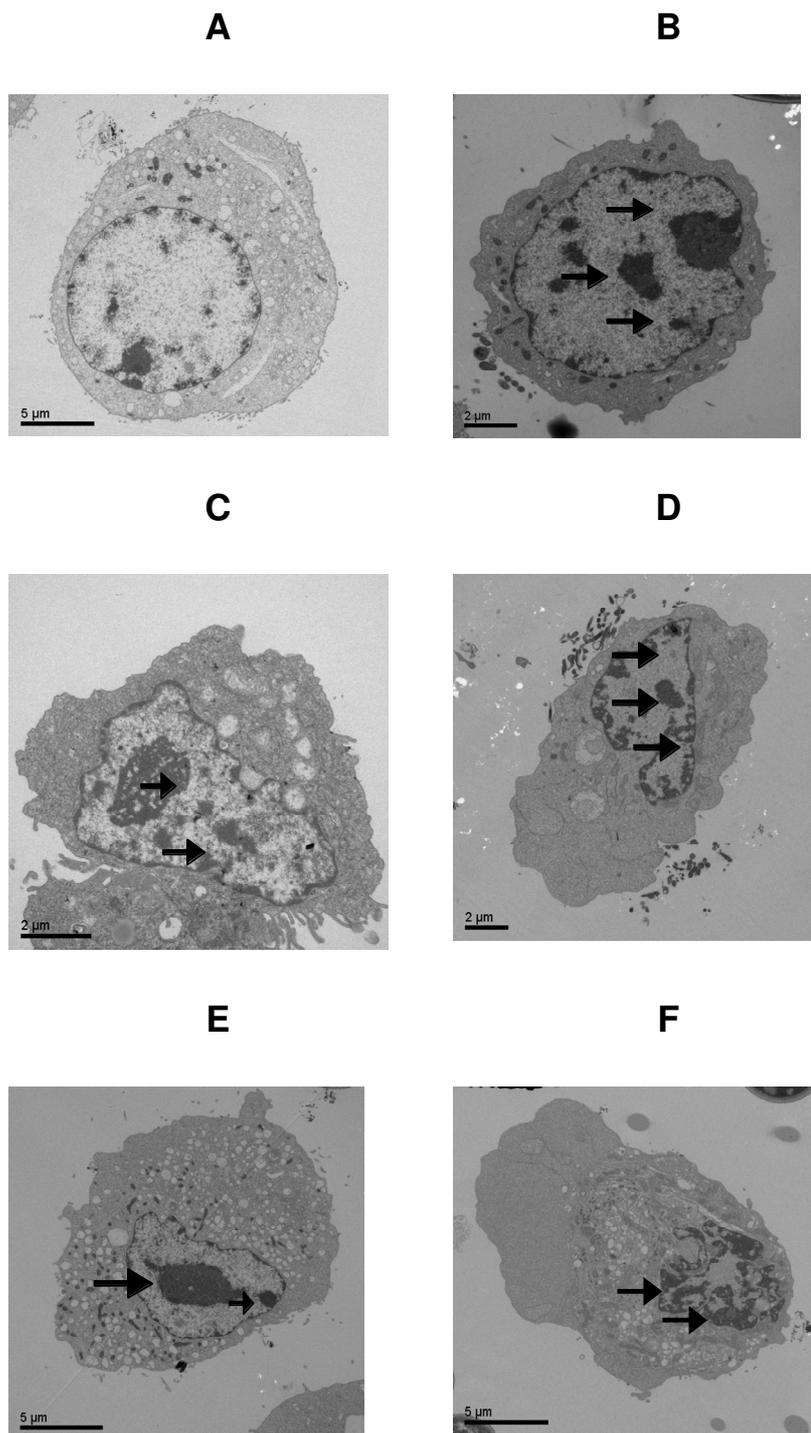


FIGURA 20: EFEITO DE FLAVONÓIDES SOBRE A MORFOLOGIA DE CÉLULAS B16 – F10 UTILIZANDO-SE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO. FONTE: O autor (2009)

NOTA: Micrografias das células tratadas com $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ das flavonas: A – Controle (5000x) ; B – Flavona (10000x); C – Hispidulina (12000x); D – Eupafolina (8000x) ; E – Apigenina (6000x) e F – Luteolina (6000x) no tempo de 24 horas. As setas indicam heterocromatização nuclear.

6.2.4. Efeitos das flavonas sobre a liberação de citocromo c

Compostos exógenos, entre eles, os flavonóides podem induzir as vias de morte celular por apoptose. Diversos estudos demonstraram a capacidade de flavonas, em afetar a apoptose em células tumorais. Os resultados de redução da viabilidade e as alterações morfológicas visualizadas na microscopia eletrônica sugerem que alguns dos flavonóides estudados possam induzir a morte celular por apoptose. Para confirmar essa hipótese, realizaram-se experimentos de liberação de citocromo c em células B16-F10, procurando esclarecer por qual mecanismo as flavonas estariam induzindo morte celular. Os efeitos do tratamento com 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ das flavonas por 24 h sobre a liberação de citocromo c estão demonstrados na Figura 21. Flavona e hispidulina não alteraram a liberação de citocromo c quando comparadas com o controle. Eupafolina, apigenina e luteolina estimularam a liberação de citocromo c em 4,5, 4 e 3 vezes, respectivamente quando comparadas com o controle. O flavonol quercetina foi utilizado nessa análise como um controle positivo de apoptose em células B16-F10 (ZHANG et al., 2005). Estes resultados, conjuntamente com as alterações morfológicas de condensação citoplasmática, heterocromatização nuclear e formação de projeções na membrana citoplasmática, indicam que eupafolina, apigenina e luteolina induzem a morte de células de melanoma murino através do processo de apoptose nas condições experimentais avaliadas.

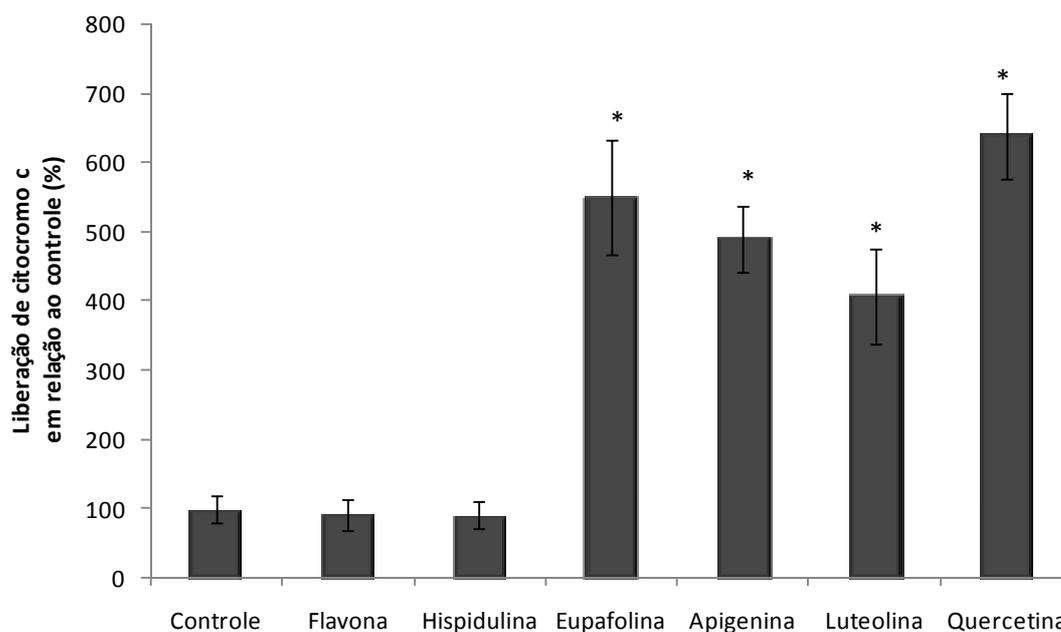


FIGURA 21: EFEITO DAS FLAVONAS SOBRE A LIBERAÇÃO DE CITOCROMO C EM CÉLULAS B16-F10
FONTE : O autor (2009)

NOTA: As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.14). A liberação de citocromo *c* foi avaliada espectrofotometricamente a 414 nm, após 24 h hora de tratamento com as flavonas ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Controle 100% corresponde a $3,9 \pm 0,8 \text{ nmol de citocromo } c \text{ liberado. min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína. Os resultados representam a média \pm DP de cinco experimentos em triplicata. *Valores com diferenças estatisticamente significativas do controle ($p < 0,05$).

6.2.5. Efeitos das flavonas sobre a atividade de enzimas antioxidantes

Os oxidantes são gerados como subprodutos do metabolismo aeróbio, e os organismos, de procariotos à mamíferos, evoluíram com um elaborado e complexo mecanismo de defesa antioxidante para conferir proteção contra danos oxidativos. Compostos que inibam a atividade das enzimas antioxidantes podem reduzir a capacidade das células de se protegerem contra danos oxidativos e induzir a morte celular.

Alguns flavonóides, especialmente os que contêm um anel catecol, como a eupafolina, podem sofrer autooxidação e gerar espécies reativas de oxigênio (HODNICK *et al.*, 1987; HERRERIAS *et al.*, 2008) e, desta forma, produzir efeitos citotóxicos e induzir a apoptose de forma dependente da concentração (ERLUND, 2004). A geração de espécies reativas também podem alterar o padrão de expressão e a atividade das enzimas antioxidantes. Como são conhecidos os efeitos inibitórios da eupafolina e hispidulina sobre os complexos enzimáticos da cadeia respiratória os quais poderiam aumentar a geração de espécies reativas, tornou-se importante a avaliação dos efeitos das flavonas sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e de outras enzimas antioxidantes.

