UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação *in vivo* de formulações fotoprotetoras comerciais e estudo do
potencial anticarcinogênico do extrato de soja biotransformado em células
de melanoma humano**

Fernanda Maria Pinto Vilela

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação *in vivo* de formulações fotoprotetoras comerciais e estudo do potencial anticarcinogênico do extrato de soja biotransformado em células de melanoma humano

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientada: Fernanda Maria Pinto Vilela

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca

Versão corrigida Tese de Doutorado o apresentada ao Programa de Pós-Graduação: Ciências Farmacêuticas em 05/07/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Vilela, Fernanda Maria Pinto

Avaliação *in vivo* de formulações fotoprotetoras comerciais e estudo do potencial anticarcinogênico do extrato de soja biotransformado em células de melanoma humano. Ribeirão Preto, 2013.

69 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Medicamentos e cosméticos.

Orientador: Fonseca, Maria José Vieira.

1. Fotoproteção. 2. Glutathione reduzida. 3. Superóxido dismutase. 4. Mieloperoxidase. 5. Citocinas. 6. Extrato de soja. 7. Apoptose. 8. Melanoma.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda Maria Pinto Vilela

Avaliação *in vivo* de formulações fotoprotetoras comerciais e estudo do potencial anticarcinogênico do extrato de soja biotransformado em células de melanoma humano

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico aos meus pais Sérgio
e Miriam, à minha irmã
Marcela e ao meu namorado
Filipe.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca pela oportunidade de aprendizado e de crescimento profissional, pelo apoio e incentivo sempre. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Hasan Mukhtar do Departamento de Dermatologia da University of Wisconsin-Madison pela supervisão e maravilhosa oportunidade de realização do estágio de Doutorado Sanduíche, e a todos os pesquisadores do Departamento de Dermatologia em especial à Dra. Deebea Syed.

À pesquisadora Laura Castro Calvo do Laboratório de Engenharia de Tecidos do Instituto Tecnológico da Costa Rica pela parceria e aprendizado durante o período do estágio de Doutorado Sanduíche.

Ao Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha do Departamento de Farmacologia da FMRP/USP pela valiosa contribuição ao desenvolvimento desse projeto.

A todos os amigos do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos e da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelos bons momentos, ajuda e pela troca de experiências e conhecimento.

Ao técnico do laboratório de Controle de Qualidade, José Roberto Jabor, pela dedicação e amizade.

Ao funcionário Reinaldo F. Batista, pelo auxílio técnico prestado.

Às funcionárias da seção de pós-graduação da FCFRP-USP, Eleni Angeli Passos e Rosana Ferreira L.S. Florêncio pela eficiência, disponibilidade e dedicação nos serviços prestados e aos funcionários da FCFRP-USP pelo auxílio e pelos momentos de boa convivência.

Aos familiares e amigos que torcem e vibram a cada conquista. À minha irmã Marcela pela força e alegria de todos os dias e ao meu namorado Filipe pelo incentivo, companheirismo e compreensão.

Aos meus pais Sérgio e Miriam pelo amor, dedicação, apoio e por serem os principais responsáveis por mais esta conquista.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da Bolsa de Doutorado e ao Programa Ciência Sem Fronteiras – CNPq pela oportunidade e auxílio financeiro para a realização do estágio de Doutorado Sanduíche no exterior.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

VILELA, F.M.P. **Avaliação *in vivo* de formulações fotoprotetoras comerciais e estudo do potencial anticarcinogênico do extrato de soja biotransformado em células de melanoma humano.** 2013. 69f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Apesar de vários avanços no combate ao câncer, a incidência do câncer de pele tipo melanoma e a mortalidade relacionada a essa doença tem aumentado. Considerando-se que a radiação ultravioleta (UV) é o principal agente causador de diversos danos à pele, inclusive o câncer de pele, é de grande importância medir de forma adequada as propriedades fotoprotetoras dos filtros solares. Diante dos problemas provocados pelo uso de filtros solares, as pesquisas têm se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com propriedades antioxidantes visto que já foi demonstrado que muitos desses agentes naturais possuem efeitos anticarcinogênico, e antimutagênico. Assim, um dos objetivos desse trabalho foi a avaliação de três formulações fotoprotetoras comerciais por meio de parâmetros bioquímicos não comumente utilizados, mas que refletem o efeito dessas formulações no sistema antioxidante natural da pele e também no processo inflamatório induzido pela radiação UV. Esses efeitos foram mensurados *in vivo* em camundongos *sem pelos*, utilizando-se como marcadores o antioxidante não enzimático glutathiona reduzida (GSH), enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), a enzima mieloperoxidase (MPO) e as citocinas IL-1 β e TNF- α . Outro importante objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de um extrato de soja biotransformado (ESB) pelo fungo *A. awamori* em células de melanoma humano das linhagens 451LU e A375, altamente metastáticas, e estudar os mecanismos de ação pelos quais o extrato induz a morte celular por apoptose nestas células e também avaliar o potencial desse extrato para a prevenção e tratamento do câncer de pele. Os resultados mostraram que com relação ao processo inflamatório induzido pela radiação UVB, verificou-se que o FPS, apesar de avaliar somente o eritema, é um bom indicador do nível de proteção da pele, uma vez que todas as formulações apresentaram um potencial protetor contra o aumento da atividade da MPO e liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α . No entanto, as formulações não forneceram proteção contra a depleção do antioxidante endógeno GSH e, apesar de possuírem mesmo FPS 15 essas formulações apresentaram diferentes níveis de proteção com relação à redução da atividade da enzima SOD induzida pela radiação UV. Os resultados referentes ao estudo do ESB mostraram que o tratamento das células de melanoma altamente invasivas com o extrato resultou em inibição do crescimento/viabilidade das células associado com a indução de apoptose. As análises revelaram que o ESB resultou em indução da clivagem de PARP e ativação das caspases-3, -7 e -8; aumento da expressão de TNF-R2 e da expressão de TRAIL e do receptor DR4. Além disso, o tratamento das células de melanoma com o extrato ESB aumentou a fosforilação e ativação de IKK, degradação de I κ B α e translocação de p65/NF κ B para o núcleo. Apesar de ser geralmente aceito que a ativação do NF- κ B seja responsável pela resistência à apoptose, neste estudo foi demonstrado que a estimulação da via do NF- κ B é necessária pela indução da apoptose mediada pelo extrato ESB. Finalmente, conclui-se que as formulações fotoprotetoras devem ser avaliadas de forma mais profunda, empregando-se diferentes métodos a fim de se garantir formulações mais eficazes tanto contra os danos induzidos tanto pela radiação UVB quanto pela radiação UVA. Além disso, esses estudos identificaram uma atividade anticâncer do extrato ESB que é altamente relevante para a quimioprevenção/quimioterapia contra o câncer de pele tipo melanoma.

Palavras-chave: Fotoproteção, Glutathiona reduzida, Superóxido dismutase, Mieloperoxidase, Citocinas, Extrato de soja, Apoptose, Melanoma.

ABSTRACT

VILELA, F.M.P. ***In vivo* evaluation of marketed photoprotective formulations and anticancer potential study of biotransformed soy extract in human melanoma cells.** 2013. 69f. Thesis (Doctorate). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Despite several advances in fighting cancer, the incidence of melanoma type skin cancer and the mortality related to this disease have increased. Considering that ultraviolet radiation (UV) is the main causative agent of various skin damages, including skin cancer, it is of great importance to adequately measure the photoprotective properties of sunscreens. Considering the problems caused by the use of sunscreens, researches have been focused towards finding natural products with antioxidant properties as it has been shown that many of these natural agents possess anticarcinogenic and antimutagenic effects. Thus, an objective of this study was to evaluate three marketed photoprotective formulations through biochemical parameters not commonly used, but which reflect the effect of these formulations on the skin's natural antioxidant system and also in the inflammatory process induced by UV radiation. These effects were measured *in vivo* in *hairless* mice, employing as markers reduced glutathione (GSH), a non-enzymatic antioxidant; superoxide dismutase (SOD), an antioxidant enzyme; myeloperoxidase (MPO) enzyme and IL-1 β and TNF- α cytokines. Another important objective of this study was to evaluate the effect of a biotransformed soy extract (BSE) by the *A. awamori* fungus against 451LU and A375 human melanoma cell strains, highly metastatic, and to study the action mechanisms by which the extract induces cell death by apoptosis in these cells; in addition it was intended to evaluate the potential of this extract for the prevention and treatment of skin cancer. The results demonstrated that regarding the inflammatory process induced by UVB irradiation, it was found that the FPS, although only assessing the erythema, is a good indicator of the level of skin protection, since all formulations showed a protector potential against the increased MPO activity and the release of IL-1 β and TNF- α pro-inflammatory cytokines. Nevertheless, the formulations did not provide protection against the depletion of the GSH endogenous antioxidant and, despite having the same nominal SPF (SPF=15), these formulations showed different levels of protection with respect to the reduction of SOD activity induced by UV radiation. The results of the BSE study demonstrated that the treatment of highly invasive melanoma cells with the extract resulted in the cell growth/viability inhibition associated with the induction of apoptosis. The analysis revealed that BSE resulted in induction of PARP cleavage and activation of caspase-3, -7 and -8, increased expression of TNF-R2 and expression of TRAIL and DR4 receptor. Furthermore, the treatment of melanoma cells with BSE extract increased phosphorylation and activation of IKK, degradation of I κ B α and translocation of p65/NF κ B to the nucleus. Although it is generally accepted that the activation of NF- κ B is responsible for resistance to apoptosis, this study demonstrated that the stimulation of NF- κ B is required for the induction of apoptosis mediated by BSE extract. Finally, it is concluded that the photoprotective formulations should be more deeply evaluated, using different methods in order to ensure more effective formulations against damages induced both by UVB radiation and UVA radiation. In addition, these studies identified an anticancer activity of the BSE extract that is highly relevant to chemoprevention/chemotherapy against melanoma type skin cancer.

Keywords: Photoprotection, Reduced glutathione, Superoxide dismutase, Myeloperoxidase, Cytokines, Soybean Extract, Apoptosis, Melanoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfis de absorvância na faixa de comprimento de onda de 240-440 nm das soluções etanólicas (0,2 mg/mL) das formulações F1, F2 e F3 antes (linha cheia) e após (linha tracejada) a exposição à radiação UV (2,87 J/cm ²).....	13
Figura 2. Perfis cromatográficos da formulação fotoprotetora F1 antes (A) e após (B) a exposição à radiação ultravioleta (2,87 J/cm ²), seguido da extração com etanol e diluído até a concentração de 0,2 mg/mL.....	15
Figura 3. Perfis cromatográficos da formulação fotoprotetora F2 antes (A) e após (B) a exposição à radiação ultravioleta (2,87 J/cm ²), seguido da extração com etanol e diluído até a concentração de 0,2 mg/mL.....	15
Figura 4. Perfis cromatográficos da formulação fotoprotetora F3 antes (A) e após (B) a exposição à radiação ultravioleta (2,87 J/cm ²), seguido da extração com etanol e diluído até a concentração de 0,2 mg/mL.....	16
Figura 5. Avaliação <i>in vivo</i> dos níveis de GSH na pele de animais tratados com as formulações comerciais e expostos à radiação UV.....	19
Figura 6. Avaliação da atividade da SOD na pele de camundongos sem pelos.....	23
Figura 7. Avaliação da atividade da MPO na pele de camundongos sem pelos.....	27
Figura 8. Concentração de IL-1b na pele de camundongos sem pelos expostos à radiação ultravioleta.....	29
Figura 9. Concentração de TNF- α na pele de camundongos sem pelos expostos à radiação ultravioleta.....	30
Figura 10. Sinalização da morte celular por apoptose.....	44
Figura 11. Efeito dos extratos ESB e ESNB no crescimento/viabilidade de linhagens celulares de melanoma 451Lu e A375.....	53
Figura 12. Tratamento com ESB induz apoptose nas células de melanoma A375.....	55
Figura 13. Efeito do ESB na expressão das proteínas caspase-9, BID e Bax.....	56
Figura 14. Efeito do extrato ESB na expressão das proteínas caspase-8 e caspase-7.....	58
Figura 15. Efeito do tratamento das células A375 com o extrato ESB na expressão de receptores de morte apoptóticos.....	59
Figura 16. Efeito do ESB na expressão da proteína TRAIL e indução de apoptose.....	61
Figura 17. Efeito do tratamento com ESB na ativação do NF- κ B.....	62
Figura 18. Efeito da inibição do NF- κ B no processo de apoptose induzido pelo ESB.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingredientes ativos adicionados às formulações fotoprotetoras F1, F2 e F3 conforme descrição dos rótulos.....	7
Tabela 1. Quantidade dos filtros UV analisados presentes na epiderme e derme dos camundongos após 1 hora da aplicação das formulações F1, F2 e F3.....	17

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UV	Ultravioleta
FPS	Fator de proteção solar
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ESB	Extrato de soja biotransformado
ESNB	Extrato de soja não biotransformado
UVA	Radiação ultravioleta A
UVB	Radiação ultravioleta B
UVC	Radiação ultravioleta C
DNA	Deoxyribonucleic acid/Ácido desoxirribonucléico
CPDs	Dímeros de pirimidina ciclobutano
BP-3	Benzofenona-3
OMC	Octilmetoxicinamato
OS	Salicilato de octila
TiO ₂	Dióxido de titânio
ZnO	Óxido de zinco
PPP	Persistent pigment darkening
FDA	Food and Drug Administration
EGTA	Ácido tetracético de etileno-glicol
HTAB	Brometo hexadeciltrimetilamônio
ELISA	Ensaio imunoenzimático
GSH	Glutathione reduzida
SOD	Superóxido dismutase
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TNF	Fator de necrose tumoral
FADD	Fas adaptor death domain
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
NF- κ B	Fator nuclear kappa B

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	iv
Lista de Abreviaturas e Siglas	v
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. CAPÍTULO 1 - Avaliação <i>in vivo</i> da proteção biológica de formulações fotoprotetoras comerciais.....	3
2.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
2.1.1 Formulações comerciais testadas.....	7
2.1.2 Estudo de fotoestabilidade: Espectro de absorção e perfis cromatográficos.....	8
2.1.3 Estudo de retenção cutânea <i>in vivo</i>	8
2.1.4 Avaliação <i>in vivo</i> das formulações fotoprotetoras comerciais.....	9
2.1.4.1 Irradiação dos camundongos.....	9
2.1.4.2 Quantificação do antioxidante endógeno GSH.....	10
2.1.4.3. Quantificação da enzima superóxido dismutase.....	11
2.1.4.4 Avaliação da eficácia anti-inflamatória pela medida da atividade da mieloperoxidase.....	11
2.1.4.5 Dosagem das citocinas IL-1 β e TNF- α	11
2.1.5 Análise estatística dos resultados.....	12
2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
2.2.1 Estudo de fotoestabilidade: Espectros de absorção e cromatogramas das formulações.....	13
2.2.2 Estudos de retenção cutânea <i>in vivo</i>	17
2.2.3 Avaliação <i>in vivo</i> das formulações fotoprotetoras comerciais.....	18
2.2.3.1 Quantificação do antioxidante endógeno GSH.....	18
2.2.3.2 Quantificação da enzima superóxido dismutase (SOD).....	21
2.2.3.3 Avaliação da eficácia anti-inflamatória pela medida da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	26
2.2.3.4 Quantificação das citocinas TNF- α e IL-1 β	28
2.3 CONCLUSÕES.....	32

2.4 REFERÊNCIAS.....	34
3. CAPÍTULO 2 – Inibição do crescimento /viabilidade de células de melanoma humano e indução de apoptose mediada pelo extrato de soja biotransformada (ESB).....	42
3.1 INTRODUÇÃO.....	42
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.2.1 Anticorpos e Reagentes.....	46
3.2.2 Cultivo celular.....	46
3.2.3 Obtenção do extrato de soja biotransformada (ESB) e do extrato de soja não biotransformada (ESNB).....	46
3.2.4 Ensaio de citotoxicidade celular.....	47
3.2.5 Ensaio de apoptose.....	48
3.2.6 Preparo do lisado celular total.....	48
3.2.7 Preparo dos lisados celulares citosólicos e nucleares.....	49
3.2.8 Western blotting.....	50
3.2.9 Imunocitoquímica.....	50
3.2.10 Transfecção das células A375 com TRAIL si-RNA.....	51
3.2.11 Inibição da ativação do NF- κ B.....	51
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
3.3.1 Citotoxicidade celular.....	53
3.3.2 ESB induz apoptose em células de melanoma A375.....	54
3.3.3 ESB não induz ativação da caspase-9.....	55
3.3.4 ESB induz a ativação da caspase-7 e caspase-8.....	57
3.3.5 ESB induz aumento na expressão dos receptores de morte apoptóticos em células A375.....	58
3.3.6 Efeito do silenciador TRAIL si-RNA na indução de apoptose por ESB em células A375.....	60
3.3.7 ESB induz ativação de NF- κ B nas células A375.....	61
3.3.8 A inibição da ativação de NF- κ B inibe a apoptose induzida por ESB em células de melanoma A375.....	63
3.4 CONCLUSÕES.....	65
3.5 REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO GERAL

Apesar de vários avanços no combate ao câncer, a incidência do câncer de pele tipo melanoma e a mortalidade relacionada a essa doença tem aumentado nas últimas três décadas. O melanoma ocorre predominantemente na população branca e as taxas de incidência são particularmente altas no norte da Europa, Estados Unidos e Austrália. A Austrália apresenta a maior incidência de melanoma no mundo, sendo a taxa de incidência duas vezes maior do que a dos Estados Unidos (LITTLE; EIDE, 2012; MORENO et al., 2012).