6.2.5.1 Superóxido Dismutase (SOD)

As superóxido dismutases são metaloproteínas que promovem a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (MRUK *et al.*, 2002). Existem em diferentes isoformas, diferindo na natureza do metal no centro ativo e na sua constituição de aminoácidos, bem como, na quantidade de subunidades e cofatores. Em humanos existem três isoformas de SOD: a CuZnSOD citosólica; a MnSOD-mitocondrial e a SOD-extracelular (LANDIS & TOWER, 2005).

Neste estudo foi avaliado o efeito das flavonas ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) sobre a atividade total de superóxido dismutase após o tratamento por 24 h (FIGURA 23). Hispidulina e apigenina estimularam a atividade de SOD total em aproximadamente 40%. As demais flavonas testadas não alteraram a atividade dessa enzima. Cabe ressaltar que a hispidulina e apigenina foram as flavonas que apresentaram o menor efeito sobre a viabilidade das células B16-F10, sugerindo uma correlação entre a indução de sistemas de defesa antioxidante com a maior resposta de sobrevivência celular.

Du *et al.* (2007) também demonstraram uma relação entre um estímulo da atividade de enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) e uma maior proteção contra apoptose induzida por stress oxidativo em células tratadas com catequina. Leung *et al.* (2006) verificaram que luteolina ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) induz a apoptose de células de carcinoma humano de pulmão, acompanhada por uma ativação das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase, de maneira dependente do tempo. Porém, os autores enfatizaram que esse aumento na atividade ocorreu somente até 16 h de tratamento, com 24 h, houve decréscimo da atividade,

diferentemente dos resultados com 24 h de tratamento, que demonstraram que a luteolina não estimulou a atividade de SOD.

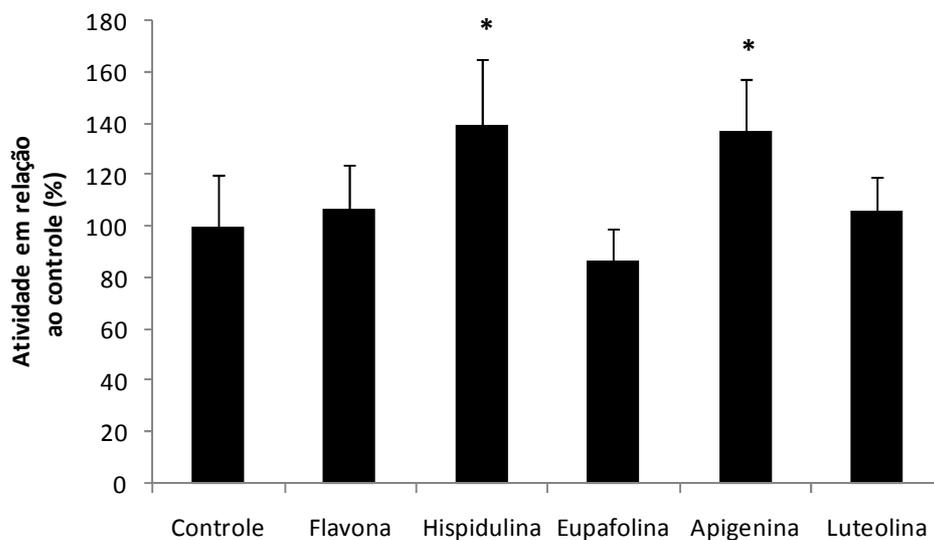


FIGURA 22: EFEITO DE FLAVONAS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE TOTAL EM CÉLULAS B16-F10

FONTE: O autor (2009)

NOTA: As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos item 5.15.1. As células B16-F10 foram cultivadas por 24 h em presença de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dos flavonóides testados. Controle 100% corresponde a 0,35 U/mg de proteína. Os valores são médias de 4 experimentos realizados em duplicata. * Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

6.2.5.2. Catalase

A catalase promove a decomposição do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio (AEBI, 1984). O H_2O_2 pode ser produzido através de diversas oxidases como as monoamino oxidases ou através da dismutação do radical superóxido pelas superóxido dismutases (MCCORD & FRIDOVICH, 1969; HALLIWELL & CROSS, 1994).

Como se verificou um aumento da SOD total após o tratamento com algumas flavonas, tornou-se importante avaliar também os efeitos de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ das flavonas sobre a atividade enzimática da catalase em 24 h de tratamento. Esses efeitos estão demonstrados na Figura 24. Hispidulina, eupafolina, apigenina e luteolina inibiram, em 25, 45, 40 e 35%, respectivamente, a atividade da catalase quando comparadas com o controle.

Dos cinco compostos testados, apenas a flavona não alterou a atividade enzimática da catalase, indicando a importância dos substituintes no anel básico da flavona para esse efeito biológico.

O aumento da atividade de SOD promovido pela hispidulina e apigenina, conjuntamente com a inibição da catalase, leva a um aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio nas células tratadas com essas flavonas. Cabe ressaltar que a eupafolina possui a capacidade de se autooxidar e gerar ERO (HERRERIAS *et al.*, 2008) e hispidulina e eupafolina inibem atividades enzimáticas da cadeia respiratória mitocondrial podendo promover aumento de processos oxidativos e geração de danos celulares .

Considerando os resultados anteriores relativos as enzimas SOD e catalase e um possível aumento de peróxido de hidrogênio no ambiente

intracelular após o tratamento com as flavonas, avaliamos a atividade enzimática da glutathione peroxidase.

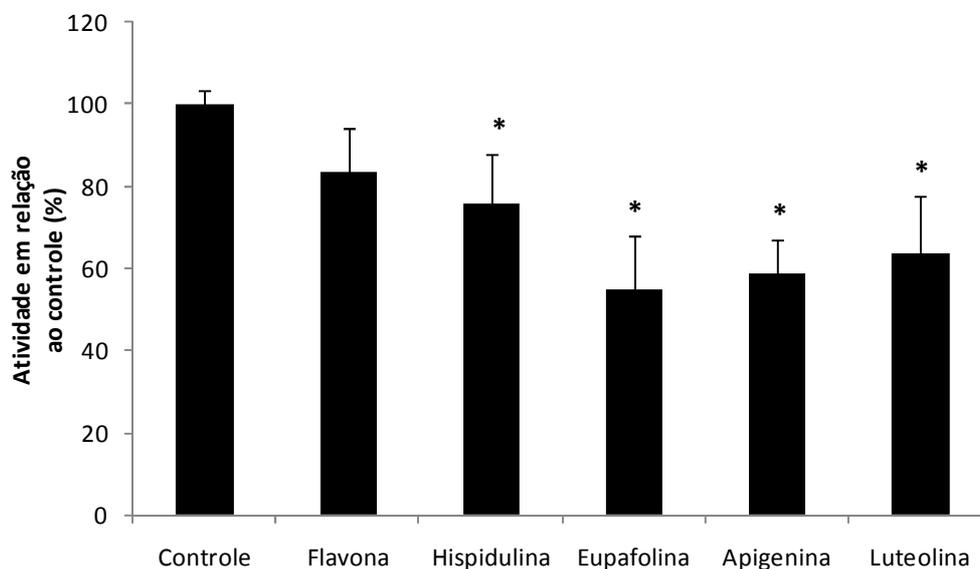


FIGURA 23: EFEITO DE FLAVONAS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE EM CÉLULAS B16-F10

FONTE: O autor (2009).

NOTA: As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos item 5.15.2. As células B16-F10 foram cultivadas por 24 h em presença de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dos flavonóides testados. Controle 100% corresponde a $12.2 \pm 0,4 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ consumido. min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína. Os valores são médias de 4 experimentos realizados em duplicata. * Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

6.2.5.3 Glutathione peroxidase

As enzimas glutathione peroxidase 1 e 4 pertencem à classe das enzimas ligadas ao GSH. Estas enzimas catalisam a redução do peróxido de hidrogênio e de outros hidroperóxidos lipídicos, utilizando GSH como um doador de elétrons (OTT *et al.*, 2007). Gpx1 é a maior isoforma e está localizada predominantemente no citosol, mas uma pequena fração também está presente na matriz mitocondrial. Já a Gpx 4 é uma fração associada à membrana localizada na mitocôndria (PUSHPA-REKHA *et al.*, 1995). Desta forma, a glutathione peroxidase reduz os níveis de peróxido consumindo GSH no processo e diminuindo a relação GSH/GSSG, a qual é utilizada como um importante parâmetro de análise do estado redox da célula.

Os efeitos das flavonas sobre a glutathione peroxidase estão demonstrados na Figura 25. Nenhuma das flavonas testadas alterou a atividade da glutathione peroxidase no tempo e concentrações testadas quando comparadas com o controle.

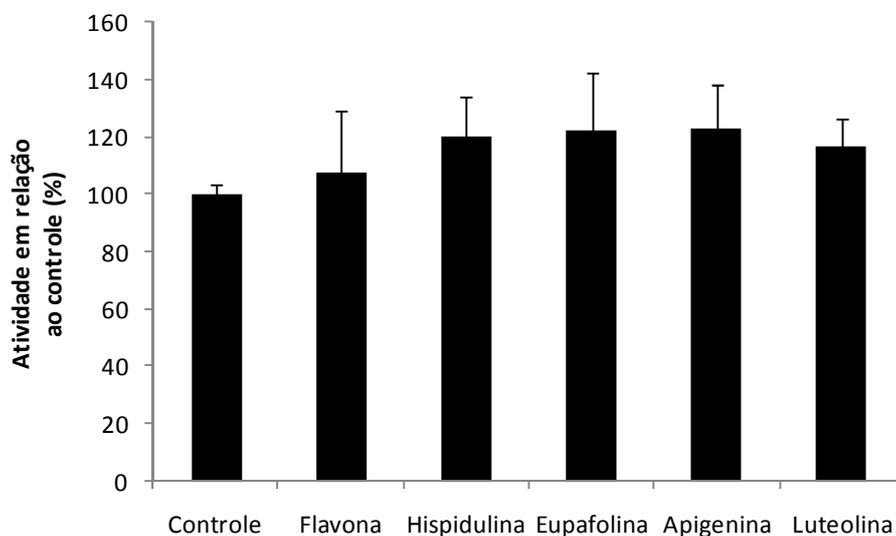


FIGURA 24: EFEITO DE FLAVONAS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA PEROXIDASE

FONTE: O Autor (2009)

NOTA: Experimento realizado conforme protocolo descrito em Materiais e Métodos. As células B16-F10 foram cultivadas por 24 h em presença de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dos flavonóides testados. Controle 100% corresponde a $131,7 \pm 5 \text{ pmol NADPH consumido. min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína. Os valores são médias de 4 experimentos realizados em duplicata. * Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

6.2.5.4 Glutathiona redutase

A glutathiona redutase é a enzima responsável pela redução de GSSG a GSH. Essa enzima é importante para a manutenção dos níveis de GSH necessários para a atividade da glutathiona peroxidase e os efeitos das flavonas sobre essa enzima estão demonstrados na Figura 26.

Somente apigenina e luteolina inibiram a atividade da glutathiona redutase em 20 e 30%, respectivamente. Hispidulina e eupafolina não afetaram significativamente este parâmetro.

Quando comparadas as flavonas com e sem o grupamento metoxil, pode-se observar que aquelas que não contém o grupamento 6-metoxil (apigenina e luteolina) são as responsáveis pelo efeito inibitório sobre esta enzima, indicando que a presença deste grupamento diminui a capacidade das flavonas em alterar a atividade dessa enzima.

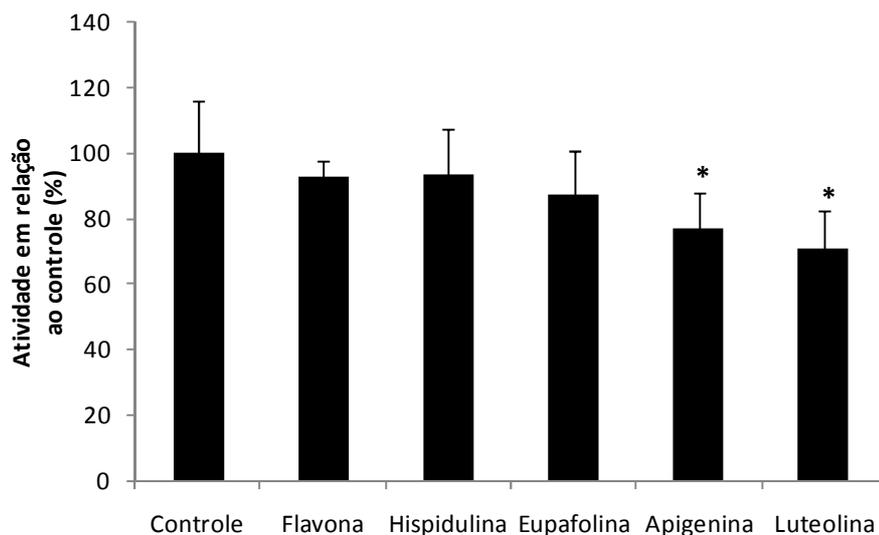


FIGURA 25: EFEITO DE FLAVONAS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA REDUTASE

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Experimento realizado conforme protocolo descrito em Materiais e Métodos. As células B16-F10 foram cultivadas por 24 h em presença de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dos flavonóides testados. Controle 100% corresponde a $18,2 \pm 3 \text{ pmols NADPH consumido. min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína. Os valores são médias de 4 experimentos realizados em duplicata*. Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

6.3. Experimentos com melanócitos normais de camundongo (Melan-A)

Os compostos ideais para o tratamento do câncer seriam aqueles capazes de induzir apoptose seletiva em células tumorais e que não afetassem expressivamente células normais (MUKHERJEE et al., 2001). Um dos objetivos desse trabalho foi verificar se as flavonas promoveriam efeitos citotóxicos distintos em células normais e tumorais. Desta forma, realizaram-se experimentos de viabilidade com melanócitos normais de camundongo (Melan-A) tendo em vista os efeitos citotóxicos sobre células de melanoma murino e a possibilidade das flavonas poderem ser utilizadas futuramente como adjuvantes ou até mesmo isoladamente no tratamento do melanoma. .

Os efeitos das flavonas na viabilidade das células Melan-A estão demonstrados na Tabela 4. Flavona, hispidulina e apigenina não afetaram a viabilidade celular de maneira significativa em nenhuma das doses testadas (10 - 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Eupafolina reduziu a viabilidade das células Melan-A em ~ 70 e ~ 90% nas doses de 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. Uma redução de 40% das células viáveis com luteolina foi obtida já na dose de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e com 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ a luteolina reduziu a viabilidade em 70 e 75%, respectivamente.

Células viáveis em relação ao controle (%)					
Concentração do flavonóide ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Flavona	Hispidulina	Eupafolina	Apigenina	Luteolina
0	100	100	100	100	100
10	104 \pm 15	124 \pm 23	106 \pm 11	112 \pm 27	85 \pm 18
25	101 \pm 13	137 \pm 31	110 \pm 15	92 \pm 19	89 \pm 16
50	101 \pm 13	138 \pm 32	108 \pm 20	101 \pm 17	60 \pm 12*
100	94 \pm 13	126 \pm 21	32 \pm 1*	98 \pm 20	24 \pm 4*
200	103 \pm 11*	97 \pm 21	7 \pm 2*	108 \pm 17	30 \pm 4*

TABELA 4: EFEITO DE FLAVONAS SOBRE A VIABILIDADE DE MELANÓCITOS NORMAIS DE CAMUNDONGO (MELAN-A)

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Os experimentos foram realizados conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos item 5.10, com volume final de 200 μL em meio RPMI completo, no controle somente foi adicionado o meio acrescido de DMSO. Os flavonóides foram incubados nas doses indicadas por 24h a 37°C. Os valores estão representados como percentagem em relação ao controle \pm DP de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. O volume de DMSO utilizado foi de 0,1% (v/v). *Valores com diferenças estatisticamente significativas do controle ($p < 0,05$).

Semelhante ao obtido com células tumorais, as flavonas mais citotóxicas foram aquelas contendo os grupamentos hidroxil em 3', 4' (anel catecol).

Analisando os resultados conjuntamente pode-se perceber que os efeitos citotóxicos das flavonas foram em geral maiores nas células tumorais que nas células normais (Tabela 5). Flavona e apigenina, que tinham demonstrado efeito citotóxico nas células B16-F10 não afetaram a viabilidade das células normais. Nas células Melan-A a eupafolina foi citotóxica somente a partir da dose de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em comparação, nas células tumorais esse efeito foi evidenciado a partir de uma dose 4 vezes menor. A luteolina também se demonstrou citotóxica somente a partir da dose de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, sendo que nas células tumorais a redução da viabilidade foi obtida já na dose de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Benavente e Garcia (2005) também relataram uma maior sensibilidade das células B16-F10 aos flavonóides (baicaleína, miricetina, quercetina e luteolina) testados quando comparado com os efeitos sobre as células Melan-A. Outros autores também evidenciaram um efeito seletivo de flavonóides sobre célula tumorais quando comparado com células normais. Son *et al.* (2004) demonstraram que o flavonol quercetina promovia inibição seletiva do crescimento de células hepáticas tumorais mas não alterava o crescimento de células normais hepáticas. Outro flavonóide que demonstrou atividade seletiva foi a apigenina. Essa flavona, na concentração de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$, inibiu o crescimento de células de adenocarcinoma prostático humano e na mesma dose não afetou células epiteliais prostáticas normais (GUPTA *et al.*, 2001).

Redução de viabilidade em relação ao controle (%)										
Concentração flavonas ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Flavona		Hispidulina		Eupafolina		Apigenina		Luteolina	
	B16-F10	Melan-A	B16-F10	Melan-A	B16-F10	Melan-A	B16-F10	Melan-A	B16-F10	Melan-A
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	40	-	-	-	20	-
50	-	-	-	-	70	-	25	-	50	40
100	-	-	-	-	75	70	35	-	70	75
200	50	-	-	-	80	90	40	-	75	70

TABELA 5: EFEITOS DE FLAVONAS SOBRE CÉLULAS TUMORAIS (B16-F10) E CÉLULAS NORMAIS DE CAMUNDONGO
 FONTE: O autor (2009)

NOTA: Os experimentos foram realizados conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos item 5.10, com volume final de 200 μL em meio RPMI completo, no controle somente foi adicionado o meio acrescido de DMSO. Os flavonóides foram incubados nas doses indicadas por 24h a 37°C. Os valores estão representados como percentagem em relação ao controle (0%) da redução da viabilidade.