O câncer de pele é o tipo mais frequente no Brasil e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados país. O tipo melanoma representa 4% das neoplasias malignas da pele e é considerado o mais grave devido à alta possibilidade de metástase. No Brasil, a estimativa de novos casos de melanoma no ano de 2012 foi de 6.230, sendo 3.170 homens e 3.060 mulheres (INCA, 2012).

A radiação ultravioleta (UV) é considerada o maior agente carcinogênico para todos os tipos de câncer de pele. Apesar dos esforços para educar a população geral sobre as estratégias para prevenção do câncer de pele, tais como evitar a exposição ao sol e o uso de filtros solares com alto fator de proteção solar (FPS) a falta de adesão ainda é um problema no combate ao câncer de pele (F'GUYER; AFAQ; MUKHTAR, 2003; NARENDHIRAKANNAN; HANNAH, 2013).

Além disso, já foi demonstrado que os filtros solares penetram na pele podendo induzir espécies reativas de oxigênio (EROs) (HANSON; GRATTON; BARDEEN, 2006), e que o uso de formulações fotoprotetoras provoca um aumento nos tempos de exposição à radiação UV (AUTIER et al., 1999), o que representa uma situação perigosa para a saúde da pele.

Em função dos possíveis problemas provocados pelo uso de filtros solares, as pesquisas têm se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles, visto que já foi demonstrado que muitos desses agentes antioxidantes naturais possuem efeitos anticarcinogênico, antimutagênico e baixa toxicidade (GUARANTINI; MEDEIROS; COLEPICOLA, 2007).

Diante da questão principal desta tese que aborda a fotoproteção e o câncer de pele, esse estudo foi dividido em duas partes que serão abordados em 2 capítulos. A primeira parte aborda o estudo de avaliação das formulações fotoprotetoras comerciais por meio de

parâmetros bioquímicos não comumente utilizados, mas que refletem o efeito dessas formulações no sistema antioxidante natural da pele e também no processo inflamatório induzido pela radiação UV.

No primeiro capítulo foi abordado o estudo do efeito de formulações fotoprotetoras comerciais na pele exposta a radiação UV. Considerar o eritema como a única resposta *in vivo* à radiação UV não reflete a ação protetora dos filtros solares contra as outras respostas como a imunossupressão, a depleção do sistema antioxidante, o fotoenvelhecimento e a carcinogênese. Portanto, nesse estudo de avaliação dos parâmetros bioquímicos na pele tratada com as formulações e exposta à radiação UV, o principal objetivo foi mostrar a necessidade da avaliação de outros parâmetros além do eritema nas etapas de desenvolvimento de novos produtos e métodos para avaliação da eficácia das formulações fotoprotetoras.

A segunda parte desta tese tem um caráter mais inovador e tem como principal objetivo a busca por uma nova estratégia de prevenção e tratamento do câncer de pele a partir da utilização de um produto natural, o extrato de soja biotransformada (ESB).

O segundo capítulo aborda o estudo do efeito de um extrato de soja biotransformado pelo fungo *A. awamori* sobre células de melanoma humano. Estudos anteriores realizados no laboratório mostraram que o extrato de soja ESB desenvolvido no laboratório apresentou citotoxicidade seletiva para as células de melanoma de camundongos linhagem B16F10 em comparação com a linhagem de fibroblastos L929 e, além disso, induziu morte celular por apoptose destas células cancerosas. Portanto, o presente estudo visou avaliar o efeito desse extrato em células de melanoma humano, altamente metastáticas, e estudar os mecanismos de ação pelos quais o extrato induz a morte celular por apoptose nestas células e também avaliar o potencial desse extrato para a prevenção e tratamento do câncer de pele.

2. CAPÍTULO 1 - Avaliação *in vivo* da proteção biológica de formulações fotoprotetoras comerciais

A exposição à radiação UV é conhecidamente um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pele, tanto do tipo melanoma como o não melanoma. A radiação UV é dividida em UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) e UVC (200-280 nm). Aproximadamente toda a radiação UVC é absorvida pela camada de ozônio e dentre a radiação que atinge a superfície terrestre, aproximadamente 6% é UVB e 94% é UVA. A radiação UVB é aproximadamente 1000 vezes mais energética que a UVA e atinge somente a epiderme, enquanto que a UVA atinge também a derme (SUMMERER; KANG; WANG, 2012).

O principal mecanismo pelo qual a radiação UVA causa danos à pele é via formação das EROs. As EROs alteram drasticamente a função celular pela oxidação dos lipídeos das membranas biológicas alterando a fluidez e diminuindo a eficiência do transporte transmembrana; interação com proteínas; fragmentação e mutação da estrutura do DNA nuclear e mitocondrial, favorecendo o fotoenvelhecimento cutâneo, a imunossupressão, bem como, a patogênese do melanoma (CHEN; HU; WANG, 2012).

Portanto, grande parte da ação mutagênica e carcinogênica da radiação UVA é mediada pelas EROs (NICHOLS; KATIYAR, 2010). Além disso, a radiação UVA é responsável também por efeitos imunossupressores (KOCHEVAR; PATHAK; PARRISH, 1993).

A radiação UVB atinge até a camada basal da epiderme onde leva formação dos ciclobutanos de pirimidina (CPDs) e os fotoprodutos (6-4)-pirimidina-pirimidona (6-4PPs). Esses fotoprodutos são responsáveis por grandes distorções na estrutura da dupla hélice do DNA interferindo em mecanismos constitutivos da célula como a replicação e a transcrição, ameaçando assim a viabilidade celular e contribuindo para processos mutagênicos e tumorigênicos (MITCHEL; HOEIJMAKERS; NIEDERNHOFER, 2003).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, limitar o tempo de exposição ao sol, especialmente nos horário de maior incidência de radiação UV (entre 10h e 16h); usar roupas e acessórios adequados, tais como chapéus e óculos de sol e, principalmente, utilizar protetores solares de pleno espectro são medidas básicas para a redução dos danos causados à pele devido à exposição ao sol (WHO, 1994).

Os protetores solares são preparações destinadas ao uso tópico, contendo filtros solares, que protegem a pele contra a queimadura causada pela exposição à radiação UV. Atualmente, os filtros solares estão divididos em duas grandes categorias: agentes orgânicos (químicos) e inorgânicos (físicos) que são capazes de absorver ou refletir a radiação, respectivamente (LAUTENSCHLAGER; WULF; PITTELKOW, 2007).

Nos filtros orgânicos estão presentes compostos orgânicos, enquanto que nos inorgânicos estão presentes os óxidos metálicos. Geralmente, os compostos orgânicos protegem a pele pela absorção da radiação e os inorgânicos, pela reflexão. Os filtros físicos compreendem os óxidos metálicos, como o dióxido de titânio (TiO_2) e o óxido de zinco (ZnO) que são muito eficientes, fotoestáveis, e oferecem proteção na faixa de comprimento de onda que vai do UVA até o visível com potencial de irritação e sensibilização quase insignificante. No entanto, essas moléculas quando aplicadas na pele causam um branqueamento indesejável (ANTONIOU et al., 2008).

Os filtros orgânicos são formados por moléculas capazes de absorver a radiação UV altamente energética e transformá-la em radiações menos energéticas e inofensivas ao ser humano. Estas moléculas são, essencialmente, compostos aromáticos com grupos carboxílicos aceptores de elétrons, e no geral, apresentam um grupo doador de elétrons, como uma amina ou um grupo metoxila na posição orto ou para do anel aromático (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007).

A eficácia dos filtros solares deveria ser medida pelo grau de eficácia de proteção contra o câncer de pele, no entanto, como esses estudos são de difícil realização, são utilizados outros parâmetros em substituição, tais como o FPS e o *Persistent Pigment Darkening* (PPD) (MULLIKEN; RUSSAK; RIGEL, 2012).

O FPS é um parâmetro que indica a divisão entre o tempo que causa a vermelhidão na pele usando o filtro solar (2 mg/cm^2 de filtro solar na pele) pelo tempo que leva para causar a vermelhidão sem o filtro solar. Uma vez que a radiação que causa a queimadura na pele é a UVB, o FPS é uma medida da proteção fornecida pelo filtro solar somente contra a radiação UVB (MULLIKEN; RUSSAK; RIGEL, 2012; SAYRE et al., 1978).

Com relação à radiação UVA, a Academia Americana de Dermatologia (2009) recomenda que a resposta à PPD deve ser utilizada para medir a proteção fornecida pelo protetor solar contra essa radiação. Trata-se de um método *in vivo* que avalia a resposta da pigmentação tardia da pele após a exposição à radiação UVA de 2 a 4 horas. O fator de proteção UVA de um filtro solar deve refletir em um aumento de 10 vezes na dose de radiação UVA necessária para induzir a PPD. Além disso, a razão da proteção UVA/UVB

deve ser de no mínimo 1:3, e somente formulações que oferecem essa proteção UVA/UVB podem ser designadas como sendo de amplo espectro de proteção.

Com o objetivo de auxiliar os consumidores na escolha e no uso apropriados dos filtros solares, o FDA (Food and Drug Administration) liberou em junho de 2011 uma série de normas que entraram em vigor em junho de 2012, que estabelecem as informações que devem constar no rótulo dos filtros solares. Com isso, ficou estabelecido que os produtos fotoprotetores deverão passar por testes padrões para determinar se são capazes de fornecer proteção contra as radiações UVA e UVB para que possam ser rotulados como sendo de amplo espectro de proteção. Além disso, somente os filtros solares de amplo espectro que possuírem um FPS igual ou maior que 15 poderão conter no rótulo a alegação de reduzirem o risco do câncer de pele e do envelhecimento precoce se utilizado em conjunto com outras medidas de proteção contra a radiação solar.

Os fabricantes também não poderão alegar que o filtro solar é a prova d'água ou suor, uma vez que essas alegações superestimam a eficácia dos filtros solares. A menos que os fabricantes submetam dados para aprovação do FDA, os rótulos não poderão garantir proteção logo após aplicação nem por mais de 2 horas após a aplicação. Para a alegação de resistente à água, o FPS do filtro solar deve se manter efetivo por 40 minutos ou 80 minutos após contanto com a água ou suor, com base em testes padrões (PRINTZ, 2012).

Considerando-se que a radiação UV é o principal agente causador de diversos danos à pele, é de grande importância medir de forma adequada as propriedades fotoprotetoras dos filtros solares a fim de se prevenir os danos causados pela exposição à radiação solar. Como mencionado anteriormente, a avaliação da eficácia da fotoproteção dos filtros solares é feita principalmente a partir da observação do eritema formado na pele humana e expresso como FPS e também pelo PPD, que corresponde à oxidação da melanina e seus precursores pela radiação UVA. No entanto, uma grande preocupação com relação à essas formas de avaliação é que esses parâmetros não refletem outros efeitos deletérios da radiação UV tais como a imunossupressão, o fotoenvelhecimento, a mutagênese e a carcinogênese (MOURET et al., 2011; SCHUCH et al., 2013).

Estudos recentes têm proposto a avaliação das propriedades de fotoproteção dos filtros solares pela medida dos danos ao DNA como forma de abranger outros efeitos danosos da radiação além do eritema (MOURET et al., 2011).

Portanto, no presente estudo foi avaliada *in vivo* a capacidade das formulações comerciais em proteger a pele contra os efeitos biológicos induzidos pela radiação UV, quando aplicados topicamente na pele avaliando-se parâmetros bioquímicos importantes não

comumente utilizados. O principal objetivo foi avaliar se o FPS das formulações fotoprotetoras reflete a mesma proteção quando são avaliados outros parâmetros, isto é, se formulações que apresentam o mesmo FPS fornecem a mesma proteção quando são avaliados outros danos causados à pele pela radiação UV. Esses efeitos foram mensurados utilizando-se como marcadores o antioxidante não enzimático glutathione reduzida (GSH) e a enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), presentes naturalmente na pele. Além disso, foram avaliadas a enzima mieloperoxidase (MPO), indicadora de processo inflamatório, e a liberação das citocinas IL-1 β e TNF- α .

Considera-se que estudos mais aprofundados sobre a segurança, eficácia e absorção dos filtros solares nas etapas de desenvolvimento desses produtos são de grande importância para o entendimento das interações envolvidas com o uso das formulações fotoprotetoras que são amplamente utilizadas na proteção contra os danos provocados pela radiação UV.

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 Formulações comerciais testadas

Foram investigadas nesse estudo 3 formulações fotoprotetoras (F1, F2 e F3) disponíveis comercialmente no Brasil. Todos os produtos selecionados apresentam o mesmo fator de proteção solar FPS 15, porém são constituídos de diferentes componentes ativos conforme indicado nos rótulos.

Tabela 1. Ingredientes ativos adicionados às formulações fotoprotetoras F1, F2 e F3 conforme descrição dos rótulos.

F1	F2	F3	Espectro de ação
3-Benzofenona	3-Benzofenona	3-Benzofenona	UVB e UVA2
Octilmetoxicinamato	Octilmetoxicinamato	Octilmetoxicinamato	UVB
-	Salicilato de octila	Salicilato de octila	UVB
-	Homossalato	-	UVB
-	Avobenzona	Avobenzona	UVA1 e UVA2
-	-	Octil triazona	UVB
-	-	Octocrileno	UVB e UVA2
-	-	Bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina	UVB e UVA
-	-	Dióxido de titânio	UVB, UVA1 e UVA2

UVB: 280-320 nm; UVA2: 320-340 nm; UVA1: 340-400 nm (GASPARRO; MITCHNICK; NASH, 1998; WANG; BALAGULA; OSTERWALDER, 2010).

Além dos filtros solares as formulações são adicionadas também de compostos antioxidantes. A formulação F1 é adicionada de vitamina E, aloe vera e óleo de jojoba. A formulação F2 é adicionada de extrato de licorice e betacaroteno e a formulação F3 apresenta vitamina E na composição.

2.1.2 Estudo de fotoestabilidade: Espectro de absorção e perfis cromatográficos

As amostras das formulações F1, F2 e F3 foram espalhadas em uma área de vidro de 20 cm² (aproximadamente 2 mg/cm²) e permaneceram por 30 minutos antes da exposição à radiação UV. Foi utilizada a dose de 2,87 J/cm² nos estudos de fotoestabilidade das formulações comerciais para que fosse possível estabelecer uma relação com os resultados obtidos nos estudo *in vivo*, nos quais foi utilizada essa dose no processo de irradiação dos animais.

A fonte de irradiação UV consistiu de uma lâmpada Philips TL/12RS 40W (Medical-Holand), que emite radiação na faixa de comprimento de onda de 270 a 400 nm com pico máximo de emissão em torno de 313 nm, resultando em uma dose de irradiação de 0.27 mW/cm² conforme medida a 20 cm da fonte UV utilizando radiômetro IL 1700 (Newburyport, MA, USA) equipado com detectores UVB e UV total. A radiação UVB corresponde a 78% da radiação UV total emitida.

As formulações irradiadas e não-irradiadas foram diluídas em etanol até que se atingisse a concentração final de 0.2 mg/mL. Para a obtenção dos espectros de absorção as soluções foram analisadas em espectrofotômetro na faixa de comprimento de onda de 200-440 nm.

Os filtros solares presentes nas soluções foram quantificados por HPLC utilizando-se cromatógrafo líquido Shimadzu (Kioto, Japão), modelo LC-10AT, acoplado a detector UV/VIS, modelo SPD-10A, integrador modelo C-R6A e injetor Rheodyne. Foi utilizada coluna SupelcosilTM LC-18 (25 cm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), protegida por uma pré-coluna C-18 (4 x 4 mm, Merck). O método cromatográfico foi desenvolvido a partir de modificações dos métodos de Gaspar e Maia Campos (2006) e Santoro et al., (2005). A fase móvel constituiu-se por metanol:água (84:16 v/v) acidificada com ácido acético glacial 0,1% em fluxo de 1,0 mL/min. O volume injetado foi de 20 µL e a detecção foi feita no comprimento de onda de 305 nm.

2.1.3 Estudo de retenção cutânea *in vivo*

Todos os experimentos *in vivo* foram realizados utilizando camundongos *hairless* (sem pelos) da linhagem HRS/J, machos ou fêmeas, com três meses de idade. Os animais,

pesando aproximadamente 30 g, foram criados no biotério da FCFRP-USP mantidos a 20-25°C, com livre acesso de água e comida, 4 trocas de ar/hora e ciclos claro/escuro de 12 h. Todos os experimentos realizados com animais foram conduzidos com aprovação da comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade de São Paulo – campus de Ribeirão Preto (Protocolo nº 10.1.811.53.1).

Quantidades de 10 mg das formulações comerciais F1, F2 ou F3 foram aplicadas no dorso nos animais em uma área delimitada de 1.77 cm². Uma hora após a aplicação das formulações os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono e a área da pele na qual as formulações foram aplicadas foram removidas e submetidas ao processo de *tape stripping* para retirada do estrato córneo. Os filtros UV presentes na epiderme e derme foram extraídos com metanol, a solução foi filtrada em membrana de 0.45 µm e os filtros 3-benzofenona (BP-3), octilmetoxicinamato (OMC) e salicilato de octila (OS) foram quantificados por HPLC conforme metodologia descrita previamente (VILELA et al., 2012).

2.1.4 Avaliação *in vivo* das formulações fotoprotetoras comerciais

2.1.4.1 Irradiação dos camundongos

A fonte de luz consistiu de uma lâmpada ultravioleta UVB fluorescente modelo Philips TL/RS 40W (Medical-Holand) que emite radiação na faixa de 270-400 nm com pico máximo de emissão em 313 nm. A lâmpada fica instalada em um compartimento de madeira desenvolvido para a indução de estresse oxidativo na pele dos animais (CASAGRANDE, 2006). A medida da irradiância da lâmpada foi realizada com auxílio de radiômetro IL 1700 (Newburyport, MA, USA) equipado com detector UVB (SED 240) e UV (SED 005).