7. DISCUSSÃO FINAL

O melanoma metastático é uma doença com alto índice de mortalidade para a qual, ainda não existem drogas eficazes para o tratamento. As flavonas possuem importantes efeitos citotóxicos já relatados em diversas linhagens celulares (MICHELS *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2005a; LEUNG *et al.*, 2006; SHUKLA & GUPTA, 2008), mas seus mecanismos moleculares variam dependentemente da linhagem celular e do flavonóide. Alguns autores já demonstraram que a citotoxicidade dos flavonóides pode ser decorrente de seus efeitos sobre a bioenergética mitocondrial (LEE *et al.*, 2005; DORTA *et al.*, 2005; HODNICK *et al.*, 1987). Desta forma, os experimentos mitocondriais realizados nesse trabalho tiveram como objetivo buscar uma relação entre a citotoxicidade das flavonas e seus efeitos sobre o metabolismo mitocondrial.

Com a determinação da atividade ATPásica em mitocôndrias intactas confirmaram-se resultados anteriores de que a eupafolina não possuía atividade desacopladora sobre a fosforilação oxidativa pois, nos experimentos de bioenergética mitocondrial, essa flavona não havia alterado a velocidade respiratória do estado IV (HERRERIAS *et al.*, 2008). Entretanto, anteriormente foi verificado que o estado III da respiração é intensamente inibido pela eupafolina e essa inibição, em conjunto com os efeitos sobre a fluidez de membrana observados neste trabalho seriam responsáveis pela intensa inibição do inchamento mitocondrial energizado. Em geral os efeitos da eupafolina, que possui o anel catecol na sua estrutura, sobre o metabolismo mitocondrial foram mais intensos que os verificados para a hispidulina (DABAGHI-BARBOSA *et al.*, 2005). Ambas flavonas, eupafolina e hispidulina, possuem efeitos inibitórios sobre o transporte de elétrons na cadeia respiratória

mitocondrial e, portanto, podem colaborar para o aumento da geração de ERO (DABAGUI-BARBOSA *et al.*, 2005; HERRERIAS *et al.*, 2008) contudo, o anel catecol também pode sofrer oxidação gerando ERO o que pode ter contribuído para os maiores valores verificados para a eupafolina.

Entretanto, apesar do processo de transição de permeabilidade mitocondrial ser um fenômeno intimamente relacionado com a geração de espécies reativas, tanto eupafolina quanto hispidulina não estimularam a formação do poro de transição de permeabilidade, ao contrário, a eupafolina não alterou esse parâmetro nas menores doses e protegeu o inchamento induzido por cálcio na maior dose testada. Acredita-se que isso ocorreu devido a uma inibição da entrada eletroforética do cálcio gerada pela queda no potencial de membrana mitocondrial promovido pela eupafolina através da inibição da cadeia respiratória mitocondrial como verificado por Dorta *et al.* (2005). Experimentos de avaliação da captação de cálcio na presença dessas flavonas seriam úteis para comprovação dessa hipótese.

Hispidulina e eupafolina alteraram a fluidez de membranas artificiais e naturais e esses resultados são altamente significativos tendo em vista a enorme diversidade de eventos controlados pelas membranas, desde o transporte de solutos até a geração de potencial elétrico transmembrana. Os efeitos sobre a fluidez observados através de polarização de fluorescência promovidos pela hispidulina foram mais significativos dos que os observados com a eupafolina e isso se deve provavelmente à estrutura mais hidrofóbica da hispidulina.

Na literatura são encontrados inúmeros trabalhos relatando o efeito citotóxico de diferentes flavonóides em diversas linhagens celulares. Neste

trabalho, foram escolhidos cinco flavonóides pertencentes a uma mesma classe (flavonas) e que possuem grandes semelhanças estruturais (diferenças em um único grupamento hidroxil ou metoxil) que permitiram estabelecer uma relação entre a presença das hidroxilas em 3' e 4' (anel catecol) e do grupamento 6-metoxil com os efeitos biológicos avaliados. Os resultados demonstraram uma importante correlação entre a presença do anel catecol e o efeito citotóxico em células tumorais (B16-F10) e melanócitos normais de camundongo (Melan-A). Esta correlação foi evidenciada pelas maiores inibições promovidas pela eupafolina e luteolina quando comparados com os resultados obtidos com hispidulina e apigenina respectivamente. Além disso, a presença do grupamento 6-metoxil encontrado na hispidulina e eupafolina mostrou-se desfavorável para o efeito antiproliferativo nas condições experimentais testadas.

A maior formação de radical superóxido na presença das flavonas, conseqüência da inibição da cadeia respiratória mitocondrial ou da oxidação do anel catecol da luteolina e eupafolina, poderia induzir um aumento da atividade de SOD total como mecanismo de defesa contra o aumento do agente oxidante. Contudo, somente com a hispidulina e apigenina, que não possuem a hidroxila em 4', , foi observado um efeito estimulador da atividade da SOD total. Uma possível explicação para este fato é que o efeito estimulatório da atividade de SOD promovido pela eupafolina e a luteolina já teria ocorrido antes do momento da medida da atividade, tendo retornado para os valores mais próximos ao controle posteriormente. A presença de substituintes na estrutura básica das flavonas mostrou-se importante para o efeito inibitório sobre a catalase visto que, somente a flavona sem substituintes não promoveu este

efeito. A presença do grupamento 6-metoxil na estrutura da hispidulina e da eupafolina mostrou-se desfavorável para o efeito sobre a enzima glutathione redutase. Desta forma, verifica-se que a presença e a posição dos grupamentos hidroxil ou metoxil podem afetar de forma distinta as atividades das enzimas antioxidantes em células de melanoma murino.

Através de nossos experimentos de morfologia utilizando-se microscopia eletrônica e os experimentos de liberação de citocromo *c*, podemos verificar que eupafolina, apigenina e luteolina induzem morte celular nas células B16-F10 por apoptose. Além disso, os efeitos obtidos sobre as enzimas antioxidantes, em conjunto com os efeitos pró-oxidantes já relatados dessas flavonas, nos permitem inferir que um desequilíbrio redox poderia contribuir para o mecanismo de apoptose das células de melanoma murino.

Conjuntamente, os resultados parecem indicar que eupafolina, apigenina e luteolina são flavonóides com potencial para novos estudos visando o tratamento do melanoma. Eupafolina e luteolina demonstraram um intenso efeito citotóxico *in vitro* nas células de melanoma, mesmo em doses pequenas, e também apresentaram uma característica citotóxica seletiva nos experimentos com melanócitos normais de camundongo.

Apesar dos resultados promissores, se fazem necessários mais estudos sobre o mecanismo molecular da ação dessas flavonas em células de melanoma e em um modelo tumoral *in vivo* para que se possa avaliar um potencial uso terapêutico destes compostos no tratamento de melanoma.

8. CONCLUSÕES

- A eupafolina não apresenta efeitos significativos sobre a atividade do complexo ATPase em mitocôndrias intactas e não possui atividade desacopladora.
- A eupafolina reduz a amplitude do inchamento mitocondrial na presença de substrato e os resultados refletem os efeitos dessa flavona sobre as atividades enzimáticas da cadeia respiratória e sobre a fluidez da membrana mitocondrial.
- A eupafolina e a hispidulina não promovem o inchamento induzido por cálcio e o processo de transição de permeabilidade mitocondrial nas doses utilizadas.
- Hispidulina afeta a fluidez de membranas artificiais e naturais de maneira mais expressiva que a eupafolina
- A presença dos grupamentos hidroxil nas posições 3',4' , na eupafolina e luteolina aumenta o efeito citotóxico nas células B16-F10 e o grupamento 6-metoxil reduz o efeito antiproliferativo.
- As alterações morfológicas nas células tratadas com eupafolina, apigenina e luteolina juntamente com o estímulo da liberação de *citocromo c* são compatíveis com a indução do processo de morte celular por apoptose.
- O efeito das flavonas sobre a atividade das enzimas antioxidantes em conjunto com sua ação inibitória sobre a cadeia respiratória mitocondrial poderia conduzir a um estado de desequilíbrio redox na célula e induzir a apoptose nas células de melanoma murino.

- As flavonas com os grupamentos hidroxil em 3', 4' (anel catecol) são citotóxicas também para as células Melan-A porém, em doses maiores que as observadas para as células tumorais, indicando que a presença destas substituições são importantes para a redução da viabilidade também em células não-tumorais.
- A eupafolina ($50 \mu\text{mo.L}^{-1}$) não altera a viabilidade de células normais (MelanA) contudo, reduz em 70% a viabilidade de células tumorais (B16-F10) demonstrando que nesta dose esta flavona tem um importante efeito seletivo sobre a indução de morte de células tumorais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AZIZ, A.F.; EL-NAGGAR, M.M. Superoxide dismutase activities in serum and white blood cells of patients with some malignancies. **Cancer Letters**, Oxford, v.113, p. 61-64, 1997.

ABE, F.; NAGAO, T.; OKABE, H. Antiproliferative Constituents in Plants 9. Aerial Parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*. **Biol. Pharm. Bull**, Tokio, v. 25, n.7, p.920-922, 2002.