Os camundongos *sem pelos* foram divididos em 5 grupos (n=6): Grupo 1: controle não irradiado (CNI), Grupo 2: controle irradiado (CI), Grupo 3: tratado com a formulação F1 e irradiado; Grupo 4: tratado com a formulação F2 e irradiado, Grupo 5: tratado com a formulação F3 e irradiado. O protocolo de tratamento consistiu na aplicação tópica de 30 mg das formulações 1 hora antes da irradiação dos animais.

Os grupos de animais expostos à radiação foram colocados em compartimento de madeira contendo a lâmpada e expostos à radiação durante 3 horas, que corresponde à dose de

2,87 J/cm². Essa dose de radiação foi reportada em estudos anteriores realizados no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos – FCFRP-USP por Casagrande e colaboradores (2006) e Vicentini e colaboradores (2008) como sendo uma dose a qual induz a depleção de GSH e indução da secreção/liberação de metaloproteinases.

Após 3 ou 6 horas do término da irradiação, os animais foram sacrificados por inalação de CO₂ e a morte foi comprovada pela ausência de batimentos cardíacos. As peles do dorso dos animais foram removidas, lavadas com solução de NaCl 0,9% e congeladas em nitrogênio líquido. Para a quantificação do GSH e enzima superóxido dismutase os animais foram sacrificados após 6 horas do término da irradiação, enquanto que para a dosagem da enzima mieloperoxidase e citocinas o tempo utilizado foi de 3 horas após o fim da irradiação.

2.1.4.2 Quantificação do antioxidante endógeno GSH

Os níveis de GSH na pele do dorso dos animais foram determinados utilizando o ensaio de fluorescência previamente descrito por Hissin e Hilf (1976). As amostras de pele foram retiradas do congelamento, picotadas, pesadas e diluídas 1:3 em tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0, contendo EGTA 5 mM. Posteriormente, foram homogeneizadas em Turrax TE-102 (Turratec, São Paulo) durante 2 minutos a 21500 rpm. Para cada mililitro de tampão adicionado foram adicionados às amostras 200 µL de ácido tricloroacético 30 %. O homogeneizado foi centrifugado a 4000 rpm por 6 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubo eppendorf e novamente centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C obtendo-se a fração sobrenadante (CASAGRANDE et al., 2006).

Na determinação das quantidades de GSH, 100 µL da fração sobrenadante foram adicionados a 1 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 8,0), contendo EGTA 5 mM, seguido da adição de 100 µL de o-ftalaldeído (OPT) 1 mg/mL preparado em metanol. A fluorescência foi determinada após 15 min em 350 e 420 nm, para excitação e emissão, respectivamente, em espectrofotômetro de fluorescência Hitachi F-4500 (HISSIN; HILF, 1976). A fluorescência obtida foi utilizada para o cálculo das quantidades de GSH presentes nas amostras de pele, empregando-se a equação de regressão linear da curva analítica obtida plotando-se concentrações conhecidas de GSH padrão (Sigma[®]) (µM) versus unidades de fluorescência.

2.1.4.3. Quantificação da enzima superóxido dismutase

As amostras de pele foram picotadas e homogeneizadas com auxílio de ultra turrax a 21000 rpm, por 2 minutos, em solução tampão NaH_2PO_4 0,1 M (pH 8,0). A suspensão obtida foi centrifugada a 4000 rpm por 6 minutos a 4°C, obtendo-se as frações sobrenadantes.

A atividade da enzima superóxido dismutase foi determinada através da velocidade de redução do citocromo c pelos radicais superóxido, utilizando-se o sistema xantina-xantina oxidase como fonte de radical superóxido (McCORD; FRIDOVICH, 1969).

2.1.4.4 Avaliação da eficácia anti-inflamatória pela medida da atividade da mieloperoxidase

As amostras da pele do dorso após a irradiação dos animais foram coletadas e armazenadas a – 80°C em microtubos contendo tampão K_2HPO_4 (50 mM, contendo 0,5% HTAB, pH 6,0).

As peles foram homogeneizadas com auxílio do Polytron® (PT3100), seguida de centrifugação (2 min, 16100 g) a 4°C. Então, foi realizada dosagem por reação colorimétrica, na qual em uma placa de 96 poços foi adicionada uma alíquota do sobrenadante da amostra. Posteriormente, adicionou-se 200 µL da solução de reação contendo 52,64 mM de dihidroclorato de O-dianisidina, 0,05% de H_2O_2 30%, 90 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6.0 e 10 mL de H_2O destilada. As leituras foram realizadas em 450 nm (Aparelho Spectra MAX 250®, Molecular Devices), determinando-se assim o número de neutrófilos utilizando-se curva padrão de neutrófilos (BRADLEY et al., 1982).

2.1.4.5 Dosagem das citocinas IL-1β e TNF-α

Para a dosagem das citocinas os animais foram tratados com 30 mg das formulações, irradiados conforme procedimento descrito anteriormente e sacrificados após 3 horas do final da irradiação. Foi feita uma curva da dosagem das citocinas em função do tempo após o

término da irradiação e foi constatado que após 3 horas ocorria o pico máximo das citocinas, sendo então selecionado o tempo para esse estudo.

A massa de pele de aproximadamente 100 mg foi diluída e homogeneizada em 1 mL de PBS contendo EDTA e inibidores de proteases e as dosagens das citocinas TNF- α e IL-1 β foram determinadas por ELISA conforme descrito por Safieh-Garabedian et al., (1995). Os resultados foram expressos em picogramas de cada citocina por cada grama de tecido de pele.

2.1.5 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa de estatística GraphPad[®] (versão 3.02, 1999). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ erro padrão relativo (EPM) ou $\pm$ desvio padrão (DP), comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 Estudo de fotoestabilidade: Espectros de absorção e cromatogramas das formulações

A figura 1 mostra os perfis de absorvância das formulações F1, F2 e F3 antes e após a exposição à radiação UV. Todas as formulações foram consideradas fotoestáveis, uma vez que apresentaram um índice de área sob a curva (I_{AUC}) maior ou igual a 0.8. O I_{AUC} é a razão entre a área sob a curva do espectro de absorção depois da exposição à radiação e a área sob a curva antes da exposição (GONZALES et al., 2007).

Figura 1. Perfis de absorvância na faixa de comprimento de onda de 240-440 nm das soluções etanólicas (0,2 mg/mL) das formulações F1, F2 e F3 antes (linha cheia) e após (linha tracejada) a exposição à radiação UV (2,87 J/cm²).

As formulações F1 e F2 apresentaram um leve decréscimo nos espectros de absorção após a exposição à radiação UV. Considerando-se as áreas sob a curva dos espectros de absorção das formulações F1 e F2 irradiadas e não irradiadas na faixa de comprimento de onda que compreende a radiação UVB (280-320 nm) observou-se um decréscimo de 5,7 e 3,5%, respectivamente. Já na faixa de comprimento de onda da radiação UVA (320-400 nm), o decréscimo foi de 2,7 % para F1 e 1,5% para F2. Portanto, em ambas as formulações o decréscimo da absorção na faixa da radiação UVB foi maior do que na faixa do UVA, o que seria previsível, uma vez que a lâmpada utilizada emite aproximadamente 78% da radiação UVB e somente 12% da radiação UVA.

Sugere-se que essa diminuição na absorção da radiação UVB em ambas as formulações seja devido ao processo de fotodegradação sofrido pelo filtro solar octilmetoxicinamato, o que pode ser confirmado analisando-se os perfis cromatográficos das formulações antes e após a exposição à radiação UV (Figuras 2 e 3). Nas formulações F1 e F2, o único filtro solar que apresentou redução significativa na concentração após a exposição à radiação UV foi o octilmetoxicinamato em aproximadamente 25 e 15%, respectivamente. As figuras mostram o acúmulo do produto de degradação e o decréscimo do octilmetoxicinamato representados pelo aumento da área do pico no tempo de retenção de aproximadamente 13 minutos e redução da área do pico em 15 minutos, respectivamente.

Estudos já demonstraram que o filtro UVB trans-octilmetoxicinamato sofre isomerização do tipo cis-trans quando exposto a radiações de comprimentos de onda maiores que 300 nm originando a forma cis-octilmetoxicinamato que apresenta menor capacidade de absorção da radiação UV com consequente redução na atividade fotoprotetora (DAMIANI; BASCHONG; GRECI 2007, SCALIA et al., 2002, TARRAS-WAHLBERG, 1999).

Figura 2. Perfis cromatográficos da formulação fotoprotetora F1 antes (A) e após (B) a exposição à radiação ultravioleta ($2,87 \text{ J/cm}^2$), seguido da extração com etanol e diluído até a concentração de $0,2 \text{ mg/mL}$. Picos: 1 = 3-benzofenona, 2 = octilmetoxicinamato.

Figura 3. Perfis cromatográficos da formulação fotoprotetora F2 antes (A) e após (B) a exposição à radiação ultravioleta ($2,87 \text{ J/cm}^2$), seguido da extração com etanol e diluído até a concentração de $0,2 \text{ mg/mL}$. Picos: 1 = 3-benzofenona, 2 = octilmetoxicinamato, 3 = butil metoxidibenzoilmetano (avobenzona), 4 = salicilato de octila, 5 = homossalato.

Figura 4. Perfis cromatográficos da formulação fotoprotetora F3 antes (A) e após (B) a exposição à radiação ultravioleta ($2,87 \text{ J/cm}^2$), seguido da extração com etanol e diluído até a concentração de $0,2 \text{ mg/mL}$. Picos: 1 = 3-benzofenona, 2 = octocrileno, 3 = avobenzona, 4 = salicilato de octila.

A formulação F3 demonstrou ser a mais fotoestável. Não houve alteração na capacidade de absorção das radiações UVA e UVB após a exposição da formulação à radiação conforme demonstrado nos espectros de absorção (Figura 1). Os resultados de análise dos perfis cromatográficos confirmam a maior estabilidade da formulação F3 que não apresentou redução nas concentrações dos filtros solares analisados (Figura 3).

Em relação às formulações F1 e F2 a formulação F3 apresenta componentes fotoprotetores mais estáveis do que o octilmetoxicinamato tais como o octocrileno, bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina e salicilato de octila. Além disso, na formulação F3 existem associações entre os filtros UV que os estabilizam, tais como a presença do octocrileno que conhecidamente estabiliza a avobenzona por possuir um estado tripleto similar ao da avobenzona (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006; SAYRE et al, 2005).

Ao observar os espectros de absorção das formulações um importante destaque deve ser dado ao fato de que, apesar das formulações apresentarem o mesmo FPS 15, observa-se diferentes níveis de absorvância na faixa de comprimento de onda referente à radiação ultravioleta, apresentando, portanto, diferentes níveis de proteção UV. Considerando-se as áreas sob as curvas dos espectros de absorção (280-400 nm) observa-se que a formulação F2 oferece a maior absorção da radiação ($\text{AUC} = 100,20$) seguida das formulações F1 ($\text{AUC} = 82,58$) e F3 ($\text{AUC} = 54,91$).

Essa discrepância entre formulações com o mesmo FPS e diferentes perfis de espectros de absorção foi também observada em outros estudos que avaliaram a

fotoestabilidade de formulações comerciais com o mesmo FPS (HOJEROVA, MEDOVČÍKOVÁ; MIKULA, 2011; LEJUNE; CHRISTIAENS; BERNERD, 2008; PESCIA et al., 2012).

2.2.2 Estudos de retenção cutânea *in vivo*

O principal objetivo dos estudos de retenção cutânea foi verificar se os filtros solares presentes nas formulações comerciais seriam capazes de penetrar na pele dos camundongos *sem pelos* e também avaliar se esses filtros estariam presentes na epiderme viável no momento da irradiação. Os filtros UV 3-BZ, OMC e OS foram selecionados como indicadores da retenção cutânea, uma vez que esses filtros são amplamente utilizados no mundo e a habilidade desses filtros penetrarem na epiderme já é conhecida (GUPTA; ZATZ, REREK, 1999; TREFFEL; GABARD, 1996).

É importante ressaltar que os filtros solares devem permanecer na superfície da pele, cobrir o estrato córneo e criar uma barreira contra a radiação UV protegendo a pele sem penetrá-la para que não haja uma exposição sistêmica a esses agentes fotoprotetores (KLINUBOL; ASAWANONDA; WANICHWECHARUNGRUANG, 2008).

Entretanto, os resultados do presente estudo mostraram que após 1 hora da aplicação das formulações comerciais F1, F2 e F3, alguns dos filtros solares presentes nas formulações foram capazes de penetrar na epiderme viável (Tabela 1). Portanto, conclui-se que no momento em que os camundongos foram irradiados os filtros UV estavam presentes na epiderme e na derme.

Tabela 1. Quantidade dos filtros UV analisados presentes na epiderme e derme dos camundongos após 1 hora da aplicação das formulações F1, F2 e F3.

	F1	F2	F3
	Retenção ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Retenção ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Retenção ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
3-BZ	$6,72 \pm 1,75$	$4,81 \pm 0,10$	$3,76 \pm 1,44$
OMC	$39,65 \pm 12,65$	$12,90 \pm 2,69$	–
OS	–	$17,03 \pm 1,29$	$4,85 \pm 1,63$

Os resultados representam a média $\pm$ DP (n=6).

Comparando-se as retenções dos filtros BP-3 e OMC quando utilizadas as formulações F1 e F2, observa-se que apesar de ambas as formulações apresentarem a mesma quantidade desses filtros solares incorporados nas formulações (aproximadamente 5% de BP-3 e 8% de OMC), a formulação F1 promoveu a maior penetração desses filtros em relação à F2. A formulação F1 foi o que apresentou a maior penetração do filtro solar OMC, considerado bastante fotoinstável.

Estabelecendo-se uma comparação entre todas as formulações, a formulação F3 foi a que apresentou a menor capacidade de retenção dos filtros solares na epiderme e derme. Pelo fato da formulação F3 conter aproximadamente 2 vezes menos a quantidade dos filtros solares BP-3 e OS em relação à F2 (aproximadamente 5% de BP-3 e OS em F2, e 2% em F3), era esperado que a quantidade retida desses filtros na pele quando fosse utilizada a formulação F3 fosse aproximadamente a metade da quantidade obtida quando utilizada a formulação F2. No entanto, a quantidade do filtro OS retida na pele foi muito menor do que a quantidade esperada.

2.2.3 Avaliação *in vivo* das formulações fotoprotetoras comerciais

2.2.3.1 Quantificação do antioxidante endógeno GSH

Dentre os vários antioxidantes presentes na pele, a epiderme contém a glutathiona, um tripeptídeo hidrofílico, que reage rapidamente com espécies reativas e outros mediadores do estresse oxidativo na pele. O GSH pode ser considerado um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozônio, radiação e luz ultravioleta (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Atua como sequestrador direto dos radicais livres pela transferência de hidrogênio, atuando como cofator para a enzima GSH-peroxidase, que sequestra os peróxidos e regenera as vitaminas C e E (AFAQ; MUKHTAR, 2001; CARINI et al., 2000).

Uma vez que o GSH sozinho ou como co-fator de diversas enzimas (GSH peroxidases, redutases e GSH-S transferase) desempenham um papel muito importante no

sistema de defesa antioxidante da pele, o GSH foi escolhido como um parâmetro relevante para a quantificação do nível redox na pele (MELONY; NICOLAY, 2003).

Figura 5. Avaliação *in vivo* dos níveis de GSH na pele de animais tratados com as formulações comerciais e expostos à radiação UV. Onde, CNI = controle não irradiado, CI = controle irradiado, F1 = irradiado e tratado com a formulação F1, F2 = irradiado e tratado com a formulação F2 e F3 = irradiado e tratado com a formulação F3. Os resultados representam a média $\pm$ EPM (n=5 animais por grupo). *p<0,05 diferença significativa comparado ao grupo CI, usando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

Os resultados do presente estudo mostram uma redução significativa de 46,5% de GSH em função da radiação UVB ($2,87 \text{ J/cm}^2$), quando comparados os grupos controle irradiado e controle não irradiado (Figura 5). Esses resultados corroboram com estudos realizados anteriormente no laboratório por Casagrande (2006) e Vicentini e colaboradores (2008) que demonstraram que a radiação UVB induziu uma diminuição significativa dose dependente ($0,96 - 2,87 \text{ J/cm}^2$) nos níveis de GSH na pele de camundongos, a partir da dose de $1,96 \text{ J/cm}^2$.

Fuchs et al. (1989) também verificaram uma diminuição significativa imediata da GSH na pele de camundongos *sem pelos* expostos a radiação UVB em comparação ao controle não irradiado, indicando que o sistema glutathiona é fortemente alterado pelo estresse fotoxidativo.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os níveis de GSH nos grupos de animais tratados com as formulações em comparação com o grupo controle irradiado. Isto é, as formulações comerciais utilizadas não foram capazes de proteger a depleção do antioxidante GSH induzida pela radiação UV na dose utilizada. Além disso, não houve diferença ($p > 0,05$) entre a proteção fornecida pelas formulações F1, F2 ou F3 com relação à depleção do antioxidante GSH, o que mostra que as formulações analisadas (FPS 15) forneceram o mesmo nível de proteção com relação ao GSH. Recomenda-se que aprofundados sejam realizados a fim de se padronizar a avaliação do antioxidante GSH, principalmente utilizando-se cultura de células, para que possa se fazer uma correlação com os valores de FPS que são mensurados *in vivo*.

Sugere-se que no presente estudo, as formulações fotoprotetoras não foram capazes de prevenir a depleção do GSH porque não bloquearam de forma eficiente a radiação. Com isso, a radiação, principalmente a UVA, que passou pela barreira dos filtros solares e atingiu as camadas mais profundas da pele foi capaz de induzir o estresse oxidativo.