ABRAHAMSE, S. L.; KLOOTS, W. J.; VAN AMELSVOORT, J. M. M. Absorption, distribution, and secretion of epicatechin and quercetin in the rat. **Nutrition Research**, Oxford, v. 25, p. 305-317, 2005.

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

AHMAD, T.; EISEN, T. Kinase inhibition with BAY 43-9006 in renal cell carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v.10, p. 6388-92, 2004.

ALBINO, A.P.; NANUS, D.M.; MENTLE, I.R.; *et al.* Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. **Oncogene**, London, v.4, p. 1363-74, 1989.

AN, B.; GOLDFARB, R.H.; SIMAN, R.; DOU, Q.P. Novel dipeptidyl proteasome inhibitors overcome Bcl-2 protective function and electively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts. **Cell Death and Differentiation**, London, v.5, p. 1062 -1075,1998.

ANTUNES-MADEIRA, M. C.; CARVALHO, A. P.; MADEIRA, V. M. C. Effects of insecticides on thermotropic lipid phase transitions. **Pestic. Biochem. Physiol.**, Orlando, v. 14, p. 161-169, 1980.

ANTUNES-MADEIRA, M. C.; VIDEIRA, R. A.; KLÜPPEL, M. L.; MADEIRA, V. M. C. Amiodarone effects on membrane organization evaluated by fluorescence polarization. **Int. J. Cardiol.**, Shannon, v. 48, p. 211-218, 1995.

APPAIX, F., MINATCHY, M.N., RIVA-LAVIEILLE, C., OLIVARES, J., ANTONSSON, B. AND SAKS, V. Rapid spectrophotometric method for quantitation of cytochrome c release from isolated mitochondria or permeabilized cells revisited. **Biochimica et Biophysica Acta.**, Amsterdam, v.1457, p. 175-181, 2000.

AREIAS, F.M.; REGO, A.C.; OLIVEIRA, C.R.; SEABRA, R.M. Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/Fe²⁺-induced oxidative stress in cultured retinal cells. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 62, p. 111-118, 2001.

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

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**, Paris, v. 62, p. 590-597, 2008.

BALCH, C.M.; BUZAID, A.C.; SOONG, S.J.; *et al.* Final version of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system.for cutaneous melanoma **J. Clin. Oncol.**, Alexandria, v.19, p. 3635-3648, 2001.

BARTLETT, G. R. Phosphorus assay in column chromatography. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 234, p. 466-468, 1959.

BARTLETT, J.B.; MICHAEL, A.; CLARKE, I.A.; DREDGE, K.; NICHOLSON, S.; KRISTELEIT, H.; POLYCHRONIS, A.; PANDHA, H.; Muller, G.W.; STIRLING, D.I.; ZELDIS, J.; DALGLEISH, A.G. Phase I study to determine the safety, tolerability and immunostimulatory activity of thalidomide analogue CC-5013 in patients with metastatic malignant melanoma and other advanced cancers. **British Journal of Cancer** London,v. 90, p.955-961, 2004.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; ALCARAZ, M.; YÁNEZ, J.; MARTINEZ, C.; VICENTE, V.; LOZANO, J.A. Antiproliferative activity of several phenolic compounds against melanoma cell lines: relationship between structure and activity. **Cancer Prevention**, v. 4, p.30-34, 2005.

BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the próton electrochemical gradient. **J.Biol.Chem.**, Bethesda, v.267, p. 8834-8839, 1992.

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

BOYER, P.D. Catalytic site forms and controls in ATP synthase catalysis **Biochimica et Biophysica Acta** Amsterdam, v. 1458, p 252-262, 2000.

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

BRAGUINI, W.L.; CADENA, S.M.S.C.; CARNIERI, E.G.S.; ROCHA, M.E.M.; OLIVEIRA, M.B.M. Effects of deltametrin on functions of rat liver mitochondria and on native and synthetic model membranes. **Toxicology Letters**, Shannon, v. 152, p.191-202, 2004.

BRAS, M., QUEENAN, B.; SUSIN, S.A. Programmed Cell Death via Mitochondria:

Different Modes of Dying. **Biochemistry**, Moscow, v. 70, p. 231-239, 2005.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n.11, p. 317-333, 1998.

BUZZELL, R.A.; ZITELLI, J.A. Favorable prognostic factors in recurrent and metastatic melanoma **Journal of the American Academy of Dermatology**, New York, v. 34, p. 798 -783, 1996.

CARTER, S.K.; FRIDMAN, M.A. 5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)-imidazole-4-carboxamide (DTIC, DIC, NSC-45388)--a new antitumor agent with activity against malignant melanoma. **Eur J Cancer.**, OXFORD, v.8, p. 85-92, 1972.

CASAGRANDE, F.; DARBON, J.M. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. **Biochem Pharmacol.**, Oxford, v. 61, p. 1205-15, 2001.

CHANCE B. & HOLLINGER, G. Effects of amytal, thiopental, rotenone, progesterone and methylene glycol **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 278, n.1, 1963.

CHEN, L.B.; MURRAY, A.; FIGAL, R.A.; BUSHNELL, A.; WALSH, M.L. Studies on intercellular LETS glycoprotein matrices. **Cell**, Cambridge, v.14, p. 377-391, 1978

CHEN, D.; DANIEL, K. G.; CHEN, M. S.; KUHN, D. J.; LANDIS-PIWOWAR, K. R.; DO, Q. P. Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. **Biochemical Pharmacol.**, Oxford, v. 69, p. 1421-1432, 2005.

CHINNAIYAN, A.M.; O'ROURKE, K.; TEWARI, M.; DIXIT, V.M. FADD, a Novel Death domain-Containing Protein, Interacts with the Death Domain of Fas and Initiates Apoptosis. **Cell**, Cambridge, v. 81, p. 505-512, 1995.

CHOPRA, S.; WALLACE, H.M. Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species. **Biochem Pharmacol.**, Oxford, v. 55, p.1119-23, 1998.

COHEN, J. Apoptosis. **Immunology Today**, Cambridge, v. 4 , p. 126-130, 1993.

COLDHAM, N.G.; ZHANG, A.Q.; KEY, P.; SAUER, M.J. Absolute bioavailability of [¹⁴C] genistein in the rat; plasma pharmacokinetics of parent compound, genistein glucuronide and total radioactivity . **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, Geneva, v. 27, p. 249-258, 2002.

COMALADA, M.; BALLESTERA, I.; BAILÓNA, E.; SIERRAB, S.; XAUSB, J.; GÁLVEZA, J.; MEDINA, F.S.; ZARZUELO, A. Inhibition of pro-inflammatory

markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. **Biochem Pharmacol.**, Oxford, v.72, p.1010-21, 2006.

COTELLE N.; BERNIER J. L.; HENICHART J. P.; CATTEAU J. P.; GAYDOU E.; WALLET J. C. Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 13, p. 211-219, 1992.

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

CURTIN, J.A.; FRIDLAND, J.; KAGESHITA, T.; PATEL, H.N.; BUSAM, K.J.; KUTZNER, H.; CHO, K.H.; AIBA, S.; BRÖCKER, E.B.; LEBOIT, P.E.; PINKEL, D.; BASTIAN, B.C. Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.353, p. 2135-2147, 2005.

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

DAI, D.K.; MARTINKA, M.; LI, G. Prognostic significance of activated AKT expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 23, p.1473-1482, 2005.

DAS, A.; BANIK, N.L.; RAY S.K. Retinoids induce differentiation and downregulate telomerase activity and N-Myc to increase sensitivity to flavonoids for apoptosis in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells. **International Journal of Oncology**, Athens, v. 34, p. 757-765, 2009.

DAVIES, H.; BIGNELL, G.R.; COX, C.; *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, London, v. 417, 2002.

DAY, A.J.; DUPONT, M.S.; RIDLEY, S.; RHODES, M.; RHODES, M.J.C.; MORGAN, M.R.A.; WILLIAMSON, G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 436, p. 71-75, 1998.

DORTA, D.J.; PIGOSO, A.A.; MINGATTO, F.E.; RODRIGUES, T.; PRADO, I.M.R.; HELENA A.F.C.; UYEMURA, S.A.; SANTOS, A.C.; CURTI, C. The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. **Chemico-Biological Interactions**, v.152, p. 67-78, 2005.

DU, Y.; GUO, H.; LOU, H. Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p.1695 -1701, 2007.

DU, C.; FANG, M.; LI, Y.; LI, L.; WANG, X. Smac, a mitochondrial protein that

promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, v. 102, p. 33-42, 2000.

DUAN, H.; DIXIT, V.M. RAIDD is a new "death" adaptor molecule. **Nature**, London, v. 385, p. 86-89, 1997.

DUARTE, J.; PEREZ-PALENCIA, R.; VARGAS, F.; OCETE, M. A.; PEREZ-VISCAIO, F.; ZARZUELO, A.; TAMARGO, J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 133, n. 1, p. 117-124, 2001.

ENGELAND, M.V.; NIELAND, L.J.W.; RAMAEKERS, F.C.S.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C.P.M. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, Hoboken, v. 31, p.1-9, 1998.

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

ERNSTER, L.; DALLNER, G.; FELICE, G.A. Differential effects of rotenone and amytal on mitochondrial electron and energy transfer. **Journal Biological Chemistry**, Bethesda, v. 238, n.3, 1963.

FERNANDEZ, S.P.; NGUYEN M.; YOW, T.T.; CHU, C.; JOHNSTON, G.A.R.; HANRAHAN, J.R.; CHEBIB, M. The flavonoid glycosides, myricitrin, gossypin and naringin exert anxiolytic action in mice. **Neurochem Res.**, DOI 10.1007/s11064-009-9969-9, 2009.

FERRALI M.; SIGNORINI B.; CACIOTTI B.; SUGHERINI L.; CICCOLI L.; GIACHETTI D.; COMPORTI M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. **FEBS Letters**, Amsterdam, n. 416, p. 123-129, 1997.

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

FLOHÉ, L.L.; GUNZLER, W.A.. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in enzymology**, San Diego, v.105, 114, 1984.

GALLUZZI, L.; MAIURI, M.C.; VITALE, I.; et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ**; v. 14, p.1237-1243, 2007.

GARLID, K.D.; BEAVIS, A.D. Swelling and contraction of the mitochondrial matrix: Quantitative application of the light scattering technique to solute transport across the inner membrane. **J. Biol Chem.**, Bethesda, v. 260, p. 13434-13441, 1985.

GE, Y.S.; TENG, W.Y.; ZHANG, C.D. Protective effect of cyclophilin A against Alzheimer's amyloid beta-peptide (25-35)-induced oxidative stress in PC12 cells. **Chin Med J (Engl)**, Beijing, v.122, p. 716-24, 2009.

GEE, J.M.; DUPONT, M.S.; RHODES, M.J.C.; JOHNSON, I.T. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. **Free Radical Biology & Medicine**. New York, v. 25, p. 19-25, 1998.

GOKCE, G.; SOZER,G.O.; OKTAY,G.;KIRKALI, G.; JARUGA, P.; DIZDAROGLU, M.; KERRY, Z. Glutathione depletion by buthionine sulfoximine induces oxidative damage to DNA in organs of rabbits in vivo. **Biochemistry**, Washington, DOI: 10.1021/bi900030z, 17 April 2009.

GOLDSTEIN, D.B. The effects of drugs on membrane fluidity. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v. 24, p. 43-64, 1984.

GUNTER, T. E.; PFEIFER, D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **American Journal Physiology**, Bethesda, v. 258, p. 755-C786, 1990.

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

HALLIWELL B. & GUTTERIDGE J.M.C. **Free Radical Biology & Medicine**, 3. ed., Ed. Oxford University Press, New York, 1999.

HALLIWELL, B.; CROSS, C.E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environmental Health Perspectives**, Res Triangle Pk, v. 102, p. 5-12,1994.

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

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

HENDRIKS, J.J.A.; VRIES, H.E.; POL, S.M.A.; BERG, T.K.; TOL, E.A.F.; DIJKSTRA, C.D. Flavonoids inhibit myelin phagocytosis by macrophages; a structure-activity relationship study. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.65, p. 877-885, 2003.

HERLYN, M. e SATYAMOORTHY, K. Melanoma: Molecular biology of cutaneous melanoma. DEVITA, V.T.Jr; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. In: **Cancer: Principles and Practice of Oncology**, 6ed. Lippincott and Williams & Wilkins, 2001.

HERRERIAS, T.; OLIVEIRA, B.H.; GOMES, M.A.B.; OLIVEIRA, M.B.M.; CARNIERI, E.G.S.; CADENA, S.M.S.C.; MARTINEZ, G.R.; ROCHA M.E.M. Eupafolin: Effect on mitochondrial energetic metabolism. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v.16, p.854-861, 2008.

HODNICK W.F.; BOHMONT C.W.; CAPPS C. & PARDINI R.S. Inhibition of the mitochondrial NADH-oxidase (NADH-coenzyme Q oxido-reductase) enzyme system by flavonoids: a structure-activity study. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 36, p. 2873-2874, 1987.

HOTCHKISS, R.S.; STRASSER, A.; MCDUNN, J.E.; SWANSON, P.E. **N Engl J Med.**, v.361,p. 1570-83, 2009.

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

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P. Glutathiona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**. São Paulo, v. 31, p. 1170-1179, 2008.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hidroxyl Radical Scavenging Activity of Flavonoids. **Phytochemistry**, Oxford, v. 26, p. 2489-2491, 1987.

INCA (Instituto Nacional do Cancer) - Ministério da Saúde. **Estimativas da Incidência e Mortalidade por Cancer**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso fev. 2009.

JACOBSON, M.D.; WEIL, M.; RAFF, M.C. Programmed Cell Death in Animal Development **Cell**, Cambridge, v. 88, p. 347-354, 1997.

JAIN, M. K.; WU, N. M. Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithin liposomal bilayer: III phase transition in lipid bilayer. *J. Membr. Biol.*, New York, v. 34, p. 157-201, 1977.

JANSEN, B.; SCHLAGBAUER-WADL, H.; BROWN, B.D.; *et al.* Bcl-2 antisense therapy chemosensitizes melanoma in SCID mice. **Nat. Med.**, London, v. 4, p. 232-234, 2000.

JEON, S. B. *et al.*, Flavone inhibits vascular contraction by decreasing phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit. **Clinical and experimental Pharmacology and Physiology**, Carlton South, v. 34, p. 1116-1120, 2007.

JHAPPAN, C.; NOONAN, F.P.; MERLINO, G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. **Oncogene**, London, v. 22, p. 3099-3112, 2003.

JIN F, JIN X.Y, JIN Y.L., SOHN D.W, KIM S.A, SOHN D.H, KIM Y.C. Structural Requirements of 2',4',6'-Tris(methoxymethoxy) chalcone Derivatives for Anti-

inflammatory Activity: The Importance of a 2'-Hydroxy Moiety. **Arch. Pharm. Res.** v. 30, p.1359-136, 2007.

KALE, A.; GAWANDE, S.; KOTWAL, S. Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the Cellular level. **Phytother. Res.**, Sussex, v. 22, p. 567-577, 2008.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy, **J. Cell Biol.**, New York, v. 27, p. 137A, 1965.

KASAOKA, T.; NISHIYAMA, H.; OKADA, M.; NAKAJIMA, M. Matrix metalloproteinase inhibitor, MMI270 (CGS27023A) inhibited hematogenic metastasis of B16 melanoma cells in both experimental and spontaneous metastasis models. **Clin Exp Metastasis.**, v.25, p. 827-34, 2008.

KASPER, B.; HONDT, V.D.; VEREECKEN, P.; AWADA, A. Novel treatment strategies for malignant melanoma: A new beginning. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, New York, v. 62, p. 16-22, 2007.

KIM, DI; LEE, TAE-KYUN; LIM, IG-SEOB; KIM, HWA; LEE, YOUNG-CHOON; KIM, CHEORL-HO. Regulation of IGF-I production and proliferation of human leiomyomal smooth muscle cells by *Scutellaria barbata* D. Don in vitro: isolation of flavonoids of apigenin and luteolina as acting compounds. **Toxicology and Applied Pharmacology**. V.205, p.213-224, 2005.

KIM, S. R.; PARK, M. J.; LEE, M. K.; SUNG, S. H.; PARK, E. J.; KIM, J.; KIM, S. Y.; OH, T.H.; MARKELONIS, G. J.; KIM, Y. C. Flavonoids of Inula Britannica Protect Cultured Cortical Cells from Necrotic Cell Death Induced by Glutamate. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 32, p. 596-604, 2002.

KLEINMAN, H.K.; KLEBE, R.J.; MARTIN, G.R. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. **J. Cell Biol.**, New York, v. 88, p. 473-482,1981.

KLIONSKY, D.J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v.8, p. 931 - 937, 2007.

KLUCK, R.M.; BOSSY-WETZEL, E.; GREEN, D.R.; NEWMAYER, D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. **Science**. Washington, v. 275, p. 1132-1136, 1997.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n.3/4, pp. 463-471, 1999.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE P.; et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, v. 16, p3-11, 2009.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 182, p. 16-19, 1989.

KUPCHAN S.M.; SIGEL C.W.; HEMINGWAY R.J.; KNOX J.R. & UDAYAMURTHY M.S. Citotoxic flavones from *Eupatorium* species. **Tetrahedron**, Kidlington, v. 25, n.8, p 1603-1615, 1969.

KYRIAZI, M.; YOVA, D.; RALLIS, M.;LIMA, A. Cancer chemopreventive effects of Pinus Maritima bark extract on ultraviolet radiation and ultraviolet radiation-7,12,dimethylbenz(a) anthracene induced skin carcinogenesis of hairless mice. **Cancer Letters**, Oxford, v. 237, p. 234-241, 2006.

LANDIS, G.N.; TOWER, J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation **Mechanisms of Ageing and Development**, Clare, v. 126, p. 365-372, 2005.

LEE, A.G. Functional properties of biological membranes: A physical-chemical approach. **Prog. Biophys. Molec. Biol.**, Oxford, v. 29,p. 3-56, 1975.

LEE, H.J.; WANGA, C.J.; KUO, H.C.; CHOU, F.P.; JEAN, L.F.; TSENG, T.H. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 203, p. 124- 131, 2005a.

LEE, S.W.; SUNG, S.G.; KWON, C.H.; KIMB, K.Y. Beneficial effect of flavonoid baicalein in cisplatin-induced cell death of human glioma cells. **Neuroscience Letters**, Ireland, v. 382, p. 71-75, 2005b.