Estudos tem mostrado que a quantidade de antioxidantes endógenos presentes na epiderme é maior do que na derme, uma vez que as camadas mais externas da pele são continuamente expostas aos efeitos danosos da radiação UV levando assim a depleção do sistema antioxidante. Diante desse decréscimo da concentração dos antioxidantes nas camadas mais externas da pele em comparação com as camadas mais profundas é crucial a suplementação da pele com antioxidantes tópicos para a proteção contra o estresse oxidativo (ABLA; BANGA, 2013).

Em pesquisas realizadas anteriormente no mesmo laboratório por Fonseca e colaboradores (2010), sob as mesmas condições de irradiação, a administração tópica de uma formulação contendo extrato concentrado de calêndula mostrou-se capaz de inibir a depleção dos níveis de GSH em 100%. Estudos de penetração foram realizados para garantir a penetração do extrato de calêndula na pele. O extrato concentrado de calêndula apresentou eficácia semelhante à quercetina, epigallocatequina-3-galato e aos polifenóis do chá verde como demonstrado por Casagrande e colaboradores (2006), Vicentini e colaboradores (2008) e Vayalil, Elmets e Katiyar (2003).

Nos últimos anos, o uso de agentes, especialmente antioxidantes botânicos tem recebido considerável atenção como agentes fotoquimiopreventivos. Muitos destes agentes também têm encontrado um lugar nos produtos de cuidado para pele não só com o objetivo de reduzir os danos causados pelas EROs geradas pela radiação UV como também para

complementar a fotoproteção e aumentar a estabilidade de filtros solares químicos (SCALIA; MEZZENA, 2010).

Vale ressaltar que todas as formulações comerciais analisadas apresentam em suas composições compostos antioxidantes, tais como a vitamina E e que nas formulações F1 e F2 estão presentes também extratos e óleos vegetais. Entretanto, esses compostos antioxidantes não foram capazes de prevenir a depleção do GSH provavelmente porque não houve a penetração desses compostos nas camadas mais profundas da pele. Além disso, apesar das formulações conterem diferentes quantidades e variedades desses compostos antioxidantes, não houve diferença entre os níveis de GSH dos grupos de animais tratados com as formulações F1, F2 ou F3.

Vale ressaltar que um bom candidato para antioxidante de uso tópico deve preencher duas condições: permear através do estrato córneo e atingir as camadas mais profundas da pele sem que haja penetração na circulação sistêmica (MARTI-MESTRES et al., 2007).

Verifica-se, portanto, a necessidade de estudos de penetração desses compostos antioxidantes na pele e de eficácia desses fotoprotetores com relação ao sequestro dos radicais livres formados durante a irradiação, uma vez que a alegação da presença dos antioxidantes nas formulações agrega valor aos produtos fotoprotetores e desperta a atenção do consumidor que se sente protegido contra a formação dos radicais livres na pele.

2.2.3.2 Quantificação da enzima superóxido dismutase (SOD)

A SOD é um antioxidante enzimático presente na pele que catalisa a conversão dos radicais O_2 em H_2O_2 usando o NADPH como cofator. Quantidades excessivas de H_2O_2 são prejudiciais para as células sendo, portanto, sequestradas pela catalase e pelo sistema glutathiona que reduz o H_2O_2 em oxigênio e água. A superóxido dismutase existe em três isoformas: a Cu/Zn-SOD (SOD1) presente no citoplasma das células, a Mn-SOD (SOD2) presente nas mitocôndrias e a EC-SOD (SOD3) extracelular (ZAMOCKY et al., 2008; ZELKO; MARIANI, FOLZ, 2002).

A radiação UV induz o decréscimo da enzima SOD. Apesar do mecanismo preciso do decréscimo da SOD ainda não ter sido determinado, tem sido sugerido que a redução deriva da degradação da SOD em resposta às espécies reativas geradas pela radiação UV (TAKAHASHI et al, 2000).

No presente estudo foi feita uma análise do efeito das formulações fotoprotetoras comerciais na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase após a exposição da pele à radiação UV. Os resultados mostraram não houve alteração estatisticamente significativa na atividade da enzima superóxido dismutase entre os grupos de animais irradiados e não irradiados após 6 horas do fim da irradiação. Este resultado corrobora com outros estudos que também avaliaram a atividade da SOD após exposição da pele à radiação UV (MIYACHI; IMAMURA; NIWA, 1987, PENCE; NAYLOR, 1990).

Estudos realizados anteriormente no laboratório nas mesmas condições do presente estudo revelaram uma redução significativa da atividade da SOD no grupo de animais tratados com uma formulação gel creme contendo os filtros solares 3-benzofenona (4%), octilmetoxicinamato (7,5%) e salicilato de octila (5%) em comparação com o grupo controle irradiado. Mesmo no tempo em que a radiação UV, por si só, não foi suficiente para provocar alterações na enzima, foi observado um decréscimo de 69% na atividade da SOD no grupo irradiado tratado com a formulação fotoprotetora em relação ao grupo controle irradiado (VILELA et al., 2012). Neste estudo anterior, os ensaios de fotoestabilidade e penetração *in vivo* mostraram que houve fotodegradação dos filtros solares presentes na formulação, sendo o octilmetoxicinamato o filtro que mais degradou (45%) e penetrou em maior quantidade na epiderme, o que sugere que esse filtro possa ter sido altamente responsável pelo significativo decréscimo na atividade da superóxido dismutase no grupo de animais tratados com a formulação e irradiados.

Diante disso, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito de formulações fotoprotetoras disponíveis no comércio na atividade da superóxido dismutase sob efeito da radiação UV, uma vez que são utilizadas durante toda a vida do indivíduo e em grandes extensões do corpo.

Comparando-se as atividades da SOD em todos os grupos de animais tratados com as formulações fotoprotetoras comerciais, foi possível observar que nenhuma formulação induziu a redução da atividade da SOD quando comparadas ao grupo de animais irradiados. Isso significa que os filtros solares presentes nas formulações comerciais não induziram maior produção de espécies reativas ou diminuição da atividade da enzima durante o processo de irradiação além do estresse oxidativo induzido pela radiação UV. Esse resultado difere do obtido no estudo anterior no qual foi utilizada a formulação menos estável preparada no laboratório.

Figura 6. Avaliação da atividade da SOD na pele de camundongos sem pelos. Onde, CNI = controle não irradiado, CI = controle irradiado, F1 = irradiado e tratado com a formulação F1, F2 = irradiado e tratado com a formulação F2 e F3 = irradiado e tratado com a formulação F3. Os resultados representam a média $\pm$ EPM (n=5 animais por grupo). * $p < 0,05$ diferença significativa comparado ao grupo CI; ** $p < 0,05$ diferença significativa comparado ao grupo F2 usando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

Considerando-se que todas as condições de irradiação desse estudo foram as mesmas do estudo anterior, esses resultados mostram que as formulações comerciais e a formulação gel creme preparada no laboratório, apesar de apresentarem o mesmo FPS 15, forneceram diferentes níveis de proteção contra a depleção do sistema antioxidante induzido pela radiação UV.

Sugere-se que a diferença na proteção fornecida pelas formulações comerciais do presente estudo e a formulação utilizada no estudo anterior esteja principalmente relacionada com a fotoestabilidade das formulações. Todas as formulações comerciais foram consideradas fotoestáveis. O filtro solar que apresentou maior degradação nas formulações F1 e F2 foi o octilmetoxicinamato, o que corrobora com o estudo anterior de fotoestabilidade realizado com a formulação gel creme. No entanto, a redução deste filtro nas formulações comerciais F1 e F2 foi somente de 15 e 25 %, respectivamente, enquanto que na formulação gel creme a redução foi de 45%.

A fotoinstabilidade de filtros UV orgânicos é um importante problema uma vez que após a exposição à radiação UV esses filtros podem sofrer processos de fotodegradação que

promovem a dissociação desses agentes em fragmentos reativos e ainda sofrem reações de fotoisomerização que geram espécies com menor capacidade de absorver a radiação UV do que as moléculas originais (DIAZ-CRUZ; LÓRCA; BARCELO, 2008). Estudos demonstraram que a exposição do filtro solar octilmetoxicinamato à radiação UV gerou produtos de degradação com maior toxicidade para células de ratos quando comparado ao mesmo filtro não irradiado (BUTT; CHRISTENSEN, 2000).

Nas formulações comerciais F1 e F2, apesar de ter ocorrido a penetração dos filtros UV na epiderme, os mesmos mantiveram-se estáveis frente a exposição à radiação UV. Sugere-se, portanto, que a geração de espécies reativas pelos filtros UV e consequente geração do radical superóxido na pele tenha sido muito menor ou até mesmo inexistente do que quando utilizada a formulação gel creme em estudo anterior.

Vale ressaltar que todas as formulações comerciais estudadas apresentam em suas composições agentes antioxidantes tais como vitamina E e extratos vegetais que conhecidamente possuem o potencial de sequestrar radicais livres. Portanto, pode-se também sugerir que esses compostos antioxidantes podem ter sido capazes de sequestrar espécies reativas formadas durante a irradiação contribuindo para um menor consumo da enzima superóxido dismutase em comparação com a utilização da formulação gel creme fotoinstável no estudo anterior além de atuarem também como estabilizantes das formulações.

Apesar da fonte de radiação utilizada ter sido predominantemente composta pela radiação UVB (78%), acredita-se que a quantidade de radiação UVA emitida (12%) esteja altamente relacionada com a produção de espécies reativas induzidas pela radiação UV. A radiação UVA é conhecida por induzir efeitos biológicos principalmente pela geração de espécies reativas (MARIONNET et al., 2011).

Comparando-se as atividades da enzima nos grupos de animais tratados com as formulações F1, F2 e F3 observou-se que o tratamento dos animais com as formulações F1 e F2 propiciou uma menor redução na atividade da SOD em relação à formulação F3. Houve uma diferença significativa entre os grupos tratados com as formulações F1 e F2 em relação ao grupo controle irradiado, o que não foi observado no grupo tratado com a formulação F3.

A formulação F2 apresentou a maior atividade da SOD, seguida das formulações F1 e F3, respectivamente. Vale ressaltar que as formulações F1 e F2 apresentaram áreas sob a curva nos espectros de absorção (280-400 nm) aproximadamente 1,5 e 2 vezes superiores à formulação F3, respectivamente. Na faixa de comprimento de onda que compreende a radiação UVA (320-400 nm) a formulação F2 apresentou uma área sob a curva aproximadamente 1,5 vezes maior do que as formulações F1 e F3. Sugere-se portanto, que a

maior proteção fornecida pela formulação F2 deve-se principalmente à maior proteção desta formulação contra a radiação UVA.

Estudos realizados por Lejeune et al. (2008) mostraram que uma formulação fotoprotetora mesmo apresentando um FPS de 1,5 vezes maior porém com baixa eficácia de absorção da radiação UVA foi menos eficaz em prevenir os danos induzidos pela radiação ultravioleta do que uma formulação com menor FPS porém com uma maior absorção na faixa UVA-UVB. Ficou demonstrado, portanto, que o amplo perfil de absorção é mais relevante do que o nível de FPS.

Vale ressaltar que a formulação F3, que apresentou o menor nível de proteção contra a redução da atividade da SOD, apresenta em sua composição a presença do filtro físico dióxido de titânio (TiO_2). O TiO_2 é encontrado principalmente nas formas cristalinas de maior estabilidade rutila e anatase. A rutila é a fase termodinamicamente mais estável e consequentemente a fase mais abundante na natureza enquanto que a fase anatase é muito mais fotoreativa (SCLAFANI; PALMISANO; DAVI, 1991).

A desvantagem dos filtros físicos TiO_2 e do ZnO é que eles podem ter um efeito negativo na fotoestabilidade dos filtros químicos, uma vez que os filtros físicos podem gerar espécies reativas após a absorção da energia proveniente da radiação UV. São formados principalmente os radicais hidroxila $\text{OH}^\bullet$ e radicais superóxido $\text{O}_2^\bullet$, podendo também ser formados o peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete. Estas EROs podem causar a degradação de outros filtros presentes na formulação e danos à pele (KOCKLER et al, 2012).

Estudos realizados por Dondi et al. (2006), mostraram o efeito fotocatalítico do TiO_2 resultando na degradação dos filtros UV químicos OMC e butil metoxidibenzoilmetano. Após a irradiação desses filtros foi constatado que quando irradiados na presença de TiO_2 apresentaram uma degradação de 10% em relação aos filtros irradiados na ausência do TiO_2 .

Outro estudo mostrou que partículas modificadas de TiO_2 desenvolvidas e comercializadas especificamente para produtos de proteção solar ainda retinham a atividade fotocatalítica sob as condições de irradiação UVA empregadas, especialmente nas quais estavam presentes a forma anatase do TiO_2 (TIANO et al., 2010).

Sugere-se, portanto, que a menor eficiência da formulação F3 na proteção contra a redução da atividade da SOD pode estar relacionada principalmente com a menor capacidade de proteção no espectro da radiação UVA e também devido a presença do filtro físico TiO_2 que pode ter sido responsável pela formação de espécies reativas durante o processo de irradiação.

Diante dos resultados obtidos referentes a atividade da enzima superóxido dismutase ressalta-se principalmente a importância da fotoestabilidade da formulação fotoprotetora e da necessidade de um amplo espectro de absorção tanto nas faixas de radiação que compreendem a UVA quanto na UVB.

2.2.3.3 Avaliação da eficácia anti-inflamatória pela medida da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A exposição à radiação UVB induz a inflamação cutânea. Uma única exposição à radiação UVB pode resultar em resposta inflamatória aguda que é caracterizada pelo eritema e edema devido ao aumento do fluxo e permeabilidade vascular. O aumento do fluxo e permeabilidade vascular, por sua vez, auxilia no recrutamento e infiltração de células inflamatórias na pele incluindo os neutrófilos e monócitos. Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias recrutadas após a exposição da pele à radiação UVB (TERUI; OCUYAMA; TAGAMI, 2001; YOUNG, 2006).

A atividade da MPO, uma enzima liberada pelos neutrófilos ativados, é aumentada na inflamação cutânea e induz a produção de espécies reativas de oxigênio contribuindo para a capacidade bactericida das células (KLEBANOFF, 2005).

A infiltração e o acúmulo de macrófagos ativados e neutrófilos na pele induzidos pela radiação UV é característica da inflamação, e a quantificação da infiltração dos leucócitos é utilizada como uma medida da intensidade do processo inflamatório. O nível da enzima mieloperoxidase é comumente utilizado como um marcador dos infiltrados inflamatórios. A pele normal exibe baixos níveis da enzima mieloperoxidase, enquanto que a pele inflamada pela exposição à radiação UV exibe altos níveis da enzima (MUKHTAR; ELMETS, 1996; STANLEY et al., 1991).

A inflamação crônica na pele é um fator importante nos estágios de iniciação, promoção e progressão do câncer de pele. Portanto, o controle das respostas inflamatórias induzidas pela radiação UVB é considerado uma importante estratégia para a prevenção do câncer de pele (MUKHTAR, ELMETS, 1996; VAID, KATIYAR, 2010).

Figura 7. Avaliação da atividade da MPO na pele de camundongos *sem pelos*. Onde, CNI = controle não irradiado, CI = controle irradiado, F1 = irradiado e tratado com a formulação F1, F2 = irradiado e tratado com a formulação F2 e F3 = irradiado e tratado com a formulação F3. Os resultados representam a média $\pm$ EPM (n=5 animais por grupo). * $p < 0,05$ diferença significativa comparado ao grupo CI, usando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

Os resultados da dosagem da enzima MPO mostraram que houve um aumento significativo na atividade da enzima no grupo de animais irradiados (CI) em comparação com o grupo controle não irradiado (CNI) ($p < 0,05$), o que comprova a indução do processo inflamatório pela radiação na dose utilizada no presente estudo. Esse resultado corrobora com estudos realizados anteriormente no laboratório por Casagrande et al. (2006) que também descreveram um aumento dose dependente ($0,61 - 3,69 \text{ J/cm}^2$) na atividade de MPO na pele de camundongos sem pelos induzida pela exposição à radiação UVB.

Os grupos de animais tratados com as formulações F1, F2 ou F3 apresentaram os níveis da enzima MPO similares ao encontrado no grupo de animais não irradiados (CNI) ($p < 0,05$). Isso significa que as formulações comerciais foram eficientes no bloqueio da radiação UVB e na prevenção da indução do processo inflamatório. Os resultados obtidos na dosagem da enzima MPO indicam uma correlação com os valores de FPS das formulações, uma vez que todas as formulações que apresentam o mesmo FPS 15 apresentaram o mesmo nível de proteção quando analisada a atividade dessa enzima.

2.2.3.4 Quantificação das citocinas TNF- α e IL-1 β

A reação direta à radiação UV é mediada por diversos mecanismos incluindo efeitos diretos nos queratinócitos para liberar a IL-1 e o TNF- α do estrato córneo para iniciar as reações inflamatórias nas camadas viáveis da pele. Estes fatores inflamatórios são produzidos principalmente pelos queratinócitos, as principais células principais da epiderme e principais alvos da radiação UVB (PAZ et al., 2008). Grandes quantidades de IL-1 são reservadas no estrato córneo. Além dos queratinócitos as células fagocíticas podem também secretar citocinas tais como a IL-1 e o TNF- α que, por sua vez, induzem a síntese e a liberação de outras citocinas inflamatórias em resposta à radiação UV (WOOD et al., 1996).

Células fagocíticas tais como neutrófilos e monócitos saem dos capilares e infiltram na pele em resposta à produção de citocinas tais como IL-1 e TNF- α induzidas pela radiação UV (KRISHNADASAN, 2003).

O resultado dessa rede de efeitos é a inflamação e a geração de radicais livres de oxigênio e nitrogênio. Elastases e outras proteases liberadas dos neutrófilos aumentam o processo inflamatório e induzem a ativação de metaloproteinases da matriz levando a uma degradação anormal e acúmulo de produtos de degradação da matriz (PILLAI; ORESAJO; HAYWARD, 2005).

Além disso, o processo inflamatório e as espécies reativas causam um dano oxidativo às proteínas celulares, lipídeos e carboidratos que acumulam nos compartimentos da derme e epiderme contribuindo para o fotoenvelhecimento. O processo inflamatório tem também um papel muito importante no desenvolvimento no câncer de pele (PILLAI; ORESAJO; HAYWARD, 2005; SVOBODOVÁ; PSOTOVÁ; WALTEROVA, 2003).

No presente estudo foram selecionadas as citocinas IL-1 β e o TNF- α para a avaliação do efeito das formulações comerciais no processo inflamatório induzido pela radiação UV pelo fato dessas citocinas desempenharem funções muito importantes na inflamação.

A interleucina-1 β é uma das formas moleculares de IL-1 produzida por praticamente todos os tipos celulares nucleados, principalmente monócitos, macrófagos e células dendríticas (COSTA et al., 2008). As atividades biológicas primordiais da IL-1 incluem a estimulação de células CD4+ que secretam IL-2 e produzem receptores para a IL-2; proliferação e ativação de linfócitos B, neutrófilos, monócitos/macrófagos, aumentando as atividades quimiotáticas e fagocitárias (VARELLA; FORTE, 2001).

No presente estudo a dose de irradiação UVB de 2,87 J/cm² incidida sobre a pele dos animais induziu a um aumento significativo de aproximadamente 5 vezes nos níveis de IL-1 β

em comparação com o grupo de animais não irradiados (Figura 8). Os grupos de animais tratados com as formulações F1, F2 ou F3 apresentaram níveis de IL-1 β inferiores ao do grupo controle irradiado ($p < 0,05$), o que demonstra que o uso das formulações foi capaz de prevenir a indução do processo inflamatório pela radiação UVB.

No entanto, apesar de todas as formulações terem sido capazes de fornecer uma proteção à pele, a formulação F2 foi a única que forneceu uma proteção total contra a indução do processo inflamatório. O grupo tratado com a formulação F2 apresentou o nível de IL-1 β similar ao do grupo de animais não irradiados ($p < 0,05$).

Figura 8. Concentração de IL-1 β na pele de camundongos sem pelos expostos à radiação ultravioleta. Onde, CNI = controle não irradiado, CI = controle irradiado, F1 = irradiado e tratado com a formulação F1, F2 = irradiado e tratado com a formulação F2 e F3 = irradiado e tratado com a formulação F3. Os resultados representam a média de $\pm$ EPM ($n=5$ animais por grupo). * Diferença significativa comparado ao controle irradiado (CI) ($p < 0,05$); ** diferença significativa comparado ao controle não irradiado (CNI) usando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

O fator de necrose tumoral TNF- α é uma citocina multifuncional produzida por diversos tipos celulares tais como mastócitos, queratinócitos, células de Langerhans ativadas e células dendríticas. A síntese e liberação de TNF- α é significativamente aumentada por promotores de tumores, endotoxinas, espécies reativas, danos diretos ao DNA e radiação UV. A expressão do TNF- α é dramaticamente aumentada após a exposição da pele à radiação

UVB, e o TNF- α tem um papel principal na inflamação induzida pela radiação (FOSTER et al., 2007).

O TNF- α é uma proteína de fase aguda, que inicia a cascata de citocinas e induz a expressão de moléculas de adesão recrutando assim monócitos e neutrófilos para o local de infecção e aumentando a permeabilidade vascular por liberar peptídeos vasoativos (JANEWAY; TRAVERS, 1996).

Os resultados mostraram que a exposição dos animais do grupo à radiação UVB (2, 87 J/cm²) induziu um aumento significativo no nível de TNF- α ($p < 0,05$) de aproximadamente 3 vezes quando comparadas os grupos controle irradiado (CI) e grupo controle não irradiado (CNI) (Figura 8).

Além disso, foi possível observar que todas as formulações foram capazes que proteger a pele dos animais contra o processo inflamatório induzido pela radiação UVB quando foram avaliados os níveis de TNF- α . Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com as formulações F1, F2 ou F3 com relação ao grupo controle não irradiado. Não houve também diferença significativa na proteção fornecida pelas diferentes formulações F1, F2 e F3, que apresentam o FPS 15.

Figura 9. Concentração de TNF- α na pele de camundongos sem pelos expostos à radiação ultravioleta. Onde, CNI = controle não irradiado, CI = controle irradiado, F1 = irradiado e tratado com a formulação F1, F2 = irradiado e tratado com a formulação F2 e F3 = irradiado e tratado com a formulação F3. Os resultados representam a média de $\pm$ EPM (n=5 animais por grupo). * $p < 0,05$ diferença significativa comparado ao controle irradiado (CI), usando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

Portanto, a análise conjunta da dosagem das citocinas IL-1 β e TNF- α sugere que o FPS das formulações reflete a proteção fornecida pelas mesmas contra a indução do processo inflamatório induzido pela radiação UVB, o que corrobora também com os resultados obtidos da atividade da enzima mieloperoxidase. Portanto, conclui-se que o FPS é um fator adequado para a avaliação do processo inflamatório induzido pela radiação UVB.

2.3 CONCLUSÕES

O conjunto dos resultados obtidos nessa primeira parte do estudo permite mostrar a necessidade do desenvolvimento de métodos que avaliem de forma mais profunda o nível de proteção fornecida por uma formulação fotoprotetora.

Com relação ao processo inflamatório induzido pela radiação UVB, verificou-se que o FPS, apesar de avaliar somente o eritema, é um bom indicador do nível de proteção da pele, uma vez que todas as formulações apresentaram um potencial protetor contra o aumento da atividade da MPO e liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α . No entanto, vale ressaltar que apesar de todas as formulações apresentarem o mesmo FPS, o nível de proteção fornecido com relação à liberação de IL-1 β pelas formulações foram diferentes.

Portanto, um estudo mais aprofundado dos mediadores envolvidos na inflamação, tais como as citocinas inflamatórias, poderia revelar uma diferença nos níveis de proteção fornecidos por diversas formulações fotoprotetoras propiciando um direcionamento para o desenvolvimento de formulações cada vez mais eficazes.

Todas as formulações comerciais analisadas nesse estudo apresentaram nos rótulos a alegação de fornecerem proteção tanto contra a radiação UVB quanto UVA. No entanto, os resultados mostraram que essas formulações, apesar de absorverem a radiação UVB e prevenirem o eritema de forma eficiente não forneceram proteção contra a depleção do antioxidante endógeno GSH, proteção esta que já foi atribuída a diversos extratos vegetais incorporados em formulações.

Além disso, apesar de apresentarem o mesmo FPS 15 essas formulações apresentaram diferentes níveis de proteção com relação à redução da atividade da enzima SOD induzida pela radiação UV. Conclui-se, portanto, que o FPS reflete bem o nível de proteção da formulação fotoprotetora com relação ao processo inflamatório, mas não reflete a proteção contra a depleção do sistema antioxidante presente naturalmente na pele.

Diante dos resultados obtidos fica evidente a necessidade do desenvolvimento e emprego de métodos que avaliem parâmetros biológicos que avaliem o nível de proteção contra os danos induzidos pela radiação UVA. Dentre esses parâmetros, destacam-se os antioxidantes endógenos tais como a glutathiona, a superóxido dismutase, a catalase dentre outros.

Além disso, destaca-se a importância de se avaliar o nível de proteção das formulações contra a imunossupressão induzida pela radiação UVA, mais precisamente a

radiação UVA1. A determinação da atividade enzimática da calcineurina, que é uma molécula chave na manutenção da resposta imunológica e conhecidamente suprimida pela radiação UV, tem sido utilizada como parâmetro biológico para a avaliação efetiva de danos provocados pela radiação UV (MUSSON; MULLENDERS; SMIT, 2011; MUSSON; MULLENDERS; SMIT, 2012) sendo, portanto, uma alternativa para a avaliação das formulações.

Finalmente, conclui-se que as formulações fotoprotetoras devem ser avaliadas de forma mais profunda, empregando-se diferentes métodos que podem ser desenvolvidos utilizando preferencialmente a cultura de células a fim de se garantir formulações mais eficazes tanto contra os danos induzidos tanto pela radiação UVB quanto pela radiação UVA.

Além disso, é de grande importância ressaltar que as estratégias de prevenção contra os danos à pele induzidos pela radiação UV devem incluir o cuidado de se evitar a exposição ao sol, a prevenção da penetração da radiação na pele pelo uso de filtros solares físicos e químicos e a prevenção/redução do processo inflamatório utilizando-se compostos com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes com capacidade de sequestrar os radicais livres.

Do mesmo modo, diante do aumento do número dos casos do câncer de pele no Brasil e no mundo, faz-se cada vez mais necessário a identificação de novos agentes com propriedades anti carcinogênicas além das pesquisas para avaliação da eficácia, segurança, toxicidade, metabolismo e biodisponibilidade utilizando-se modelos adequados.

2.4 REFERÊNCIAS

ABLA, M.J.; BANGA, A.K. Quantification of skin penetration of antioxidants of varying lipophilicity. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v. 35, p. 19-26, 2013.

AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 63, p. 61-69, 2001.

American Academy of Dermatology. Position statement on broad spectrum protection of sunscreen products. 2009. (Amended by the board of directors November 14, 2009). Disponível em: <http://web1.netaonline.com/forms/policies/Uploads/PS/PS-BroadSpectrum%20Protection%20of%20Sunscreen%20Products%2011-16-09.pdf>. Acesso em: 05 Fev, 2012.

ANTONIOU, C. et al. Sunscreens what's important to know. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology**, Amsterdam, v. 22, p. 1110-1119, 2008.

AUTIER, P. et al. Sunscreen use and duration of sun exposure: a double-blind, randomized trial. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 91, n. 15, p. 1304-1309, 1999.

BRADLEY, P.P., et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, New York, v. 78, p. 206-209, 1982.

BUTT, S.T.; CHRISTENSEN, T. Toxicity and phototoxicity of chemical sun filters. **Radiation Protection Dosimetry**, Ashford, v. 91, n. 1-3, p. 283-286, 2000.

CARINI, M., et al. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. **Il Farmaco**, Amsterdam, v.55, p.526-534, 2000.

CASAGRANDE, R., et al. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of photochemistry and photobiology B: biology**, Lausanne, v. 84, p. 21-27, 2006.

CHEN, L.; HU, J.Y.; WANG, S.Q. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v.67, n.5, p. 1013-1024, 2012.

COSTA, R.D., et al. Avaliação da expressão de interleucina 1 beta (IL-1 β) e antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1Ra) em pacientes com hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 99-103, 2008.

DAMIANI, E.; BASCHONG, W.; GRECI, L. UV-Filter combinations under UV-A exposure: Concomitant quantification of over-all spectral stability and molecular integrity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 87, p. 95-104, 2007.

DÍAZ-CRUZ, M.S.; LLORCA, M.; BARCELÓ, D. Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v.27, n. 10, p.873-887, 2008.

DONDI, D.; ALBINI, A.; SERPONE, N. Interactions between different solar UVB/UVA filters contained in commercial suncreams and consequent loss of UV protection. **Photochemical & photobiological sciences**, Cambridge, v. 5, p. 835-843, 2006.

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

F'GUYER, S., AFAQ, F., MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, Oxford, v. 19, 56–72, 2003.

FLOR, J.; DAVOLOS, M.R.; CORREA, M.A. Protetores solares. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 153-158, 2007.

FONSECA, Y.M., et al. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.127, p. 596-601, 2010.

FOSTER, K.W., et al. Inflammation after solar radiation. In: GIACOMONI, P.U. **Biophysical and physiological effects of solar radiation on human skin**. Cambridge: RSCPublishing; 2007. p. 25-64.

FUCHS, J., et al. Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. **The Journal of Investigative Dermatology**, Cambridge, v.93, p.769-773, 1989.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Evaluation of the photostability os different UV filter combinations in a sunscreen. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 307, p. 123-128, 2006.

GASPARRO, F.P.; MITCHNICK, M.; NASH, J.F. A review of sunscreen safety and efficacy. **Photochemistry and photobiology**, Augusta, v. 68, p. 243-256, 1998.

GONZALEZ, H., et al. Photostability of commercial sunscreens upon sun exposure and irradiation by ultraviolet lamps. **BMC Dermatology**, London, v. 7, 2007.

GUARANTINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.1, p. 206-213, 2007.

GUPTA, V.K.; ZATZ, J.L.; REREK, M. Percutaneous absorption of sunscreens through micro-yucatan pig skin in vitro. **Pharmaceutical Research**, Stuttgart, v. 16, p. 1602-1607, 1999.

HANSON, K. M.; GRATTON, E.; BARDEEN, C. J. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 41, p. 1205-1212, 2006.

HISSIN, P.J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, New York, v.74, p.214-226, 1976.

HOJEROVÁ, J.; MEDOVČÍKOVÁ, A.; MIKULA, M. Photoprotective efficcay and photostability of fifteen sunscreen products having the same label SPF subjected to natural sunlight. **International journal of pharmaceutics**, Amsterdam, v. 408, p. 27-38, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. **Tipos de câncer: Pele melanoma**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma>. Acesso em: 22 Abr. 2012.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. Garland Publishing Inc, New York and London; 1996.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of leukocyte biology**, New York, v. 77, p.598–625, 2005.

KLINUBOL,P.; ASAWANONDA, P.; WANICHWECHARUNGRUANG, S.P. Transdermal penetration of UV filters. **Skin Pharmacology and Physiology**, Basel , v.21, p. 23-29, 2008.

KOCHEVAR I.E.; PATHAK M.A.; PARRISH, J.A. Photophysics, photochemistry, and photobiology. In: FITZPATRICK T.B. et al. **Dermatology in general medicine**. NewYork: McGraw-Hill; 1993. p. 1627–38.

KOCKLER, J.; et al. Photostability of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, Osaka, v. 13, p. 91–110, 2012.

KRISHNADASAN, B., et al. The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia reperfusion injury. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, St. Louis, v. 125, p. 261–272, 2003.

LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, H.C.; PITTELKOW, M.R. Photoprotection. **The Lancet**, New York, v. 370, n. 9586, p. 528-537, 2007.

LEJEUNE, F.; CHRISTIAENS, F.; BERNERD, F. Evaluation of sunscreen products using a reconstructed skin model exposed to simulated daily ultraviolet radiation: relevance of filtration profile and SPF value for daily photoprotection. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, Copenhagen, v. 24, p. 249-255, 2008.

LITTLE, E.G.; EIDE, M.J. Update on the Current State of Melanoma Incidence. **Dermatologic Clinics**, Philadelphia, v. 30, 355–361, 2012.

MARIONNET, C., et al. A broad-spectrum sunscreen prevents UVA radiation-induced gene expression in reconstructed skin in vitro and in human skin in vivo. **Experimental Dermatology**, Copenhagen, v. 20, 477-482, 2011.

MARTI-MESTRES, G., et al. The “in vitro” percutaneous penetration of three antioxidant compounds. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 331, p. 139–144, 2007.

MC CORD, J.M.; FRIDOVICH, J. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore,v. 44, p. 6049-6055, 1969.

MELONI, M.; NICOLAY, J.F. Dynamic monitoring of glutathione redox status in UV-B irradiated reconstituted epidermis: effect of antioxidant activity on skin homeostasis. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 17, p. 609–613, 2003.

MITCHELL, J.R.; HOEIJMAKERS, J.H.; NIEDERNHOFER, L.J. Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. **Current opinion in cell biology**, London, v. 15, 232-40, 2003.

MIYACHI, Y.; IMAMURA, S.; NIWA, Y. Decreased skin superoxide dismutase activity by a single exposure of ultravioleta radiation is reduced by liposomal superoxide dismutase pretreatment. **The Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 89, p.111-112, 1987.

MORENO, M. et al. Epidemiological profile of patients with cutaneous melanoma in a region of southern Brazil. **Journal of Skin Cancer**, New York, 1-8, 2012.

MOURET, S. et al. Assessment of the photoprotection properties of sunscreens by chromatographic measurement of DNA damage in skin explants. **Photochemistry and Photobiology**, Augusta, v. 87, 109–116, 2011.

MUKHTAR, H.; ELMETS, C.A. Photocarcinogenesis: Mechanisms, models and human health implications. **Photochemistry and Photobiology**, Augusta, v. 63, p. 355–447, 1996.

MULLIKEN, J.S.; RUSSAK, J.E.; RIGEL, D.S. The effect of sunscreen on melanoma risk. **Dermatologic clinics**, Philadelphia, v. 30, p. 369–376, 2012.

MUSSON, R.E A.; MULLENDERS, L.H.F.; SMIT, N.P.M. UVA1 radiation inhibits calcineurin through oxidative damage mediated by photosensitization. **Free Rad Biol Med.** v. 50, p. 1392-1399, 2011.

MUSSON, R.E.A.; MULLENDERS, L.H.F.; SMIT, N.P.M. Effects of arsenite and UVA-1 radiation on calcineurin signaling. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis** v. 735, p. 32-38, 2012.

NARENDHIRAKANNAN, R.T., HANNAH, M.A.C. Oxidative stress and skin cancer: An Overview. **Indian journal of clinical biochemistry**, New Delhi, v. 28, 110–115, 2013.

NICHOLS, J.A.; KATYIAR, S.K. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of dermatological research**, Berlin, v. 302, n. 2, p. 1-19, 2010.

PAZ, M.L., et al. Time-course evaluation and treatment of skin inflammatory immune response after ultraviolet B irradiation. **Cytokine**, San Diego, v. 44, p. 70–77, 2008.

PENCE, B. C.; NAYLOR, M. F. Effects of single-dose ultraviolet radiation on skin superoxide dismutase, catalase, and xanthine oxidase in hairless mice. **The Society of Investigative Dermatology**, Cambridge, v. 92, n. 2, p. 213-216, 1990.

PESCIA, A.C., et al. On the assessment of photostability of sunscreens exposed to UVA irradiation: From glass plates to pig/human skin, which is the best? **International journal of pharmaceutics**, Amsterdam, v. 2, p. 217-223, 2012.

PILLAI, S.; ORESAJO, C.; HAYWARD, J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v. 27, p. 17–34, 2005.

PRINTZ, C. Dermatology community applauds new FDA sunscreen regulations: labeling requirements aim to make it easier for consumers to select a sunscreen. **Cancer**, Atlanta, v. 118, p. 1–3, 2012.

SAFIEH-GARABEDIAN, B., et al. Contribution of interleukin- 1 to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, London, p. 115, 1265 – 1275, 1995.

SANTORO, M.I.R.M., et al. The effect of packaging materials on the stability of sunscreen emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 297, p. 197-203, 2005.

SAYRE, R.M. et al. The correlation of indoor solar simulator and natural sunlight: testing of a sunscreen preparation. **Archives of dermatology**, Chicago, v. 114, p. 1649–51, 1978.

SAYRE, R.M., et al. Unexpected photolysis of the sunscreen octinoxate in the presence of the sunscreen avobenzone. **Photochemistry and Photobiology**, Augusta, v. 81, p. 452–456, 2005.

SCALIA, S., et al. Comparative studies of the influence of cyclodextrins on the stability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, Oxford, v. 30, p. 1181-1189, 2002.

SCALIA, S.; MEZZENA, M. Photostabilization effect of quercetin on the UV filter combination, butyl methoxydibenzoylmethane-octyl methoxycinnamate. **Photochemistry and Photobiology**, Augusta, v. 86, p. 273-278, 2010.

SCHUCH, A.P. et al. DNA damage as a biological sensor for environmental sunlight. **Photochemical and photobiological sciences**, Cambridge, 2013. In press.

SCLAFANI, A.; PALMISANO, L.; DAVI, E. Photocatalytic Degradation of Phenol in Aqueous Polycrystalline TiO₂ Dispersions. **Journal of Photochemistry and Photobiology A, Chemistry**, Lausanne, v.56, p.113, 1991.

STANLEY, et al. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin pharmacology**, Basel, v. 4, p. 262, 1991.

SUMMERER, B., KANG, S., WANG, T. Preventing Melanoma. In: SHARFMAN, W.H., ARBRAHAN, J. **Emerging Cancer Therapeutics: Melanoma**. New York: Demos Medical Publishing LLC, 2012. 391-404.

SVOBODOVÁ, A.; PSOTOVÁ, J.; WALTEROVÁ, D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage: A review. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký**, Prague, v. 147, p. 137–145, 2003.

TAKAHASHI, H.; et al. Copper, zinc–superoxide dismutase protects from ultraviolet B-induced apoptosis of SV40-transformed human keratinocytes: the protection is associated with the increased levels of antioxidant enzymes. **Journal of Dermatological Science**, Amsterdam, v.23, p. 12-21, 2000.

TARRAS-WAHLBERG, N., et al. Changes in ultraviolet absorption of sunscreens after ultraviolet irradiation. **The Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 113, p. 547–553, 1999.

TERUI, T.; OKUYAMA, R.; TAGAMI, H. Molecular events occurring behind ultraviolet-induced skin inflammation. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, Hagerstown, v. 1, p. 461-467, 2001.

TIANO, L.; et al. Modified TiO₂ particles differentially affect human skin fibroblasts exposed to UVA light. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 49, p. 408–415, 2010.

TREFFEL, P.; GABARD, B. Skin penetration and SPF of ultraviolet filters from two vehicles. **Pharmaceutical Research**, Stuttgart, v. 13, p. 770-774, 1996.

VAID, M.; KATIIYAR, S.K. Molecular mechanisms of inhibition of photocarcinogenesis by silymarin, a phytochemical from milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn). **International journal of oncology**, Athens, v. 36, p. 1053–1060, 2010.

VARELLA, P.P.V.; FORTE, W.C.N. Citokines: a review. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 24, p. 146-154, 2001.

VAYALIL, P.K.; ELMETS, C.A.; KATYAR, S.K. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 24, p. 927-936, 2003.

VICENTINI, F. T. M. C., et al. Quercetin in w/o microemulsion: *In vitro* and *in vivo* skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated *in vivo*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 69, p. 948-957, 2008.

VILELA, F. M. P., et al. Effect of ultraviolet filters on skin superoxide dismutase activity in hairless mice after a single dose of ultraviolet radiation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 80, n. 2, p. 387-392, 2012.

WANG, S.Q.; BALAGULA, Y.; OSTERWALDER, U. Photoprotection: a review of the current and future technologies. **Dermatologic Therapy**, Copenhagen, v. 23, p. 31-47, 2010.

WOOD, L.C., et al. Barrier disruption stimulates interleukin-1 alpha expression and release from a pre-formed pool in murine epidermis. **The Journal of investigative dermatology**, Baltimore, v. 106, p. 397-403, 1996.

World Health Organization (WHO). **Individual protection against UV**. Disponível em: <<http://www.who.int/uv/faq/protect/en/index5.html>> . Acesso em: 26 Abr. 2013.

YOUNG, A.R. Acute effects of UVR on human eyes and skin. **Progress in biophysics and molecular biology**, Oxford, v. 92, p. 80-85, 2006.

ZAMOCKY, M., et al. The peroxidase-cyclooxygenase superfamily: Reconstructed evolution of critical enzymes of the innate immune system. **Proteins**, New York, v. 72, p. 589-605, 2008.

ZELKO, I.N.; MARIANI, T.J.; FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free radical biology & medicine**, New York, v. 33, p. 337-349, 2002.

3. CAPÍTULO 2 – Inibição do crescimento /viabilidade de células de melanoma humano e indução de apoptose mediada pelo extrato de soja biotransformada (ESB)

3.1 INTRODUÇÃO

O câncer de pele do tipo melanoma altamente agressivo tem crescido de forma muito mais rápida do que outros tipos de cânceres e é caracterizado por uma elevada mortalidade ininterrupta (LENS; DAWES, 2004). O melanoma é caracterizado por uma elevada capacidade de metástase assim como resistência à apoptose além de alta resistência a medicamentos (KURBANOV et al., 2007; SOENGAS; LOWE, 2003).

O desenvolvimento do câncer de pele do tipo melanoma é resultante de múltiplas e progressivas alterações no DNA celular, que podem ser causadas por ativação de proto-oncogenes, por mutações ou deleções de genes supressores tumorais ou por alteração estrutural dos cromossomos. O tumor apresenta uma fase inicial de crescimento radial, principalmente intraepidérmico, seguida por uma fase de crescimento vertical, com invasão da derme e dos vasos, iniciando a disseminação metastática. Quando não diagnosticado e não tratado no início, o tumor tende a aumentar de tamanho em extensão e altura, com progressiva alteração de suas cores e formas originais que resultam em ulceração, sangramento ou sintomas como prurido, dor ou inflamação (ATKINS et al, 2008).

O agente alquilante dacarbazina, aprovada em 1975 pelo FDA, foi a primeira droga quimioterápica usada para o tratamento do melanoma avançado e apenas 1 em 8 pacientes apresentam diminuição do tumor com a utilização da medicação. Em 1998, a utilização de altas doses de interleucina-2 (IL-2), uma imunoterapia, mostrou benefício no tratamento da doença metastática, com um pequeno percentual de taxa de cura e com grande toxicidade. Outras drogas têm sido testadas, incluindo as nitrosuréias, alcalóides da vinca, compostos de platina e taxanos, mas nenhum desses agentes mostrou-se vantajoso em relação à dacarbazina (MOUAWAD et al, 2010).

Os medicamentos usados atualmente no tratamento do melanoma não são eficazes, uma vez que apresentam alta toxicidade, não apresentam seletividade para as células cancerosas além de induzirem a resistência a medicamentos após o uso prolongado. Portanto, há uma necessidade de agentes mais eficazes, que isoladamente ou em combinação,

apresentarão um impacto mais significativo sobre esta doença (SIDDIQUI; TARAPORE; MUKHTAR, 2009).

Publicações recentes mostraram que os agentes quimioterápicos exercem suas citotoxicidades por meio da indução de apoptose, levando ao conceito de que a resistência aos quimioterápicos adquirida pelas células pode ser resultado da modulação do processo apoptótico. A resistência ao processo de apoptose induzido pelos quimioterápicos devido à modulação da apoptose tem sido descrito em alguns tumores e pode ser responsável pela resistência aos fármacos no câncer de pele tipo melanoma (HELMBACK et al, 2002).

A apoptose é uma forma de morte celular na qual a célula inicia um processo de morte programada caracterizada por alterações morfológicas específicas que incluem a retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, a condensação da cromatina, fragmentação do núcleo, formação de prolongamentos na membrana celular (*blebs*), e a formação dos corpos apoptóticos, que são porções celulares envoltas pela membrana celular. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados e eliminados do tecido (STRASSER; CORY; ADAMS, 2011).

No mecanismo de apoptose, diferentemente do que ocorre no processo de necrose celular, não ocorre o rompimento da membrana citoplasmática, evitando a liberação do conteúdo intracelular minimizando assim a indução do processo inflamatório (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via intrínseca (mitocondrial) ou pela via extrínseca (citoplasmática).

No mecanismo intrínseco, os sinais indutores de apoptose são detectados pela mitocôndria fazendo com que ocorra um desacoplamento da cadeia respiratória e consequente liberação de citocromo c e proteínas ativadoras da apoptose da mitocôndria para o citoplasma. O citocromo c no citoplasma forma um complexo com a APAF-1 e a caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa.

Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai ocasionar a apoptose. O principal sensor dessa via da apoptose é o p53. Uma vez ativado, o p53 induz a expressão de várias proteínas incluindo as proteínas da família Bcl-2, que controlam a permeabilidade da membrana mitocondrial (GUPTA, 2003; STRASSER; O'CONNOR; DIXIT, 2000). Essas proteínas da família Bcl-2 podem ser próapoptóticas (Bid, Bax, Bak, entre outras) ou antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, entre outras) (MARTINOU; YOLE, 2011).

A via extrínseca é mediada pela ativação dos receptores de morte presentes na membrana celular e pode ativar as caspases de uma maneira parcialmente independente da

Agentes farmacológicos e nutracêuticos que possuem mecanismos de ação ligados a inibição dos eventos carcinogênicos são candidatos em potencial para a prevenção e tratamento dessa doença (NALDI et al., 2004). Nos últimos anos, o consumo de antioxidantes botânicos e o tratamento com esses compostos têm sido considerados como uma estratégia para a prevenção dos danos a pele (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005; AFAQ et al., 2009; EINSPAHR; BOWDEN; ALBERTS, 2003; F'GUYER, AFAQ, MUKHTAR, 2003).

As isoflavonas da soja são um grupo de fitoquímicos de grande interesse devido à associação dessas isoflavonas com uma variedade de efeitos benéficos à saúde incluindo efeitos supressores em células de melanoma tais como a inibição do crescimento, interrupção do ciclo celular e indução de diferenciação celular (WANG et al., 2002).

A soja contém principalmente isoflavonas glicosiladas, como a daidzina e genistina, que ao sofrerem biotransformação em suas formas aglicona daidzeína e genisteína são mais ativas, prontamente absorvidas e apresentam maior biodisponibilidade do que seus compostos conjugados altamente polares (MCCUE; HORII; SHETTY, 2004; OTIENO; ASHTON, SHAH, 2006). Portanto, a hidrólise enzimática dos glicosídeos fenólicos usando o bioprocessamento da soja em cultura sólida utilizando fungos de grau alimentício tem sido desenvolvida como uma estratégia para aumentar a concentração de polifenóis e melhorar a atividade biológica dos produtos à base de soja (GEORGETTI et al., 2009; HSIEH; GRAHAM, 2001; MCCUE; HORII; SHETTY, 2004).

No presente estudo foi investigado o efeito do extrato de soja biotransformada (ESB) em células de melanoma humano das linhagens 451Lu e A375. Esse extrato foi preparado no laboratório utilizando o processo de biofermentação da soja em meio sólido sendo o fungo *A. awamori* o microrganismo produtor da enzima β -glicosidase (FORTES, 2011; GEORGETTI et al., 2009). O efeito do extrato ESB nas células de melanoma foi comparado com o efeito do extrato da soja não-biotransformado (ESNB).

Estudos realizados anteriormente no laboratório mostraram que esse processo de biotransformação da soja conferiu ao extrato quantidades aproximadamente 50 e 42 vezes maiores das isoflavonas daidzeína e genisteína, respectivamente e teores muito maiores de proteínas e aminoácidos/peptídeos quando comparado ao extrato da soja não biotransformada (FORTES, 2011). Portanto, o principal objetivo desse estudo é avaliar o efeito do extrato ESB em células de melanoma humano e investigar o mecanismo de ação do extrato nas células de melanoma A375.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Anticorpos e Reagentes

Os anticorpos primários para poli(ADP-ribose) polimerase (PARP), caspase-3, caspase-7, caspase-8, caspase-9, fosfo-Bad (p-Bad), Bid, Bax, Fas, TNF-R1, TNF-R2, DR4 e β -actina, e os anticorpos secundários anti-mouse e anti-coelho foram adquiridos da Cell Signaling Technology (Beverly, MA). O anticorpo TRAIL e o TRAIL siRNA foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). O kit para transfecção Amaxa[®] Cell Line Nucleofector[®] foi comprado da Lonza (Lonza, Basel, Switzerland). Os kits BCA[™] protein assay kit e SuperSignal[®] West Pico chemiluminescent substrate kit foram adquiridos de Pierce (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL).

Os mini-géis Tris-glicina para eletroforese foram adquiridos da Biorad (Hercules, CA). O kit Annexin-V-FLUOS foi adquirido da Roche Diagnostic Corporation (Indianapolis, IN) e o Inibidor da ativação de NF- κ B IV foi comprado de Calbiochem[®] (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

3.2.2 Cultivo celular

Nesse estudo foram utilizadas duas linhagens de células humanas altamente agressivas e metastáticas de melanoma: A375 e 451Lu. As células A375 e 451 Lu foram cultivadas em meio DMEM e MEM (Gibco, Carlsbad, CA), respectivamente, suplementados com soro fetal bovino 10% e 1% de solução penicilina-estreptomicina em estufa a 37°C em atmosfera de 5% CO₂.

3.2.3 Obtenção do extrato de soja biotransformada (ESB) e do extrato de soja não biotransformada (ESNB)

Alíquotas de 10 g de soja foram transferidas para erlenmeyer de 250 mL e adicionadas de 10 mL de água deionizada, uniformemente distribuídos. A seguir, os

erlenmeyers foram esterilizados por calor úmido a 121 °C por 15 minutos. Após esterilização, 1mL da suspensão de esporos (10^7 esporos/mL) do fungo *Aspergillus awamori* (ATCC 22342), foram uniformemente espalhados sobre a superfície da soja, que foi previamente desengordurada. As culturas foram incubadas a 30 °C.

Após 48 h, foram adicionados 40 mL de etanol 80% a 10 g de soja biotransformada pelo fungo e foram mantidos sob agitação em shaker, 250 rpm por 2 horas a 25 °C. O extrato hidroetanólico foi filtrado à vácuo em papel de filtro, e em filtros tipo millex 0,45 µm e 0,22 µm. O extrato da soja não biotransformada foi obtido pelo emprego de 10 g de soja, no qual passou por todos os procedimentos, exceto a adição de 1mL da suspensão de esporos, que foi substituído por 1 mL de solução salina (FORTES, 2011; GEORGETTI et al., 2009).

3.2.4 Ensaio de citotoxicidade celular

Os objetivos dos ensaios de citotoxicidade celular foram verificar se haveria uma maior atividade citotóxica do extrato de soja biotransformado em relação ao extrato da soja não biotransformada, e determinar as concentrações do extrato a serem utilizadas nos experimentos posteriores baseando-se na porcentagem de viabilidade celular.

O efeito dos extratos de soja biotransformada e não biotransformada na viabilidade celular foram determinados de acordo com o ensaio MTT e com a microscopia de fase contraste. As células foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 3×10^5 células por poço contendo 1 mL de meio completo. Após 24 horas quando as células atingiram confluência de 70% foram adicionadas diferentes concentrações dos extratos calculadas baseando-se na concentração de sólidos totais dos extratos. As células de melanoma foram tratadas com as concentrações de ambos extratos de 0 - 2,2 mg/mL para A375 e de 0 - 1,6 mg/mL para 451 LU por 24 horas a 37° C . Os extratos foram inicialmente diluídos em DMSO e foram feitas diluições sucessivas em PBS que foram adicionadas ao meio completo para o tratamento das células.

Após 24 horas da adição dos extratos foram adicionados 300 µL da solução do reagente MTT (5 mg/mL em PBS) e as células foram incubadas por 2 horas. A solução de MTT foi então removida por aspiração e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 300 µL de DMSO. A absorvância foi medida no comprimento de 540 nm. As células

tratadas com o veículo (DMSO diluído em PBS) foram consideradas como sendo o controle de 100% de células viáveis.

3.2.5 Ensaio de apoptose

Para investigar se o extrato ESB seria capaz de induzir apoptose nas células de melanoma A375, foram analisados os efeitos de diferentes concentrações do extrato (1,5 – 1,9 mg/mL) na morfologia celular após 24 horas de tratamento, observada em microscópio de contraste de fase. Além disso, foi utilizado o kit Annexin-V-FLUOS Staining kit para a detecção de células necróticas e apoptóticas de acordo com as instruções do fabricante (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN).

Basicamente, esse kit utiliza um protocolo de coloração dupla na qual as células apoptóticas são coradas com a anexina V e as células necróticas com o iodeto de propídeo (PI), que sob microscópio de fluorescência são visualizadas em verde e vermelho, respectivamente. A anexina-V-FLUOS liga-se de uma maneira Ca^{2+} dependente à superfície celular carregada negativamente e possui uma alta especificidade pela fosfatidilserina que nos estágios iniciais da apoptose é translocada da parte interna da membrana para a superfície externa da célula. O iodeto de propídeo cora somente o DNA extravasado das células necróticas permitindo assim a diferenciação entre células necróticas e apoptóticas.

3.2.6 Preparo do lisado celular total

As células de melanoma A375 foram selecionadas para os estudos posteriores de avaliação do efeito do ESB por ter sido a linhagem celular que apresentou uma maior resistência em relação à ação citotóxica do extrato quando comparada à linhagem 451Lu.

As células foram plaqueadas em placas de petri a uma densidade de 3×10^6 células/placa e cultivadas em 10 mL de meio DMEM completo por 48 horas até que se atingisse a confluência de 70%. Após 48 horas o meio foi trocado e foram adicionadas a esse meio diferentes quantidades do extrato ESB para que se atingisse as concentrações de 1,5 ; 1,7 e 1,9 mg/mL. O tratamento foi feito por 24 horas a uma temperatura de 37°C.

Após o tratamento das células com ESB, o meio das placas foi aspirado e as células foram lavadas duas vezes com PBS (10 mM, pH 7.4) e incubadas por 15 minutos com 200 μ L de uma solução gelada de um tampão de lise RIPA 1X (Santa Cruz Biotechnology, CA) adicionado de 1% de coquetel inibidor de proteases (Protease Inhibitor Cocktail Set III; Calbiochem, La Jolla, CA) e 0,5% de orto-vanadato de sódio.

As células foram raspadas da placa com espátula, coletadas em tubos de microcentrífuga e passados por agulha (40 x 7 mm) por 20 vezes para lisar os agregados celulares. Após passagem pela agulha o lisado foi centrifugado a 13000 g por 25 min a 4°C para remoção dos debris celulares. Coletou-se o sobrenadante para determinação da concentração de proteínas que foi realizada utilizando-se o kit BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) conforme o protocolo do fabricante. Os lisados celulares totais foram estocados a -80°C.

3.2.7 Preparo dos lisados celulares citosólicos e nucleares

As células de melanoma A375 foram tratadas por 24 horas com as concentrações de 1,5; 1,7 e 1,9 mg/mL do extrato biotransformado e após o tratamento o meio foi aspirado e as células foram lavadas com PBS (10 mM, pH 7.4).

Para o preparo do lisado celular citosólico, as células foram incubadas durante 15 minutos em 300 μ L de tampão de lise HEPES (10 mM, pH 7.9 contendo KCl (10 mM), EDTA (0.1 mM), EGTA (0.1 mM), DTT (1 mM), PMSF (1 mM) e adicionado de 1% de inibidor de proteases (Protease Inhibitor Cocktail Set III; Calbiochem, La Jolla, CA) e 0,5% de orto-vanadato de sódio. As células foram raspadas, transferidas para tubo de microcentrífuga e foram adicionados 12,5 μ L de uma solução a 10% de Nonidet P-40. Os tubos foram levados em agitador tipo vórtex e centrifugados a 13000 g a 4 °C durante 1 minuto. O sobrenadante, isto é, o lisado citosólico, foi separado e estocado a 80 °C.

O pellet remanescente no tubo foi ressuspensão e agitado por 30 minutos em 40 μ L de tampão de extração nuclear HEPES (20 mM, pH 7.9), NaCl (0.4M), EDTA (1 mM), EGTA (1 mM), DTT (1 mM), PMSF (1 mM)) adicionado de 1% de inibidor de proteases (Protease Inhibitor Cocktail Set III; Calbiochem, La Jolla, CA) e 0,5% de orto-vanadato de sódio.

Os tubos foram então centrifugados a 14000 g a 4 °C por 5 minutos e o sobrenadante (extrato nuclear) foi estocado a -80 °C. A concentração de proteínas nos lisados citosólico e

nuclear foram determinadas utilizando-se o kit BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) conforme o protocolo do fabricante.

3.2.8 Western blotting

As amostras foram preparadas para a eletroforese adicionando-se partes iguais de água, solução corante e amostra. A solução corante consistiu de 95% de Tampão Laemmli (Biorad) e 5% de mercaptoetanol. As amostras foram aquecidas (95 °C) por 5 minutos, centrifugadas e foram aplicadas 25 µL de amostra nos mini-géis de poliacrilamida 8–12% (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, Biorad), o que corresponde a 40 µg de proteína. Durante a eletroforese, a corrente aplicada foi de 120v até que fosse observada a saída do corante do gel de separação.

A transferência das proteínas foi feita durante 12 horas e foi aplicada corrente de 30v. O bloqueio das membranas de nitrocelulose foi feito com tampão de bloqueio (pH 7,6) preparado com PBS contendo 7% de leite em pó desnatado e 1% de Tween 20 durante 1 hora em temperatura ambiente. Após o bloqueio as membranas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos no tampão de bloqueio por 1- 12 horas a 4 °C.

Após a incubação com o anticorpo primário as membranas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS adicionado de 1% de Tween 20) e procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário anti-mouse ou anti-rabbit conjugado à enzima HRP (horseradish peroxidase) diluído em tampão de bloqueio por 2 horas. Foram feitas 3 lavagem consecutivas de 5 minutos com PBS adicionado de 1 % de Tween 20 e finalmente a detecção foi feita utilizando quimioluminescência (ECL kit, Amersham Biosciences, UK) e autoradiografia usando XAR-5 Film (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA) ou revelado utilizando câmera digital com o programa ChemiDoc XRS Software (Biorad, Hercules, Ca, USA).

3.2.9 Imunocitoquímica

As células A375 foram plaqueadas em lâminas de vidro para cultura de células com duas câmaras na densidade de $2,5 \times 10^5$ células/câmara e cultivadas em meio DMEM

completo por 24 horas a 37 °C. Posteriormente foi feito o tratamento das células com ESB (1,7 mg/mL) por 24 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com 1X PBS e fixadas em paraformaldeído 4% em PBS por 30 minutos em temperatura ambiente. Após três lavagens com 1X PBS foi feito o bloqueio utilizando Background snipper (Biocare Medical, Origin) durante 20 minutos seguido da incubação com os anticorpos primários caspase-3 e caspase-8 (1:400 e 1:100, respectivamente, em PBS contendo 2% de albumina bovina e 2,5% de soro de cabra) durante 12 horas a 4 °C.

Após a incubação com os anticorpos primários as células foram lavadas com PBS e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário conjugado à biotina (1:500 diluído no mesmo tampão diluente do anticorpo primário) em temperatura ambiente e protegido da luz.

Posteriormente as células foram tratadas com ABC Conjugate (R.T.U. Vectastain ® Kit, Burlingame, CA) por 30 minutos e incubadas com 2,30-diaminobenzidina (Dako Liquid DAB + Substrate Chromogen System, Dako Corp, CA) até que se obtivesse a intensidade de coloração desejada.

Finalmente as lâminas foram coradas com hematoxilina 10% em água (Vector® Hematoxylin Qs Nuclear Counterstain, Origin), desidratadas passando por concentrações crescentes de etanol, limpas em xileno 100% e montadas em meio de montagem. A coloração foi visualizada em microscópio Nikon Eclipse Ti.

3.2.10 Transfecção das células A375 com TRAIL si-RNA

Nos estudos de transfecção, 1×10^6 células de melanoma A375 foram transfectadas com 12 µL do TRAIL si-RNA usando o kit Amaxa® Cell Line Nucleofector® (Santa Cruz, CA). Após a transfecção as células foram cultivadas por 48 horas e tratadas com o extrato ESB (1.7 mg/mL) por 24 h. Foram investigadas nas células transfectadas a expressão da proteína PARP para investigar a ocorrência do processo de apoptose nas células.

3.2.11 Inibição da ativação do NF-κB

Para avaliar os efeitos do extrato ESB na via do NF-κB e na indução da apoptose nas células A375 as células foram plaqueadas em placas de petri a uma densidade de 3×10^6

células/placa e cultivadas em 10 mL de meio DMEM completo por 48 horas até que se atingisse a confluência de 70%.

Após 48 horas o meio foi trocado e foi adicionado a esse meio o 150 nM de NF- κ B activation inhibitor IV Calbiochem[®] (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) 2 horas antes do tratamento das células com 1,7 mg/mL do extrato ESB. Após 24 horas da adição do extrato o meio foi aspirado e as células foram lavadas com PBS. Foram preparados os lisados citoplasmáticos e nucleares para as análises posteriores.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Citotoxicidade celular

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade mostraram que o ESB reduz a viabilidade das duas linhagens de células de melanoma humano altamente agressivas e metastáticas A375 e 451Lu. O tratamento das células com o extrato ESB durante 24 horas nas concentrações de 0-1,6 mg/mL para a linhagem 451Lu e 0-2,2 mg/mL para A375 apresentou uma redução dose-dependente no crescimento/viabilidade das células (Figura 11). Os IC_{50} estimados foram de 0,8 mg/mL para a linhagem 451Lu e 1,7 mg/mL para A375. Outro resultado muito interessante observado foi que o tratamento de ambas as linhagens celulares com o ESNB nas mesmas concentrações avaliadas para o ESB não apresentou nenhum efeito na viabilidade celular, o que mostra a grande importância do processo de biotransformação da soja na produção do extrato para o seu potencial quimiopreventivo ou no tratamento do câncer de pele humano tipo melanoma.

Figura 11. Efeito dos extratos ESB e ESNB no crescimento/viabilidade de linhagens celulares de melanoma 451Lu e A375. As células foram tratadas com os extratos por 24 h e o crescimento/viabilidade foram avaliados pelo método do MTT. Os valores representam o percentual de células viáveis. As células tratadas somente com o veículo (DMSO) foram consideradas com sendo o controle 100% viável. Os dados representam a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

Estudos anteriores realizados no laboratório também já demonstraram que o ESB apresentou uma citotoxicidade seletiva para as células de melanoma B16F10 em comparação com células normais de fibroblastos da linhagem L929 (FORTES, 2011).

Diante desse potencial apresentado pelo extrato de ser citotóxico para células de melanoma humano altamente agressivas, foram selecionadas as concentrações de 1,5; 1,7 e 1,9 mg/mL do extrato ESB, baseando-se no teor de sólidos totais, para a realização dos estudos posteriores de avaliação do mecanismo pelo qual esse extrato induz a redução na viabilidade celular das células de melanoma. Diante da maior resistência da linhagem A375 em relação à 451Lu foi selecionada a linhagem A375 para o prosseguimento dos estudos.

3.3.2 ESB induz apoptose em células de melanoma A375

As células A375 tratadas com ESB nas concentrações de 1,5; 1,7 e 1,9 mg/mL durante 24 horas apresentaram alterações dose-dependentes na morfologia celular e a indução de apoptose pelo extrato foi evidente conforme o aumento da coloração verde fluorescente produzida pelo corante Anexina-V, que se liga à fosfatidilserina que é externalizada na membrana das células apoptóticas.

Para avaliar o mecanismo molecular envolvido na indução de apoptose pelo ESB foi verificado se o tratamento com extrato induziria a ativação da caspase-3 e clivagem de PARP, que são considerados importantes indicativos de morte celular por apoptose.

Conforme esperado, os resultados das análises empregando-se as técnicas de western blotting e imunocitoquímica (Figura 11) mostraram que o tratamento com o ESB resultou em um aumento na ativação da caspase-3, e que houve quebra da proteína PARP (116 Kda) resultando no fragmento PARP (85 Kda).

Figura 12. Tratamento com ESB induz apoptose nas células de melanoma A375. (a) Microscopia de fase contraste. Fotos representativas de células tratadas com o ESB (0-1,9 mg/mL) por 24 h. (b) Efeito do ESB na indução da apoptose demonstrado pela coloração com anexina -V (fluorescência verde). (c) Efeito do tratamento com ESB (0-1,9 mg/mL) na ativação da caspase-3 e na clivagem de PARP. Os lisados celulares totais foram analisados por Western Blotting. Os dados são representativos de três experimentos independentes. (d) Efeito do tratamento com ESB (1,7 mg/mL) na ativação da caspase-3 detectada por imunocitoquímica.

3.3.3 ESB não induz ativação da caspase-9

A morte celular por apoptose pode ser desencadeada por dois mecanismos: o mecanismo extrínico e o mecanismo intrínico ou via mitocondrial. Na via intrínica os sinais indutores da apoptose são detectados pela mitocôndria fazendo com que haja um desacoplamento da cadeia respiratória com consequente liberação de citocromo c e proteínas pró-apoptóticas para o citosol (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; GUPTA, 2003). O citocromo c no citosol forma um complexo com a APAF-1 e com a caspase-9 chamado

apoptossomo. A formação do apoptossomo promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa. A caspase-9 ativada ativa as caspases efetoras que são responsáveis pelas alterações morfológicas e bioquímicas na célula associadas com a apoptose (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; WÜRSTLE; LAUSSMANN; REHM, 2012).

Primeiramente foi investigado se o mecanismo intrínseco estava envolvido ou modulado pelo tratamento das células com o extrato biotransformado. Os resultados mostraram que a caspase-9 que é ativada na via intrínseca não foi afetada pelo tratamento com ESB (Figura 12a).

Figura 13. Efeito do ESB na expressão das proteínas caspase-9, BID e Bax. (a) O tratamento com ESB não induziu ativação da caspase-9 nas células de melanoma A375. (b) O extrato ESB não afetou a expressão das proteínas pró-apoptóticas Bid e Bax envolvidas na via intrínseca da apoptose. Os lisados celulares totais foram analisados por Western Blotting. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Outras proteínas envolvidas no mecanismo intrínseco são as proteínas da família Bcl-2, que desempenham um papel crítico na regulação da apoptose em condições fisiológicas ou patológicas. Algumas dessas proteínas como Bcl-2, Bcl-XL, bcl-w, mcl-1 e A1 inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo c e são chamadas de antiapoptóticas. Por outro lado, Bid e Bax são chamadas proteínas pró-apoptóticas (OLA; NAWAZ; AHSAN, 2011).

Para avaliar o papel das proteínas da família Bcl-2 na apoptose mediada pelo ESB foram estudados o efeito do extrato nas proteínas pró-apoptóticas Bid e Bax. Os resultados mostraram que as proteínas Bid e Bax não foram afetadas pelo tratamento com o extrato nas

células A375 (Figura 12b). Baseando-se nesse conjunto de resultados sugere-se que a indução de morte celular por apoptose em células de melanoma A375 não seja pela ativação da via intrínseca.

3.3.4 ESB induz a ativação da caspase-7 e caspase-8

Na maioria das células cancerosas, as caspases estão presentes na forma inativa (pró-formas) e precisam ser clivadas em sítios específicos da proteína para tornarem-se ativas e participarem no processo de apoptose (HAFEEZ et al., 2008).

A forma clássica de ativação da cascata das caspases é iniciada a partir da clivagem das caspases iniciadoras, caspase-2, caspase-8, caspase-9 e caspase-10, que por sua vez, clivam e ativam as caspases efetoras, caspase-3, caspase-6 e caspase-7, levando ao processo de apoptose (RODRÍGUEZ-BERRIGUETE et al., 2012).

A ativação das caspases pode ser regulada tanto pela via extrínseca quanto pela via intrínseca da apoptose. A caspase-8 tem um papel fundamental na iniciação da apoptose mediada pela via extrínseca (KURANAGA, 2012).

Sendo assim, uma vez que não foi observado aumento na ativação da atividade da caspase-9, que tem um papel proeminente no desencadeamento da via apoptótica mitocondrial (intrínseca), foram avaliados o envolvimento das caspases 8 e 7 na morte celular por apoptose induzida pelo extrato ESB nas células A375.

Os resultados mostraram um significativo aumento dose-dependente das formas ativas da caspase-7 e caspase-8 após o tratamento com ESB (Figura 13). Esses resultados são um forte indicativo de que a indução das caspases envolvidas na via extrínseca da apoptose é um dos possíveis mecanismos pelo qual o extrato ESB induz apoptose nas células de melanoma A375.

Figura 14. Efeito do extrato ESB na expressão das proteínas caspase-8 e caspase-7. (a) o tratamento das células A375 com o extrato ESB (24h) induziu ativação das caspases 8 e -7 (b) Efeito do extrato ESB (1,7 mg/mL) na ativação da caspase-8 mostrado pelo método de imunocitoquímica. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

3.3.5 ESB induz aumento na expressão dos receptores de morte apoptóticos em células A375

A família dos receptores de morte, que inclui os receptores de necrose tumoral TNF-R1, Fas, DR2, TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5) e DR6 podem iniciar a via extrínseca da apoptose (SAYERS, 2011).

Os receptores de morte possuem um domínio extracelular específico para a ligação com seus respectivos ligantes e um domínio de morte (DD: death domain) intracelular que se liga a moléculas adaptadoras iniciando a transdução do processo de apoptose. Moléculas adaptadoras do tipo FADD ou TRADD possuem além dos domínios de morte os domínios efetores de morte (DED), os quais interagem com os DED das pró-caspases-8-10 formando os complexos indutores dos domínios de morte, reconhecidos como DISC (CURTIN; COTTER, 2003).

O recrutamento da pró-caspase-8 para o complexo DISC resulta em autocatálise da caspase-8 inativa promovendo sua ativação que subsequentemente liberada do complexo DISC ativa as caspases efetoras caspase-3, caspase-6 e caspase-7 (OUYANG et al., 2012).

Uma vez que a ativação da caspase-8 devido ao tratamento das células A375 com o ESB foi evidente, foram investigados receptores de morte envolvidos na via extrínseca da apoptose.

Os resultados mostraram que o extrato não induziu alterações na expressão das proteínas DR-3, DcR3, DR5, Fas e TNF-R1. Por outro lado, foi observado que o extrato causou uma significativa indução dose-dependente na expressão do receptor TNF-R2 e que a expressão de TRAIL e DR4 teve um grande aumento nas células tratadas com ESB (Figura 14). Esses dados sugerem que um dos mecanismos envolvidos na indução de apoptose pelo extrato ESB nas células de melanoma A375 é via TRAIL/DR4.

Figura 15. Efeito do tratamento das células A375 com o extrato ESB na expressão de receptores de morte apoptóticos. Expressão das proteínas Fas, TNF-R1, TNF-R2, TRAIL, DR4, DR3, DcR3, e DR5. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) é um membro da família TNF que parece ser um candidato promissor para a terapia do câncer devido à citotoxicidade seletiva apresentada contra células malignas (LI et al., 2010). A indução de morte celular por apoptose via TRAIL é mediada pela interação com dois receptores contendo domínios de morte, TRAIL-R1 (DR4) e TRAIL-R2 (DR5). A ligação de TRAIL a DR4 ou DR5 promove a formação de complexos de alta massa molecular que impulsiona a formação do DISC necessário para a transmissão do sinal apoptótico (SAYERS, 2011).

3.3.6 Efeito do silenciador TRAIL si-RNA na indução de apoptose por ESB em células A375

Com o objetivo de comprovar se TRAIL/DR4 seria o mecanismo pelo qual o extrato induz apoptose nas células A375, foi realizado um estudo de transfecção das células com o TRAIL si-RNA seguido do tratamento das células com o extrato para avaliar o processo de apoptose. O TRAIL si-RNA é um pequeno RNA de interferência formado por moléculas de nucleotídeos em fita dupla que quando introduzido na célula através do processo de transfecção promove uma inibição transitória da expressão de TRAIL.

Sendo assim, se o mecanismo TRAIL/DR4 fosse necessário para a indução da apoptose mediada pelo extrato ESB, com o processo de silenciamento de TRAIL esperava-se que não houvesse a indução de apoptose nas células transfectadas seguidas do tratamento com o extrato.

Os resultados mostraram que o processo de transfecção celular com TRAIL si-RNA foi satisfatório, uma vez que as células transfectadas apresentaram uma redução importante na expressão da proteína TRAIL.

Uma vez confirmada a inibição de TRAIL, prosseguiu-se o estudo de transfecção celular seguido do tratamento das células A375 transfectadas com o extrato ESB na concentração de 1,7 mg/mL. Para avaliar a indução de apoptose pelo extrato foi avaliada a clivagem da proteína PARP como marcador de morte celular por apoptose.

Os resultados mostraram que as células transfectadas com TRAIL si-RNA e tratadas com o extrato ESB exibiram quebra na proteína PARP, o que mostra que ocorreu o processo de apoptose mesmo quando TRAIL foi silenciado (Figura 15). Portanto, esse resultado indica que a indução de apoptose mediada por TRAIL/DR4 não é o único mecanismo envolvido na morte celular por apoptose induzida pelo extrato nas células de melanoma A375.

Figura 16 – Efeito do ESB na expressão da proteína TRAIL e indução de apoptose. Expressão das proteínas TRAIL e PARP nas células controle não silenciadas e nas células transfectadas com TRAIL-siRNA (12 μ L) tratadas ou não com o extrato ESB (1.7 mg/mL). Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

3.3.7 ESB induz ativação de NF- κ B nas células A375

Uma vez que foi constatado que a via TRAIL/DR4 não é a única envolvida no processo de apoptose mediada pelo extrato ESB, foi avaliado o efeito do extrato na ativação de NF- κ B. A decisão por investigar o efeito do extrato em NF- κ B baseou-se principalmente no aumento da expressão do receptor TNF-R2 induzido pelo tratamento das células com o extrato.

O receptor TNF-R2 pode iniciar a fosforilação de IKK levando à translocação de NF- κ B para o núcleo, da mesma forma que ocorre com o receptor TNF-R1 (WATERS; POBER; BRADLEY, 2013).

O NF- κ B inativo é localizado no citoplasma complexado com a proteína inibidora I κ B α . Em resposta a diversos estímulos a enzima I κ B quinase (IKK) fosforila a proteína I κ B α resultando em ubiquitinação, dissociação de I κ B α do NF- κ B e eventual degradação de I κ B α pelo proteassoma. O NF- κ B ativado é então translocado para o núcleo (SYED et al., 2007).

As análises de Western Blotting mostraram que o tratamento das células com o extrato ESB resultou na fosforilação do NF- κ B/p65 e consequente translocação do citoplasma para o núcleo. Além disso, foi observado um aumento de forma dose-dependente na forma fosforilada p-IKK α / β e diminuição de I κ B α possivelmente devido à sua degradação pelo proteassoma após a dissociação de I κ B α do NF- κ B (Figura 16)

Figura 17. Efeito do tratamento com ESB na ativação do NF- κ B. O extrato ESB (1,7 mg/mL por 24h) induziu a ativação de IKK e NF- κ B/p65. Os lisados citosólicos e nucleares foram analisados por Western Blotting. A igualdade na quantidade de proteínas nas amostras foi confirmada pela β -actina and lamina.

3.3.8 A inibição da ativação de NF- κ B inibe a apoptose induzida por ESB em células de melanoma A375

O mecanismo exato do NF- κ B na modulação da apoptose ainda não é inteiramente conhecido. Apesar de grandes evidências suportarem o papel citoprotetor do NF- κ B, recentemente tem aumentado as evidências de que a ativação do NF- κ B é capaz tanto de induzir quanto bloquear o processo de apoptose dependendo dos diferentes estímulos e diferentes tipos celulares (BARKETT; GILMORE, 1999; KUCHARCZAK et al., 2003).

Diante do conjunto de resultados obtidos no presente estudo, os quais mostraram a indução de apoptose e a ativação do NF- κ B pelo extrato ESB, foi investigado também o papel da ativação do NF- κ B pelo ESB na indução da apoptose nas células de melanoma. Para determinar se a ativação do NF- κ B era necessária para os eventos apoptóticos induzidos pelo extrato foi primeiramente realizado um estudo de inibição da ativação do NF- κ B. Os resultados desse estudo de inibição da ativação do NF- κ B mostraram que a inibição foi eficaz, uma vez que foi verificada a inibição da translocação do fosfo-NF- κ B/p65 Ser⁵³⁶ para o núcleo nas células tratadas com o inibidor em comparação com as não-tratadas (Figura 17).

Sendo assim, após constatado que o sistema NF- κ B estava realmente sendo inibido pelo inibidor foi realizado o tratamento das células com o extrato ESB para verificar o que ocorreria no processo de indução de apoptose. Se a via de sinalização do NF- κ B fosse de fato envolvida na atividade citotóxica do extrato ESB, a inibição da ativação do sistema NF- κ B deveria então inibir a apoptose nas células de melanoma induzida pelo extrato.

Figura 18. Efeito da inibição do NF-κB no processo de apoptose induzido pelo ESB. (a) Inibição da ativação do NF-κB e consequente inibição da ativação da caspase-3 induzida pelo ESB (1,7 mg/mL). (b) Coloração com anexina mostra que o tratamento das células com ESB previamente tratadas com o inibidor do NF-κB não induziu apoptose.

Interessantemente, foi observado que as células tratadas com o inibidor de ativação do NF-κB e posteriormente tratadas com o extrato não apresentaram clivagem da pró-caspase-3 em sua forma ativa, o que demonstra que a ativação da via de sinalização do NF-κB desempenha uma papel muito importante no processo de apoptose induzido pelo extrato ESB.

O resultado do presente trabalho corrobora com estudos realizados por Huang et al. (2000) que mostraram que o paclitaxel (Taxol®) induziu morte celular por apoptose via ativação do sistema de sinalização NF-κB/ IκBα em células de tumores sólidos. O paclitaxel aumentou a expressão da enzima IKKb, responsável pela degradação da IκBα e dissociação do complexo NF-κB/ IκBα, permitindo assim a translocação do NF-κB para o núcleo.

Estudos posteriores realizados pelo mesmo grupo de pesquisa também mostraram que os alcalóides da vinca, vinblastina e vincristina, apresentaram os mesmos efeitos do paclitaxel na cascata NF-κB/ IκBα, o que inclui a degradação da proteína IκBα e a ativação do NF-κB (HUANG et al., 2004). A ativação da via NF-κB/ IκBα desempenhou um importante papel na apoptose induzida pela vinblastina e vincristina em células tumorais (HUANG et al., 2004).

3.4 CONCLUSÕES

Esse estudo teve como objetivo investigar o potencial quimiopreventivo/quimioterapêutico do extrato ESB contra células de melanoma humano altamente metastáticas.

Como resultado, foi mostrado que o tratamento das células 451Lu e A375 com o extrato ESB resultou em um decréscimo na viabilidade/crescimento dessas células. De forma muito interessante, esse mesmo efeito não foi observado quando foi utilizado o extrato ESNB, o que mostra a grande importância do processo de biotransformação da soja pelo fungo *A. awamori* em conferir esse potencial quimiopreventivo/quimioterapêutico.

O principal mecanismo envolvido na redução do crescimento/viabilidade das células A375 induzido pelo extrato ESB é pela indução da apoptose, o que foi verificado na microscopia de fluorescência, ativação das caspases -3, -7, e -8 e clivagem de PARP. Além disso, foi claramente estabelecido que o tratamento das células A375 com ESB ocasionou um aumento na expressão de TRAIL/DR4. No entanto, foi também observado que esse mecanismo extrínscico via TRAIL/DR4 não é o principal envolvido na indução do processo de apoptose mediado pelo ESB, uma vez que foi observado a indução de apoptose em células de melanoma transfectadas com si-TRAIL e tratadas com o extrato.

Além disso, esse estudo mostrou que o tratamento das células de melanoma com o extrato ESB aumentou a fosforilação e ativação de IKK, degradação de I κ B α e translocação de p65/NF κ B para o núcleo. E por último, apesar de ser geralmente aceito que a ativação do NF- κ B ser responsável pela resistência à apoptose, neste estudo foi demonstrado que a estimulação da via do NF- κ B é necessária pela indução da apoptose mediada pelo extrato ESB. Esse resultado é muito interessante, uma vez que mostra que o mecanismo pelo qual o extrato ESB induz apoptose é semelhante aos mecanismos induzidos por agentes quimioterapêuticos como o paclitaxel e os alcaloides da vinca, vinblastina e vincristina.

Concluindo, esses estudos identificaram uma atividade anticâncer do extrato ESB que é altamente relevante para a quimioprevenção/quimioterapia contra o câncer de pele tipo melanoma. Baseando-se nesses resultados, sugere-se que sejam realizados estudos de isolamento das substâncias responsáveis por esse efeito para que sejam feitos estudos confirmatórios *in vivo*.

3.5 REFERÊNCIAS

AFAQ, F., et al. Protective effect of pomegranate-derived products on UVB-mediated damage in human reconstituted skin. **Experimental Dermatology**, Copenhagen, v. 28, p. 553-561, 2009.

AFAQ, F.; ADHAMI, V.M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutation research**, Amsterdam, v. 57, p.1153–1173, 2005.

ATKINS, M.B.; et al. Phase III trial comparing concurrent biochemotherapy with cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interleukin-2, and interferon alfa- 2b with cisplatin, vinblastine, and dacarbazine alone in patients with metastatic malignant melanoma (E3695): a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, New York, v. 26, p. 5748-54, 2008.

BARKETT, M; GILMORE, T.D. Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. **Oncogene**, Basingstoke, v. 18, p. 6910–24, 1999.

CURTIN, J.; COTTER, T. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas mediated apoptosis. **Cellular Signalling**, Oxford, v. 15, p. 983 – 992, 2003.

EINSPAHR, J.G.; BOWDEN, G.T.; ALBERTS, D.S. Skin cancer chemoprevention: strategies to save our skin. **Recent results in cancer research**, Berlin, v. 163, p. 151–164, 2003.

F'GUYER, S., AFAQ, F., MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, Oxford, v. 19, 56–72, 2003.

FORTES, V.S. 2011 **Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante e citotóxica do extrato de soja (*Glycine max*) biotransformada pelo *Aspergillus awamori***. Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

GEORGETTI, S.R.; et al. Enhanced in vitro and in vivo antioxidant activity and mobilization of free phenolic compounds of soybean flour fermented with different β -glucosidase-producing fungi. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 106, p. 459-466, 2009.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Apoptosis: Programmed cell death. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, p. 335-343, 2007.

GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **International journal of oncology**, Athens, v. 22, p.15-20, 2003.

GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **International journal of oncology**, Athens, v. 22, p. 15-20, 2003.

HAFEEZ, B.B., et al. A Dietary Anthocyanidin Delphinidin Induces Apoptosis of Human Prostate Cancer PC3 Cells In vitro and In vivo: Involvement of Nuclear Factor-KB Signaling. **Cancer Research**, Baltimore, v. 68, p. 8564-8572, 2008.

HELMBACH, H., et al. Drug resistance towards etoposide and cisplatin in human melanoma cells is associated with drug-dependent apoptosis deficiency. **Journal of Investigative Dermatology**, New York, v. 118, p. 923–932, 2002.

HSIEH, M.C.; GRAHAM, T.L. Partial purification and characterization of a soybean b-glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. **Phytochemistry**, London, v. 58, p. 995–1005, 2001.

HUANG, Y.; et al. Nuclear factor- κ B/I κ B signaling pathway may contribute to the mediation of paclitaxel-induced apoptosis in solid tumor cells. **Cancer Research**, Baltimore, v. 60, p. 4426–32, 2000.

HUANG, Y.; et al. Regulation of Vinca alkaloid-induced apoptosis by NF-KB/I κ B pathway in human tumor cells. **Molecular cancer therapeutics**, Philadelphia, v. 3, p. 271-277, 2004.

IGNEY, F.H.; KRAMMER, P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature reviews Cancer**, London, v. 2, p. 277–288, 2002.

KRAKSTAD, C.; CHEKENYA, M. Review Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. **Molecular Cancer**, London, v. 135, p. 1-14, 2010.

KUCHARCZAK, J.; et al. To be, or not to be: NF- κ B is the answer – role of Rel/NF- κ B in the regulation of apoptosis. **Oncogene**, Basingstoke, v. 22, p. 8961-8982, 2003.

KURANAGA, E. Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions in vivo. **Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms**, Oxford, v. 17, p. 83–97, 2012.

KURBANOV, B.M., et al. Resistance of melanoma cells to TRAIL does not result from upregulation of antiapoptotic proteins by NF- κ B but is related to downregulation of initiator caspases and DR4. **Oncogene**, Basingstoke, v. 26, p. 3364–3377, 2007.

LENS, M.B.; DAWES, M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. **The British journal of dermatology**, Oxford, v. 150, p. 179–185, 2004.

LI, J., et al. Plumbagin Enhances TRAIL-mediated Apoptosis through Up-regulation of Death Receptor in Human Melanoma A375 Cells. **Journal of Huazhong University of Science and Technology-Medical Sciences**, Wuhan, v. 30, p. 458-463, 2010.

MARTINOU, J.C.; YOULE, R.J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 21, p. 92-101, 2011.

MCCUE, P.; HORIL, A.; SHETTY, K. Mobilization of phenolic antioxidants from defatted soybean powders by *Lentinus edodes* during solid-state bioprocessing is associated with enhanced production of laccase. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 5, p. 385-392, 2004.

MOUAWAD, M.; et al. Treatment for metastatic malignant melanoma: Old drugs and new strategies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Boca Raton, v. 74, p. 27–39, 2010.

NALDI, L., et al. Risk of melanoma and vitamin A, coffee and alcohol: a case-control study from Italy. **European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)**, Oxford, v. 13, p. 503–508, 2004.

OLA, M.S.; NAWAZ, M.; AHSAN, H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 351, p. 41-58, 2011.

OTIENO, D.O.; ASHTON, J.F.; SHAH, N.P. Evaluation of enzymic potential for biotransformation of isoflavone phytoestrogen in soymilk by *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, Ottawa, v. 39, p. 394–407, 2006.

OUYANG, L., et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell proliferation**, Oxford, 2012, v. 45, p. 487–498, 2012.

RODRÍGUEZ-BERRIGUETE, G.; et al. Immunoreactivity to caspase-3, caspase-7, caspase-8, and caspase-9 forms is frequently lost in human prostate tumors. **Human Pathology**, Philadelphia, v. 43, p. 229–237, 2012.

SAYERS, T.J. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. **Cancer immunology and immunotherapy**, Berlin, v. 60, p. 1173–1180, 2011.

SIDDIQUI, I.A.; TARAPORE, R.S.; MUKHTAR, H. Prevention of skin cancer by green tea. **Cancer Biology & Therapy**, Georgetown, v. 8, p. 1288–1291, 2009.

SOENGAS, M.S.; LOWE, S.W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, Basingstoke, v. 22, p. 3138–3151, 2003.

STRASSER, A.; CORY, S.; ADAMS, J.M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. **The EMBO Journal**, London, v. 30, p. 3667–3683, 2011.

STRASSER, A.; O’CONNOR, L.; DIXIT, V.M. Apoptosis signaling. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v. 69, p. 217–245, 2000.

SYED, D.N., et al. Green tea polyphenol EGCG suppresses cigarette smoke condensate-induced NF- κ B activation in normal human bronchial epithelial cells. **Oncogene**, Basingstoke, v. 26, p. 673–682, 2007.

WANG, H.Z., et al. Effects of genistein and daidzein on the cell growth, cell cycle, and differentiation of human and murine melanoma cells. **The Journal of nutritional biochemistry**, Stoneham, v. 13, p. 421–426, 2002.

WATERS, J.P.; POBER, J.S.; BRADLEY, J.R. Tumor necrosis factor and cancer. **The Journal of pathology**, London, 2013. In press

WÜRSTLE, M.L.; LAUSSMANN, M.A.; REHM, M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 318, p. 1213–1220, 2012.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in physiological sciences**, Bethesda, v. 19, p. 124–28, 2004.