LEE, S.J.; CHUNG, H.Y.; MAIER, C.G.A.; WOOD, A.R.; DIXON, R. A.; MABRY, T. J. Estrogenic flavonoids from *Artemisia vulgaris* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 3325-3329, 1998.

LENTZ, B.R.; BARENHOLTZ, Y. and THOMPSON, T.E. Fluorescence depolarization studies of phase transition and fluidity in phospholipid bilayers. 1 - Single component phosphatidylcholine liposomes. **Biochemistry**, Washington, v. 15, p. 4521-4528, 1976.

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

LI, B.; DOU, Q.P. Bax degradation by the ubiquitin-proteasome dependent pathway: Involvement in tumor survival and progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 3850-3855, 2000.

LI, M.; WANG, J.; JIN, J.; HUA, H.; LUO, T.; XU, L.; WANG, R.; LIU, D.; JIANG, Y. Synergistic promotion of breast cancer cells death by targeting molecular

chaperone GRP78 and heat shock protein 70. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Oxford, DOI:10.1111/j.1582-4934.2008.00575, 2009.

LI, P.; NIJHAWAN, D.; BUDIARDJO, I.; et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v. 91, p. 479-489, 1997.

LIOTTA, L. A.; RAO, C. N.; BARSKY, S.H. Tumor invasion and the extracellular matrix. **Lab. Invest.**, New York, v.49, p 636-649, 1983.

LIOTTA, L.A. Tumor Invasion and Metastase -Role of the Extracellular Matrix: Rhoads Memorial Award Lecture. **Cancer Research**, v. 46, p. 1-7, 1986.

LITMAN, B.J.; BARENHOLZ, Y. Fluorescent probe: Diphenylhexatriene In **Methods in Enzymology**, COLOWICK, S.P.; KAPLAN, O.N. (eds). Academic Press: New York, v.82, p. 678-685, 1982.

LIU, Y.; HU, M. Absorption and metabolism of flavonoids in the caco-2 cell culture model and a perused rat intestinal model. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 30, p. 370-377, 2002.

LOTITO, S.B.; FREI, B. Dietary flavonoids attenuate tumor necrosis factor - α induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells Structure-function relationships and activity after first pass metabolism. **The Journal of Biological Chemistry** Bethesda, v. 281, p. 37102-37110, 2006.

LOTZE, M.T.; DALLAL, R.M.; KIRKWOOD, J.M.; FLICKINGER, J.C. Melanoma: Cutaneous melanoma. DEVITA, V.T.J.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. In: **Cancer: Principles and Practice of Oncology**, 6ed. Lippincott and Williams & Wilkins, 2001.

LOWRY O. H.; ROSEBROUGH N. J.; FARR A. C.; RANDALL R. J. Protein measurement with the polyphenol reagent, **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUFT, J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **J. Bophysical Biochem.Cytol.** New York, v. 9, p. 409-414, 1961.

MA, G.; YANG, C.; QU, Y.; WEI, H.; ZHANG, T.; ZHANG, N. The flavonoid component isorhamnetin in vitro inhibits proliferation and induces apoptosis in Eca-109 cells, **Chemico-Biological Interactions** , Ireland, v.167, p. 153-160, 2007.

MARCANO, D.; MASAHISSA, H. **Fitoquímica organica**. Caracas: Universidade Central de Venezuela, p. 81, 1991.

MARKHAM, K.R. **Techniques of Flavonoid Identification**. Londres: Academic Press, 113p, 1982.

MARKOVIC, S.N.; ERICKSON, L.A.; RAO, R.D.; WEENIG, R.H.; et al.

Malignant Melanoma in the 21st Century, Part 2: Staging, Prognosis, and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**; Rochester, v. 82, p. 490-513, 2007.

MARTIN, D.A.; SIEGEL, R.M.; ZHENG, L.; LENARDO, M.J. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (flice/macha1) death signal. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, pp. 4345-4349, 1998.

MARTÍN, M.; SERRANO, A.B.G.; RAMOS, S.; PULIDO, M.I.; BRAVO, L.; GOYA, L. Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, doi:10.1016/j.jnutbio.2008.10.009, 2009.

MATSUI, J.; KIYOKAWA, NOBUTAKA; TAKENOUCI, HISAMI; TAGUCHI, TOMOKO; SUZUKI, KYOKO; SHIOZAWA, YUSUKE; SAITO, MASAHIRO; TANG, WEI-RAN; KATAGIRI, YOHKO U.; OKITA, HAJIME; FUJIMOTO, JUNICHIRO. Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. **Leukemia Research**, Oxford, v.29, p. 573-581, 2005.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 244, p. 6049-6065, 1969.

MEETEREN, M.E.; HENDRIKS, J.J.A.; DIJKSTRA, C.D.; TOL, E.A.F. Dietary compounds prevent oxidative damage and nitric oxide production by cells involved in demyelinating disease. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 67, p. 967-975, 2004.

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

MIDDLETON E. The flavonoids. **Trends in Pharmaceutical Sciences (TIPS)**, Kidlington, aug, p. 335-338, 1984.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, L. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biology Chemistry**, Bethesda, v. 247, p. 3170-3175, 1972.

MOLHOEK, K.R.; BRAUTIGAN, D.L.; SLINGLUFF, C.L. Synergistic inhibitions of human melanoma proliferation by combination treatment with B-Raf inhibitor BAY43-9006 and mTOR inhibitor rapamycin. **Journal of Translational Medicine**, London, v. 3, p.39, 2005.

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

MONTESINOS, M. C.; UBEDA, A.; TERCENIO, M. C.; PAYA, M.; ALCARAZ, M. J. Antioxidant profile of Mono and dihydroxylated Flavone Derivatives in Free Radical Generating Systems. **Zeitschrift für Naturforschung C Biosciences**, Tuebingen, v.50, n. 7/8 p.552-560, 1995.

MOON, Y.J.; WANG, X.; MORRIS, M.E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicology In Vitro**, Oxford, v. 20, p. 187-210, 2006.

MOORE, P.D.; YEDJOU, C.G.; TCHOUNWOU, P.B. Malathion-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in human liver carcinoma (HepG2) cells. **Environmental Toxicology**, Hoboken, DOI 10.1002, 2009.

MORLEY, K.L.; FERGUSON, P.J.; KOROPATNICK, J. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. **Cancer Lett.**, Oxford, v. 167, p. 153-160, 2006.

MOSESSON, M.W.; UMFLEET, R.A. The cold-insoluble globulin of human plasma I. Purification, primary characterization, and relationship to fibrinogen and other cold-insoluble fraction components. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 245, p. 5728-5732, 1970.

MRUK, D.D.; SILVESTRIN, B.; MO, M.Y.; CHENG, C.Y. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. **Contraception**, New York, v. 65, p. 305-311, 2002.

MUKHERJEE, A.K.; BASU, S.; SARKAR, N.; GHOSH, A.C. Advances in cancer therapy with plant based natural products. **Current Medicinal Chemistry**, Sharjah, v.8, p. 1467-1486, 2001.

MUSTAFA, M.G.; UTSUMI, K.; PACKER, L. Damped oscillatory control of mitochondrial respiration and volume. **Biochemical Biophysical Research Communications**, Orlando, v.24, p.381-385, 1966.

MUZIO, M.; STOCKWELL, B.R.; STENNICKE, H.R.; SALVESEN, G.S.; DIXIT, V.M. Induced Proximity Model for Caspase-8 Activation. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, pp. 2926-2930, 1998.

NAGATA, HIDETAKA; TAKEKOSHI, SUSUMU; TAKEYAMA, REIKO; HOMMA, TAKAO; OSAMURA, YOSHIYUKI Quercetin enhances melanogenesis by increasing the activity and sintesis of tyrosinase in human melanoma cells and in normal human melanocytes. **Pigment Cell Research**. v. 17, p. 66-73, 2004.

NAGATA, S. Apoptosis by death factor. **Cell**, Cambridge, v. 88, p. 355-365, 1997.

NICHOLLS, D. G.; FERGUSON S. J. **Bioenergetics 2** San Diego: Academic Press, 1992, 254 p.

OLIVEIRA B. H.; NAKASHIMA T.; FILHO J. D. S.; FREHSE, F. L. HPLC analysis of flavonoids in *Eupatorium litoralle*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 243-246, 2001.

OTEIZA, P.I.; ERLEJMAN, A.G.; VERSTRAETEN, S.V.; KEEN, C.L.; FRAGA, C.G. Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? **Clinical & Developmental Immunology**. v.12, n.1, pp 19 - 25, 2005.

OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**, Dordrecht, v. 12, p. 913-922, 2007.

PARDO-ANDREU, G.L.; DORTA, D.J.; DELGADO, R. CAVALHEIRO, R.A.; SANTOS, A.C.; VERCESI, A.E.; CURTI, C. Vimang (Mangifera indica L. extract) induces permeability transition in isolated mitochondria, closely reproducing the effect of mangiferin Vimang's main component. **Chemico-Biological Interactions**, Ireland, v. 159, p.141-148, 2006.

PARKIN, D.M. Global cancer statistics in the year 2000. **Lancet Oncol**, London, v. 2, p. 596, 2001.

PEARLSTEIN, E. Plasma membrane glycoprotein which mediates adhesion of fibroblasts to collagen. **Nature**, London, v. 262, p. 497-500, 1976.

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

PULLMAN M.E.; PENEFSKY H.S.; DATTA A.; RACKER E. Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 235, n. 11, p. 3322-3329, 1960.

PUSHPA-REKHA, T.R.; BURDSALL, A.L.; OLEKSA, L.M.; CHISOLM, G.M.; DRISCOLL, D.M. Rat Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase cDNA - Cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, pp. 26993-26999, 1995.

QUINTIN J, DESRIVOT J, THORET S, MENEZ P.L, CRESTEIL T, LEWIN G. Synthesis and biological evaluation of a series of tangeretin-derived chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v.9, 167-169, 2009.

RACKOVA, L.; FIRAKOVA, S.; KOSTALOVA, D.; STEFEK, M.; STURDIK, E.; MAJEKOVA, M. Oxidation of liposomal membrane suppressed by flavonoids: Quantitative structure-activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.13, p. 6477-6484, 2005.

RASOLA, P.; BERNARDI, P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. **Apoptosis**, v. 12, p. 815–833, 2007.

REYNOLDS, E. S The use of lead citrate at high pH as an electron - opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biology**, New York, v.17, p.208-212, 1963.

RITHIDECH, K.N.; TUNGSJAI, M.; WHORTON, G.B. Protective effect of apigenin on radiation-induced chromosomal damage in human lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 585, p. 96-104, 2005.

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

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidante agents: Importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical Biology & Medicine**. New York, v. 19, p.481-486, 1995.

SALA, A.; RECIO, M. C.; GINER, R. M.; MANEZ, S.; RIOS, J. L. Anti-Phospholipase A₂ , and Anti-Inflammatory Activity of Santolina Chamaecyparissus. **Life Sciences**, Oxford, v. 66, p. 35-40, 2000.

SALVI, M.; BRUNATI, A.M.; CLARI, G.; TONINELLO, A. Interaction of genistein with the mitochondrial electron transport chain results in opening of the membrane transition pore. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1556, p. 187-196, 2002.

SANTOS A.C.; UYEMURA S.A.; LOPES J.L.C.; BAZON J.N.; MINGATTO F.E. & CURTI C. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 24, n. 9, p. 1455-1461, 1998.

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

SCHEIDT, H.A.; PAMPEL, A.; NISSLER, L.; GEBHARDT, R.; HUSTER, D. Investigation of the membrane localization and distribution of flavonoids by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. **Biochim.Biophys.Acta**, Amsterdam, v.1663, p. 97-107, 2004.

SEPALLA, A.J.; WIKSTROM, M.K.F.; SARIS, N.E.L. Damping of mitochondrial volume oscillations by propranolol and related compounds. In: CHANCE, B.; PYE, E. K.; GHOSH, A. K.; HESS, B. (eds). **Biol. Chem. Osc**, New York: Academic Press, p. 115-124, 1973.

SHERIDAN, C.; MARTIN, S.J. Commitment in apoptosis: slightly dead but mostly alive. **Trends Cell Biol**, v. 18, p. 353-357, 2008.

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

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

SI, D.; WANG, Y.; ZHOU, Y.H.; GUI, Y.; WANG, J.; *et al.* Mechanism of CYP2C9 Inhibition by Flavones and Flavonols **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v.37, p. 629-634, 2009.

SIDDIQUE, Y.H.; AFZAL, M. Antigenotoxic effect of apigenin against mitomycin C induced genotoxic damage in mice bone marrow cells. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, p. 536-539, 2009.

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **Febs Letters**, Amsterdam, v.103, p. 287-290, 1979.

SOICKE H., LENG P. E. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 53, n. 1, p. 37-39, 1987.

SON, YOUNG-OK; LEE, KYUNG-YEOL; KOOK, SUNG-HO; LEE, JEONG-CHAE; KIM, JONG-GHEE; JEON, YOUNG-MI; JANG, YONG-SUK. Selective antiproliferative and apoptotic effects of flavonoids purified from *Rhus vernicifua* Stokes on normal versus transformed hepatic cell lines. **Toxicology Letters**, Shannon, v. 155, p. 115-125, 2005.

SON, YOUNG-OK; LEE, KYUNG-YEOL; KOOK, SUNG-HO; LEE, JEONG-SON, YOUNG-OK; LEE, KYUNG-YEOL; KOOK, SUNG-HO; LEE, JEONG-CHAE; KIM, JONG-GHEE; JEON, YOUNG-MI; JANG, YONG-SUK. Selective effects of quercetin on the cell growth and antioxidant defense system in normal versus transformed mouse hepatic cell lines. **European Journal of Pharmacology**. Amsterdam, v. 502, p. 195-204, 2004.

SUMNER, J.B. Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorus. **Science**, Washington, v.100, p. 413-414, 1944.

STRASSER, A. The role of BH3-only proteins in the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 5, p. 189 - 200, 2005.

SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; KROEMERS, G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1366, p.151-65, 1998.

TERAO, J. Dietary Flavonoids as Antioxidants. **Food Factors for Health Promotion**, Karger, v. 61, p 87-94, 2009.

TOPLACK, H.; BATCHIULIS, V.; HERMETTER, A.; HUNZINKER, T.; HONEGGER, U. E.; WIESMANN, U. N. Effects of culture and incubation conditions on membrane fluidity in monolayers of culture cells measured as fluorescence anisotropy using trimethylammoniumdiphenylhexatriene (TMA-DPH). **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1028, p. 67-72, 1990.

TOREL, J; CILLARD, J.; CILLARD, P. Antioxidant activity of Flavonoids and Reactivity with peroxi radical. **Phytochemistry**, Oxford, v. 25, p. 383-385, 1986.

VALDAMERI, G. **Efeitos da flavona sobre o metabolismo mitocondrial**. Curitiba, 2008. 76f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

VAN HOLDE, R.E. Absorption and emission of radiation. In: HAGER, L.; WOLD, F. **Physical Biochemistry**, New Jersey, p. 171-175, 1975.

VERSTRAETEN, S.V.; KEEN, C.L.; SCMITZ, H.H.; FRAGA, C.G.; OTEIZA, P.I. Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 34, n.1, p. 84-92, 2003.

VOSS, O.D.; CAMPELO A.P.; BACILA M. The respiration chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v.4, n.1, p. 48-51, 1961.

WALLE, T.; TA, N.; KAWAMORI, T.; WEN, X.; TSUJI, P.A.; WALLE, U.K. Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids—Methylated versus unmethylated flavones **Biochem. Pharmacol.** Oxford, v.73 p.1288-1296, 2007.

WACK, C.; BECKER, J.C.; BRÖCKER, E.B.; LUTZ, W.K.; FISCHER, W.H. Chemoimmunotherapy for melanoma with dacarbazine and 2,4-dinitrochlorobenzene: results from a murine tumour model. **Melanoma Res.** Philadelphia, v.11(3), p.247-53, 2001.

WANG, YUN; CHAN, FRANKY L.; CHEN, SHIUAN; LEUNG, LAI K. The plant polyphenol butein inhibits testosterone-induced proliferation in breast cancer cells expressing aromatase. **Life Sciences**. V. 77, p.39-51, 2005.

WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **J. Biophysical Biochemical Cytology**, v.4, p. 475-478, 1958.

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

WENG, M. S.; HO, Y. S.; LIN, J. K. Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 1815-1827, 2005.

WENZEL, U. *et al.*, Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 60, p. 3823-3831, 2000.

WYLLIE, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**, London, v. 284, p. 555-556, 1980.

WILSON, N.S.; DIXIT, V.; ASHKENAZI, A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. **Nature**, London, v.10, p. 348-355, 2009.

YE, C.H.; LIU, J.W.; WEI, D.Z.; LU, Y.H.; QIAN, F. In vitro anti-tumor activity of 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-6'-methoxy-3', 5' - dimethylchalcone against six established human cancer cell lines. **Pharmacological Research**. v. 50, p. 505-510, 2004.

YOON, H.S.; MOON, S.C.; KIM, N.D.; PARK, B.S.; JEONG, M.H.; YOO, S.Y. Genistein Induces Apoptosis of RPE-J Cells By Opening Mitochondrial PTP **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 276, p. 151-156, 2000.

ZABIEROWSKI, S.E.; HERLYN, M. Melanoma Stem Cells: The Dark Seed of Melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 26, p. 2890-2894, 2008.

ZHANG, X.M.; CHEN, J.; XIA, Y.G.; XU, Q. Apoptosis of murine melanoma B16-F10 cells induced by quercetin targeting mitochondria, inhibiting expression of PKC- α and translocating PKC - δ . **Cancer Chemother. Pharmacol.** New York, v.55, p.251-262, 2005.

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

ZHOU, Y. C.; ZHENG, R. L. Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and antioxidants. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, n. 6, pp. 1177-1179, 1991.

ZHOU, Q.; YAN, B.; HU, X.; LI, X.B.; ZHANG, J.; FANG, J. Luteolin inhibits invasion of prostate cancer PC3 cells through E-cadherin. **Mol Cancer Ther**, Philadelphia, v. 8, 1684-1691, 2009.

ZHU, M.; CHEN, Y.; LI, R.C. Oral absorption and bioavailability of tea catechins. **Planta Medica**, Stuttgart, v.66, p. 444-447, 2000.

ZOU, H.; HENZEL, W.J.; LIU, X.; LUTSCHG, A.; WANG, X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. **Cell**, Cambridge, v. 90, p. 405-413, 1997.

10. ANEXOS

- Anexo 1 - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA).