

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Clarissa Amorim Silva de Cordova

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DA ATIVIDADE
ANTITUMORAL DE DERIVADOS N-ALQUIL ÉSTERES DO
ÁCIDO GÁLICO, LIVRES OU ENCAPSULADOS EM
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS, PARA O
ESTUDO DO MELANOMA *IN VITRO* E *IN VIVO*

Florianópolis
Outubro/2011

Clarissa Amorim Silva de Cordova

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DA ATIVIDADE
ANTITUMORAL DE DERIVADOS N-ALQUIL ÉSTERES DO
ÁCIDO GÁLICO, LIVRES OU ENCAPSULADOS EM
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS, PARA O
ESTUDO DO MELANOMA *IN VITRO* E *IN VIVO*

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmácia, da Universidade Federal
de Santa Catarina, como requisito
para obtenção do título de Doutor
em Farmácia na Área de
Concentração de Fármaco-
medicamentos.

Orientadora: Tânia Beatriz
Creczynski Pasa, PhD

Florianópolis
Outubro/2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

C796a Cordova, Clarissa Amorim Silva de
Avaliação da toxicidade e da atividade antitumoral de
derivados n-alquil ésteres do ácido gálico, livres ou
encapsulados em nanopartículas lipídicas sólidas, para o
estudo do melanoma in vitro e in vivo [tese] / Clarissa Amorim
Silva de Cordova ; orientadora, Tânia Beatriz Creczynski Pasa.
- Florianópolis, SC, 2011.
187 p.: il., tabs., quadros

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina,
Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em
Farmácia.

Inclui referências

I. Farmácia. 2. Melanoma. 3. Ácido gálico. 4.
Antioxidantes. 5. Apoptose. 6. Estresse Oxidativo. 7.
Nanopartículas. I. Pasa, Tania Beatriz Creczynski. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

“Avaliação da toxicidade e da atividade antitumoral de derivados n-alquil ésteres do ácido gálico, livres ou encapsulados em nanopartículas lipídicas sólidas, para o estudo do melanoma *in vitro* e *in vivo*”

POR

Clarissa Amorim Silva de Cordova

Tese julgada e aprovada em sua forma final pela Orientadora e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira (UFRGS - Membro Titular)

Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde (UFSC - Membro Titular)

Prof. Dr. Márcio Alvarez da Silva (UFSC - Membro Titular)

Prof. Dr. Alcir Luiz Dafré (UFSC - Membro Titular)

Profa. Dra. Lílian Sibelle Campos Bernardes (UFSC - Membro Titular)

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa (UFSC - Orientadora)

Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 31 de outubro de 2011.

Dedico este trabalho aos meus pais, Dalcídio e Ilcir, ao meu esposo Fabiano e aos meus filhos, Pedro Henrique e Arthur Bernardo, pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais Dalcídio e Ilacir, meus irmãos Juliana e Fernando e meus cunhados Julisse e Camilo, por estarem sempre presentes me apoiando.

Ao meu marido Fabiano, pelo amor, amizade e companheirismo e por todo o apoio e paciência principalmente nos momentos mais difíceis da realização deste trabalho.

Aos meus filhos Pedro Henrique e Arthur Bernardo, por apesar de tão pequenos terem conseguido compreender, por muitas vezes, a necessidade de dividir a atenção.

À minha orientadora, Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa, pela amizade e exemplo de dedicação. E, principalmente, por ter me apresentado para a pesquisa, sendo a pessoa mais importante no desenvolvimento da minha vida acadêmica e científica.

Ao grupo do Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes, do Departamento de Química/CFM/UFSC, pelo fornecimento dos galatos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Célso Pilati, do Departamento de Medicina Veterinária/CAV/UDESC, pela amizade, pelos ensinamentos desde a época da minha graduação e pelo auxílio na avaliação histopatológica realizada neste trabalho.

Aos professores da Pós-Graduação em Farmácia/CCS/UFSC pela oportunidade de aprimorar os meus conhecimentos e pela dedicação nas disciplinas ministradas.

Ao Bruno, secretário da Pós-Graduação em Farmácia, pela dedicação no trabalho que realiza.

À Betina pela colaboração na realização deste trabalho por meio do fornecimento e caracterização das nanoformulações.

À Claudriana pela amizade de longa data, pelos ensinamentos, pela parceria, principalmente nos estudos *in vivo*, enfim pelo companheirismo e disponibilidade em ajudar sempre.

Às minhas grandes companheiras de bancada, Vânia e Evelyn, pela amizade e pela disposição para todo e qualquer experimento.

Aos colegas do laboratório, em especial a Andrea, Adny, Carine, Laura, Maurícia, Tatiane, Bruno e Francisco pela amizade, boa convivência e pela capacidade de trabalhar em grupo.

À CAPES, pela bolsa que financiou pelo menos parte do período do curso.

À Universidade Federal do Tocantins, por ter me concedido afastamento integral remunerado para a realização do curso de Doutorado.

Aos meus colegas de trabalho e amigos Viviane e Alberto por terem ministrado as aulas de Fisiologia permitindo que eu pudesse permanecer com o afastamento integral durante o período de três anos.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

"O que o gênero humano sabe é pouco; o que deseja saber, muito; o que há de sempre ignorar, infinito." Mariano da Fonseca, marquês de Maricá (1773-1848)

RESUMO

As terapias farmacológicas utilizadas nos casos avançados de melanoma metastático maligno parecem ser incapazes de curar ou melhorar a sobrevida dos pacientes, resultando numa das neoplasias mais refratárias ao tratamento. As respostas à quimioterapia são associadas a graus significativos de toxicidade e efeitos colaterais que podem resultar em interrupção do tratamento antes da possibilidade de erradicação do câncer. Este trabalho descreve a análise dos galatos de octila (G8) e de dodecila (G12) como agentes antitumorais para o tratamento do melanoma, com ênfase na elucidação do mecanismo de ação e na investigação da toxicidade *in vitro* e *in vivo*, assim como da atividade antimelanoma *in vivo*, utilizando a encapsulação dos galatos em nanopartículas lipídicas sólidas como estratégia para melhorar o potencial destes compostos como novos agentes antitumorais. A primeira parte deste estudo foi a investigação do mecanismo de citotoxicidade do G8 e do G12 sobre células de linhagem de melanoma murino B16F10 e de linhagens não tumorais renais. Para isso, vários métodos de avaliação da viabilidade celular foram usados visando determinar o alvo celular para a ação citotóxica dos mesmos. Os mecanismos relacionados à apoptose foram examinados por meio da avaliação da atividade da caspase-3, do estresse oxidativo, do potencial mitocondrial e da expressão de proteínas anti ou pró-apoptóticas. Ao comparar os diferentes métodos de avaliação da viabilidade celular, os galatos apresentaram uma maior citotoxicidade no ensaio indicativo da atividade lisossômica e da integridade da membrana plasmática em comparação com os relacionados às atividades mitocondrial e ribossômica. Promoveram, ainda, estresse oxidativo, despolarização da membrana mitocondrial, aumento na atividade de caspase-3 e aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas (Bax) e diminuição das anti-apoptóticas (Bcl-2). Entre as linhagens tumoral e não tumorais foi evidenciada maior citotoxicidade dos galatos para a primeira. A segunda parte do estudo foi a avaliação da toxicidade e atividade antimelanoma do G8 na forma livre ou encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas, usando modelos *in vivo* do melanoma murino. As nanopartículas brancas (sem G8) ou contendo o G8 encapsulado foram produzidas e caracterizadas quanto às características físico-químicas. Nos modelos estudados, a encapsulação do G8 na nanopartícula lipídica não aumentou a sua

atividade antimelanoma, entretanto, os efeitos colaterais foram amenizados. A encapsulação do G8 na nanopartícula resultou em uma diminuição da toxicidade geral, hepática e renal induzida pelo G8 na forma livre, porém, preservando sua eficácia em inibir o desenvolvimento de metástases pulmonares. Os estudos sobre o mecanismo de ação antimelanoma do G8 *in vivo* mostraram a indução de estresse oxidativo e a ativação de caspase-3 nos pulmões. Em adição, o composto diminuiu o conteúdo de melanina e aumentou a lipoperoxidação no tumor subcutâneo. Assim, os resultados *in vitro* indicam que a morte celular por apoptose induzida pelo G8 e G12 em células B16F10 apresenta maior seletividade para as células tumorais e envolve danos à membrana lipídica, além de disfunção mitocondrial e lisossomal, que foram acompanhadas por alterações na expressão e atividade de proteínas apoptóticas e parece ser desencadeada por estresse oxidativo celular. Os resultados *in vivo* revelam que a encapsulação na nanopartícula lipídica reduziu a toxicidade do G8, sem resultar, ao menos no modelo de metástase, em alteração na ação antitumoral do mesmo, a qual parece estar relacionada à indução de estresse oxidativo, ativação de caspase-3 pulmonar e inibição da concentração de melanina no tumor subcutâneo.

Palavras-chave: células de melanoma murino B16F10, derivados ésteres do ácido gálico, galato de octila, galato de dodecila, apoptose, estresse oxidativo, nanopartículas lipídicas sólidas.

ABSTRACT

***In vitro* and *in vivo* evaluation of toxicity and anti-tumor activity of gallic acid n-alkyl esters derivatives, in free form or encapsulated in solid lipid nanoparticles, for the study of melanoma**

Pharmacological therapies used in advanced cases of melanoma, seem to be incapable of curing or to improving the survival rates of patients, making melanoma one of the most treatment-refractory malignancies. Furthermore, responses to chemotherapy are often associated with significant degrees of toxicity and adverse side effects which may take the patient discontinue therapy before the drugs have the possibility to eradicate cancer. This work describes the analysis of the octyl and dodecyl gallates as potential new anticancer drugs for melanoma treatment, with emphasis on the elucidation of the mechanism of action and the investigation of *in vitro* and *in vivo* toxicity, as well as the *in vivo* antimelanoma activity. Moreover, the encapsulation of gallates in solid lipid nanoparticles was analyzed as a strategy to improve the potential of these compounds as new anticancer drugs. The first part of this study was the investigation of the mechanism of cytotoxicity of octyl (G8) and dodecyl (G12) gallates in a murine melanoma cell line (B16F10) and in non tumoral renal cell lines. For this purpose, several methods to measure cell viability were used to determine the cellular target of the cytotoxic effect of these gallates. Furthermore, the mechanisms related to apoptosis were studied, by monitoring the caspase-3 activity, oxidative stress, mitochondrial potential and the expression of anti- or proapoptotic proteins. Comparing various methods of assessing cell viability, the tested gallates showed higher cytotoxicity through the assays that indicate lysosomal activity and cell membrane integrity, compared with those related to mitochondrial and ribosomal activities. The gallates also promoted cellular oxidative stress, mitochondrial depolarization and increase in caspase-3 activity. Furthermore, the gallates induced an increase in proapoptotic (Bax) and a decrease in antiapoptotic (Bcl-2) proteins expression. The comparison of non-tumor with tumor cells lines showed a relative selectivity of gallates to tumor cells. The second part of the study was the evaluation of the toxicity and the antimelanoma activity of G8 in a free form or encapsulated into solid

lipid nanoparticles, using *in vivo* melanoma murine models. The nanoparticles G8-free or G8-full were produced and characterized physicochemically. The nanoencapsulation of G8 did not potentiate its antimelanoma activity; however, the side effects were ameliorated. This study shows that nanoencapsulation resulted in a decrease in general, kidney and liver toxicity induced by G8 in free form. Interestingly, its effectiveness in inhibiting the development of metastases in the lungs was maintained. Studies on the mechanism of this *in vivo* antimetastatic action showed the induction of lung oxidative stress and caspase-3 activation. In addition, the compound was able to decrease the melanin content and increase the lipid peroxidation in the subcutaneous tumor. Our results indicate that the apoptotic cell death induced by G8 and G12 was relatively selective to B16F10 cells and involves lipid membrane damages, lysosomal and mitochondrial dysfunctions, which were accompanied by alterations in apoptotic proteins expression and it seems to be triggered by cellular oxidative stress. The *in vivo* results show that encapsulation in lipid nanoparticle reduced the toxicity of G8, without at least in the model of metastasis, alter its antitumor activity, which seems to be related to induction of oxidative stress, activation of caspase-3 in lungs and inhibition of melanin levels in subcutaneous tumor.

Key words: murine melanoma B16F10 cells, gallic acid ester derivatives, octyl gallate, dodecyl gallate, apoptosis, oxidative stress, solid lipid nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes, estimadas para o ano de 2010, segundo a Unidade da Federação (melanoma maligno da pele).....	41
Figura 2: Representação simplificada das duas principais vias de apoptose.....	47
Figura 3: Cadeia de pesquisa e desenvolvimento de fármacos.....	49
Figura 4: Estrutura química do ácido gálico.....	51
Figura 5: Estrutura química dos derivados ésteres do ácido gálico com 8 e 12 carbonos na cadeia lateral.	59
Figura 6: Delineamento experimental para a avaliação da seletividade do efeito citotóxico do G8 e do G12 para a linhagem tumoral B16F10.	88
Figura 7: Delineamento experimental para a avaliação concentração e tempo resposta para o efeito citotóxico do G8 e do G12 nas células B16F10.....	89
Figura 8: Delineamento experimental para a avaliação dos mecanismos de citotoxicidade do G8 e do G12 nas células B16F10.....	91
Figura 9: Delineamento experimental para a caracterização e avaliação do potencial citotóxico de nanopartículas poliméricas e lipídicas.....	92
Figura 10: Delineamento experimental para a encapsulação e a quantificação dos galatos na nanopartícula lipídica.	93
Figura 11: Delineamento experimental para a comparação do efeito citotóxico do AG, G8 e G12 livres ou encapsulados em nanopartículas em células de linhagem tumoral e não tumoral.	94
Figura 12: Delineamento experimental para a avaliação da toxicidade <i>in vivo</i> do G8 livre e encapsulado na nanopartícula lipídica.....	95
Figura 13: Delineamento experimental para a avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> do G8 livre e encapsulado na nanopartícula lipídica em modelo de melanoma murino.	96

Figura 14: Triagem da citotoxicidade do AG e de 14 derivados ésteres (G1 a G18) nas células B16F10.....	98
Figura 15: Eletroforese em gel de agarose de DNA extraído de células B16F10 submetidas ao tratamento com o AG e com os derivados G8, G10, G12 e G14.	98
Figura 16: Análise da apoptose por coloração com laranja de acridina e brometo de etídio das células B16F10 submetidas ao tratamento com AG e derivados G8 e G12.....	99
Figura 17: Avaliação tempo-resposta da citotoxicidade do G8 e do G12 nas células B16F10.	102
Figura 18: Avaliação comparativa da citotoxicidade do G8 e do G12 nas células B16F10 utilizando diferentes métodos de avaliação da viabilidade celular.....	103
Figura 19: Comparação entre a concentração de proteína e de DNA nas células B16F10 após tratamento com o G8 e o G12..	104
Figura 20: Avaliação tempo-resposta do efeito do G8 e do G12 sobre a atividade da caspase-3 nas células B16F10.....	105
Figura 21: Efeito do AG e dos derivados G8 e G12 sobre o potencial mitocondrial nas células B16F10.	106
Figura 22: Efeito do G8 e do G12 sobre a expressão do Fas e das proteínas Bax e Bcl-2 nas células B16F10..	106
Figura 23: Avaliação da lipoperoxidação em células B16F10 tratadas com o AG e derivados G8 e G12..	107
Figura 24: Avaliação das espécies reativas intracelulares nas células B16F10 tratadas com o AG e derivados G8 e G12.....	108
Figura 25: Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes CAT e GST nas células B16F10 tratadas com o AG e derivados G8 e G12.....	109
Figura 26: Avaliação comparativa da citotoxicidade do G8 e do G12 nas células B16F10 utilizando inibidores das vias das MAPKs e da AKT.....	110
Figura 27: Imagens obtidas por MET de nanopartículas poliméricas de poliuretano. (A) PU; (B) PU-PEG.	111

Figura 28: Imagens obtidas por AFM de nanopartículas poliméricas de poliuretano.....	112
Figura 29: Imagens obtidas por MET da nanopartículas lipídica M.....	112
Figura 30: Avaliação do efeito de nanoformulações poliméricas e lipídicas sobre a viabilidade das células de duas linhagens não tumorais renais.	114
Figura 31: Ensaio de citotoxicidade da NVM nas células das linhagens B16F10 e J774..	115
Figura 32: Avaliação do efeito do tamanho da NVM sobre a viabilidade em células da linhagem B16F10.....	116
Figura 33: Espectro de absorção do AG e dos derivados G8 e G12 entre 200 e 900 nm.	117
Figura 34: Curvas analíticas do AG e dos derivados G8 e G12 em 300 nm.....	118
Figura 35: Comparação dos valores da concentração teórica com os valores obtidos por titulação da formulação total ou após separação por centrifugação.....	119
Figura 36: Comparação da citotoxicidade do AG e dos derivados G8 e G12 livres ou encapsulados na NVM após 24 horas de tratamento em células B16F10..	121
Figura 37: Comparação da citotoxicidade do AG e dos derivados G8 e G12 livres ou encapsulados na NVM após 48 horas de tratamento em células B16F10.....	122
Figura 38: Comparação da citotoxicidade do AG e dos derivados G8 e G12 livres ou encapsulados na NVM após 72 horas de tratamento em células B16F10.....	123
Figura 39: Avaliação comparativa da citotoxicidade dos galatos em três formas de tratamento nas células B16F10.....	124
Figura 40: Variação do peso corporal dos animais tratados com o G8 livre ou encapsulado na NVM (NMVG8).....	125
Figura 41: Avaliação histopatológica do fígado e do rim por meio de coloração com hematoxilina e eosina.....	126

Figura 42: Lesões na face e na cauda dos animais inoculados com células da linhagem B16F10 para o desenvolvimento de modelo de metástase de melanoma murino.....	129
Figura 43: Aspecto macroscópico e avaliação histopatológica por meio de coloração com hematoxilina e eosina do pulmão dos animais inoculados com células da linhagem B16F10 para o desenvolvimento de modelo de metástase de melanoma murino.....	130
Figura 44: Avaliação histopatológica por meio de coloração com hematoxilina e eosina do ponto de inoculação e do estômago dos animais inoculados com células da linhagem B16F10 para o desenvolvimento de modelo de metástase de melanoma murino.....	131
Figura 45: Atividade da caspase-3 em homogenatos do pulmão dos animais inoculados com células da linhagem B16F10 para o desenvolvimento de modelo de metástase de melanoma murino e tratados com o G8 ou NVMG8.....	132
Figura 46: Tamanho e peso do tumor subcutâneo dos animais inoculados com células B16F10 e tratados com o G8 ou NVMG8.....	133
Figura 47: Lipoperoxidação nos homogenatos de fragmentos do tumor subcutâneo dos animais inoculados com células da linhagem B16F10 e tratados com o G8 ou NVMG8.	134
Figura 48: Atividade da tirosinase e teor de melanina no tumor subcutâneo dos animais inoculados com células da linhagem B16F10 e tratados com o G8 ou NVMG8.....	135

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Mortalidade por grupos de causas: proporção de óbitos (%) por região no ano de 2007	39
Quadro 2: Estimativas para o ano 2010 de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária.....	40
Quadro 3: Regra Geral para a escolha do número de células na realização dos experimentos.....	61
Quadro 4: Grupos experimentais e respectivos tratamentos para a avaliação da toxicidade <i>in vivo</i> do G8.....	75
Quadro 5: Grupos experimentais e respectivos tratamentos para a avaliação da atividade antitumoral do G8 em modelos de melanoma.....	76
Quadro 6: Inibidores das vias das MAPKs e da AKT utilizados.....	90
Quadro 7: Picos de absorção do AG e dos derivados G8 e G12 após varredura espectrofotométrica entre 200 e 900 nm.	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de IC ₅₀ para citotoxicidade do G8 e do G12 em células da linhagem tumoral B16F10 e das linhagens não tumorais renais VERO e MDCK.....	100
Tabela 2: Comparação da ASC de citotoxicidade do G8 e do G12 em células da linhagem tumoral B16F10 e das linhagens não tumorais renais VERO e MDCK.....	100
Tabela 3: Tamanho de partícula, índice de polidispersão e valores de potencial zeta. Nanopartículas de diferentes constituições: quatro lipídicas (M, C, U, e B) e duas poliméricas (PU, PU-PEG).....	113
Tabela 4: Testes de encapsulação do AG e dos derivados G8 e G12 na NVM.....	119
Tabela 5: Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta da NVM após encapsulação com o AG e com os derivados G8 e G12.....	120
Tabela 6: Valores de IC ₅₀ e ASC da citotoxicidade induzida pelo AG e pelos derivados G8 e G12 livres ou encapsulados na NVM em células das linhagens B16F10 e VERO.....	124
Tabela 7: Hemograma e bioquímica sérica dos animais tratados com o G8 livre ou encapsulado na NVM (NMVG8).	127
Tabela 8: Estresse oxidativo no fígado dos animais tratados com o G8 livre ou encapsulado na NVM (NMVG8).	128
Tabela 9: Estresse oxidativo no pulmão dos animais tratados com G8 ou NMVG8 em modelo de metástase de melanoma.	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura/Sigla	Significado
%	porcento
λ	comprimento de onda
ϵ	coeficiente de extinção molar
Ac-DEVD-AMC	acetil-asp-glu-val-asp-amino metil cumarina
AFM	microscopia de força atômica (<i>atomic force microscopy</i> , em inglês)
AG	ácido gálico
AKT	proteína cinase serina/treonina (ou PKB)
ALT	alanina aminotransferase
AMC	amino metil cumarina
ANOVA	análise de variância de uma via
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	área sobre a curva
AST	aspartato aminotransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> , em inglês
ATP	trifosfato de adenosina
B	lipídio da nanopartícula B
B16F10	linhagem celular derivada de melanoma murino
Bax	proteína pró-apoptótica
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BE	brometo de etídio
BRAF	gene v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BSA	albumina sérica bovina (<i>bovine serum albumin</i> , em inglês)
C	lipídio da nanopartícula C
Ca²⁺ATPase	adenosina trifosfatase ativada por cálcio
CAT	catalase
CCND1	gene da ciclina D1
CDK4	gene da cinase dependente de ciclina 4
CDKN2A	gene inibidor de cinase dependente de ciclina 2
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate
CHCM	concentração da hemoglobina corpuscular média

CO₂	dióxido de carbono
CRSP3	gene supressor de metástase
DAB	3,3'- diaminobenzidina
DCF	diclorofluoresceína oxidada
DCFH	diclorofluoresceína reduzida
DCFH2-DA	diacetato de dicloro-dihidrofluoresceína
D-MEM	<i>Dulbelco's modified Eagle medium</i> , em inglês
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico (<i>deoxyribonucleic acid</i> , em inglês)
DPTA	ácido dietilenotriaminopentacético
DTNB	ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	ácido etilenoglicoltetracético
EMA	Agência Européia de Medicamentos (<i>European Medicines Agency</i> , em inglês)
EPM	erro padrão da média
ERK	proteína cinase regulada por sinais extracelulares
ERNS	espécies reativas de nitrogênio
EROS	espécies reativas de oxigênio
Fas	receptor de morte Fas
FCCP	p-trifluoro-metoxicarbonil ciano fenil hidrazina
FD	fator de diluição
FDA	Administração de Medicamentos e Alimentos (<i>Food and Drugs Administration</i> , em inglês)
G10	galato de decila
G11	galato de undecila
G12	galato de dodecila
G14	galato de tetradecila
G8	galato de octila
GAP	junções comunicantes ou <i>gap junctions</i> (em inglês)
GGT	gama-glutamil transferase
GPx	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona oxidada

GST	glutathione s-transferase
GT	glutathione total
H&E	hematoxilina e eosina
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HCM	hemoglobina corpuscular média
HeLa	linhagem celular de carcinoma cervical uterino (humana)
HEPES	ácido etanossulfônico de hidroxietil-piperazina
IC₅₀	concentração inibitória para 50% do efeito
IP	intraperitoneal
IV	intravenosa
J774	linhagem celular hematopoiética derivada de retículo-sarcoma murino
JNK	proteína cinase Jun N-terminal
K	coeficiente angular
KB	linhagem celular de carcinoma epidermóide (humana)
KCl	cloreto de potássio
KISS1	gene supressor de metástase
KIT	gene v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
KOH	hidróxido de potássio
LA	laranja de acridina
LDH	lactato desidrogenase
Log P	logaritmo do coeficiente de partição
M	lipídio da nanopartícula M
MAPKs	proteínas cinases ativadas por mitógenos
MCM	melanoma cutâneo maligno
MDA	malondialdeído
MDCK	linhagem celular derivada de epitélio renal canino
MEK1/2	cinase da proteína cinase ativada por mitógenos
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MgCl₂	cloreto de magnésio
MIA	atividade inibitória de melanoma (<i>melanoma inhibitory activity</i> , em inglês)
MITF	fator de transcrição associado à microfalmia
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NAD⁺	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado
NADH	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido

NADPH	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfato reduzido
NF-κB	fator de transcrição nuclear κB
nM23	gene supressor de metástase
NVM	nanopartícula lipídica M
NVMAG	nanopartícula lipídica M contendo AG
NVMG12	nanopartícula lipídica M contendo G12
NVMG8	nanopartícula lipídica M contendo G8
P&D	pesquisa e desenvolvimento
p/v	peso por volume
p38	proteína cinase ativada por mitógeno de 38 kD
PBS	solução salina tamponada (<i>phosphate buffered saline</i> , em inglês)
PDI	índice de polidispersão (<i>polydispersity index</i> , em inglês)
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
PI3K	fosfatidilinositol-3-cinase
PKB	proteína cinase B (ou AKT)
PLC/PRF/5	linhagem celular de hepatoma (humana)
PMSF	fluoreto de fenilmetil sulfonil
PTEN	fosfatase homóloga da tensina
PTN	proteína
PU	nanopartículas de poliuretano
PU-PEG	nanopartículas de poliuretano peguiladas
RMS1	gene supressor de metástase
SC	subcutânea
SDS	dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulphate</i> , em inglês)
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , em inglês)
SFB	soro fetal bovino
SNAi2	fator de transcrição snail homolog 2 (<i>Drosophila</i>)
SOD	superóxido dismutase
SRB	sulforodamina B
TAE	tampão a base de tris, ácido etilenodiaminotetracético e acetato
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (<i>thiobarbituric acid reactive substances</i> , em inglês)

TBS	solução salina tamponada com Tris
TBS-T	solução salina tamponada com Tris e contendo Tween
t-BuOOH	t-butil hidroperóxido
TCA	ácido tricloroacético
TE	tampão a base de tris e ácido etilenodiaminotetracético
TNB	ânion tiolato
TNF	fator de necrose tumoral
TRIS	tris(hidroximetil)-aminometano
U	lipídio da nanopartícula U
UA	unidades arbitrárias
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
UF	unidade de fluorescência
UnC	Universidade do Contestado
UNIARP	Universidade do Alto Vale do Rio do Peixe
EUA	Estados Unidos da América
UV	radiação ultravioleta
UVA	radiação ultravioleta do tipo UV-A
v/v	volume por volume
v/v/v	volume por volume por volume
VCM	volume corpuscular médio
VD1P1	gene supressor de tumor
VERO	linhagem celular derivada de rim de macaco verde africano
VN	vermelho neutro
WHO	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i> , em Inglês)
xg	multiplicado pela força centrífuga
dRLh-84	linhagem celular de hepatoma (rato)
HL-60RG	linhagem celular de leucemia pró-mielocítica (humana)
Bcl-2	proteína anti-apoptótica
AP-1	proteína ativadora 1
JC-1	iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Nome
°C	grau Celcius
°C/min	grau Celsius por minuto
cm	centímetro
dl	decilitro
fl	femtolitro
g	grama
g/dl	grama por decilitro
g/l	grama por litro
g/ml	grama por mililitro
h	hora
kg	kilograma
l	litro
M	molar (unidade de concentração)
mA	miliampère
mA/cm ²	miliampère por centímetro quadrado
mg	miligrama
mg/dl	miligrama por decilitro
mg/kg	miligrama por quilograma
mg/ml	miligrama por mililitro
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
mm ³	milímetro cúbico
mmol	milimol
mmol/min/mg	milimol por minuto por miligrama
mV	milivolt
N	normal (unidade de concentração)
nm	nanometro
nM	nanomolar
nmol	nanomol
nmol/mg	nanomol por miligrama
pg	picograma

pM	picomolar
pmol	picomol
pmol/mg	picomol por miligrama
s	segundo
U/ml	unidade por mililitro
UI/l	unidade internacional por litro
V	volt
µg	micrograma
µg/ml	micrograma por mililitro
µg/µl	micrograma por microlitro
µl	microlitro
µM	micromolar
µm	micrometro
µmol/min	micromol por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	39
2 OBJETIVOS	57
2.1 OBJETIVO GERAL.....	57
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
3 MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1 MATERIAIS.....	59
3.2 ÁCIDO GÁLICO E DERIVADOS N-ALQUIL ÉSTERES	59
3.3 ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	59
3.3.1 Cultura celular	59
3.3.1.1 Linhagens de células	59
3.3.1.2 Cultivo celular	60
3.3.2 Ensaio de viabilidade celular	61
3.3.2.1 MTT	62
3.3.2.2 Vermelho neutro.....	62
3.3.2.3 Atividade da lactato desidrogenase	63
3.3.2.4 Sulforodamina B	63
3.3.3 Ensaio de Fragmentação do DNA	64
3.3.3.1 Eletroforese em gel de agarose.....	64
3.3.3.2 Coloração com laranja de acridina e brometo de etídio	65
3.3.4 Avaliação da atividade da caspase-3	65
3.3.5 Avaliação do potencial mitocondrial	66
3.3.6 Imunodeteção de proteínas	67
3.3.6.1 Preparação dos extratos celulares.....	67
3.3.6.2 Procedimentos para a imunodeteção das proteínas.....	67
3.4 NANOFORMULAÇÕES	69
3.4.1 Preparação das nanopartículas lipídicas	69
3.4.2 Preparação das nanopartículas poliméricas	69
3.4.3 Caracterização das nanopartículas	70
3.4.3.1 Análise do tamanho	70
3.4.3.2 Determinação do potencial zeta	70

3.4.3.3	Avaliação da morfologia.....	70
3.4.4	Encapsulação das substâncias na nanoformulação.....	71
3.4.5	Construção da curva analítica para quantificação das substâncias encapsuladas na nanoformulação	71
3.4.6	Determinação da concentração e da eficiência de encapsulação das substâncias na nanoformulação	72
3.5	ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	73
3.5.1	Animais	74
3.5.2	Soluções.....	74
3.5.3	Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i> do G8.....	74
3.5.4	Avaliação da atividade antitumoral do G8	76
3.5.4.1	Modelo de metástase pulmonar	76
3.5.4.2	Modelo de tumor subcutâneo.....	77
3.5.4.2.1	<i>Teor de melanina</i>	77
3.5.4.2.2	<i>Atividade da tirosinase</i>	78
3.5.5	Atividade da caspase-3 no pulmão	78
3.5.6	Avaliação histopatológica	78
3.6	ESTRESSE OXIDATIVO	79
3.6.1	Tratamentos e obtenção das amostras	79
3.6.1.1	Células B16F10	79
3.6.1.2	Tecido pulmonar e hepático dos camundongos	80
3.6.2	Determinação de espécies reativas.....	80
3.6.3	Avaliação da lipoperoxidação	81
3.6.4	Catalase.....	82
3.6.5	Glutathiona S-transferase	82
3.6.6	Glutathiona peroxidase.....	83
3.6.7	Glutathiona redutase	84
3.6.8	Quantificação dos tióis não-protéicos.....	85
3.7	DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	85
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	86
3.9	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	87
3.9.1	Triagem da atividade citotóxica do ácido gálico e derivados ésteres em células de linhagem de melanoma murino.....	87

3.9.2	Comparação do efeito citotóxico dos galatos de octila e de dodecila entre células de linhagem de melanoma murino e de duas linhagens não tumorais	88
3.9.3	Avaliação tempo e concentração-resposta da citotoxicidade dos galatos de octila e de dodecila nas células de linhagem de melanoma murino	89
3.9.4	Avaliação dos mecanismos de citotoxicidade dos galatos de octila e de dodecila nas células de linhagem de melanoma murino.....	90
3.9.5	Nanoformulações: caracterização e avaliação de potencial citotóxico	92
3.9.6	Encapsulação do ácido gálico e dos derivados ésteres galato de octila e galato de dodecila na nanopartícula.....	93
3.9.7	Citotoxicidade do ácido gálico e derivados ésteres galato de octila e galato de dodecila encapsulados na nanopartícula.....	94
3.9.8	Toxicidade <i>in vivo</i> do galato de octila livre e encapsulado na nanopartícula lipídica	95
3.9.9	Efeito antitumoral e antimetastático do galato de octila livre e encapsulado na nanopartícula em modelo de melanoma murino	96
4	RESULTADOS	97
4.1	ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	97
4.1.1	Triagem da atividade citotóxica do ácido gálico e derivados ésteres em células de linhagem de melanoma murino.....	97
4.1.2	Comparação do efeito citotóxico dos galatos de octila e de dodecila entre as células de linhagem de melanoma murino e de duas linhagens não tumorais	99
4.1.3	Avaliação tempo e concentração-resposta da citotoxicidade dos galatos de octila e de dodecila em células de linhagem de melanoma murino	101
4.1.4	Avaliação dos mecanismos de citotoxicidade dos galatos de octila e de dodecila nas células de linhagem de melanoma murino.....	104
4.1.4.1	Efeitos sobre as vias de apoptose	104
4.1.4.2	Efeitos sobre o estresse oxidativo	107

4.1.4.3 Envolvimento das vias das proteínas cinases ativadas por mitógenos e da proteína cinase serina/treonina ou proteína cinase B.....	109
4.1.5 Nanoformulações: caracterização e avaliação de potencial citotóxico.....	111
4.1.5.1 Caracterização das nanoformulações.....	111
4.1.5.1.1 <i>Morfologia das nanopartículas</i>	111
4.1.5.1.2 <i>Tamanho, índice de polidispersão e estabilidade das nanopartículas</i>	113
4.1.5.2 Citotoxicidade das nanoformulações em células de linhagem não tumoral renal.....	113
4.1.5.3 Escolha da nanoformulação para a continuidade dos estudos.....	114
4.1.5.4 Citotoxicidade da nanoformulação selecionada nas células de linhagem de melanoma e de macrófago murinos.....	115
4.1.6 Encapsulação do ácido gálico e dos derivados ésteres galato de octila e galato de dodecila na nanopartícula	116
4.1.6.1 Curva analítica para quantificação dos galatos.....	116
4.1.6.2 Testes de encapsulação dos galatos na nanoformulação M.....	118
4.1.6.3 Caracterização das nanoformulações contendo os galatos.....	120
4.1.7 Citotoxicidade do ácido gálico e derivados ésteres galato de octila e galato de dodecila encapsulados na nanopartícula.....	120
4.2 ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	125
4.2.1 Toxicidade <i>in vivo</i> do galato de octila livre e encapsulado na nanopartícula lipídica	125
4.2.2 Efeito antitumoral e antimetastático do galato de octila livre e encapsulado na nanopartícula em modelo de melanoma murino	128
4.2.2.1 Modelo de metástase.....	128
4.2.2.2 Modelo de tumor subcutâneo.....	133
5 DISCUSSÃO.....	137
6 CONCLUSÕES	149
7 PERSPECTIVAS	151

REFERÊNCIAS	153
APÊNDICES.....	171
APÊNDICE A - Lista de equipamentos.....	171
APÊNDICE B - Lista de reagentes.....	173
APÊNDICE C - Lista de materiais	181
APÊNDICE D - Relação dos anticorpos utilizados nos estudos de imunodeteccão de proteínas.	183
APÊNDICE E - Produção científica do período de realização do doutorado.....	185
ANEXOS	187
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UnC.....	187

1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado um grande problema de saúde pública, sendo as neoplasias apontadas como a causa de aproximadamente 17% dos óbitos por doença no Brasil (Quadro 1). Em 2008, segundo informações da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization - WHO) foram estimados 12,7 milhões de novos casos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo (WHO, 2011). No Brasil, as estimativas para o ano de 2010, que são válidas também para 2011, são de cerca de 500 mil novos casos de câncer, como apresentado no Quadro 2 (BRASIL, 2009).

Quadro 1: Mortalidade por grupos de causas: proporção de óbitos (%) por região no ano de 2007

Grupo de causas	Regiões					Total
	N	N.E.	S.E.	S	C.O.	
Doenças infecciosas e parasitárias	6,67	5,04	4,63	3,88	5,18	4,75
Neoplasias	13,96	13,83	17,50	20,07	15,3	16,69
Doenças do aparelho circulatório	25,45	32,63	32,31	32,11	30,29	31,88
Doenças do aparelho respiratório	10,04	8,64	11,77	11,70	10,34	10,80
Afeções originadas no período perinatal	6,46	4,07	2,05	1,70	3,00	2,78
Causas externas	18,74	15,11	12,00	12,57	17,21	13,54
Demais causas definidas	18,68	20,68	19,74	17,97	18,68	19,56
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2010.

Quanto ao melanoma, apesar da baixa incidência sua letalidade é elevada (BRASIL, 2009). O melanoma cutâneo maligno (MCM) é considerado por muitos o mais perigoso dos cânceres de pele devido à sua propensão a metástase. O número de casos de

melanoma no mundo está aumentando mais rápido do que qualquer outro câncer representando cerca de 4 a 5 % de todos os tumores malignos (JEMAL et al., 2009). No Brasil, estima-se que seis mil novos casos de MCM são diagnosticados a cada ano como apresentado no Quadro 2, e este número poderia ser ainda maior se considerarmos que muitos casos podem estar deixando de ser notificados (ASHTON-PROLA et al., 2008).

Quadro 2: Estimativas para o ano 2010 de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária*

Localização Primária	Estimativa de Casos Novos		
	Masculino	Feminino	Total
Neoplasia Maligna			
Próstata	52.350	-	52.350
Mama Feminina	-	49.240	49.240
Traqueia Brônquio e Pulmão	17.800	9.830	27.630
Cólon e Reto	13.310	14.800	28.110
Estômago	13.820	7.680	21.500
Colo do Útero	-	18.430	18.430
Cavidade Oral	10.330	3.790	14.120
Esôfago	7.890	2.740	10.630
Leucemias	5.240	4.340	9.580
Pele Melanoma	2.960	2.970	5.930
Outras Localizações	59.130	78.770	137.900
Subtotal	182.830	192.590	375.420
Pele não Melanoma	53.410	60.440	113.850
Todas as Neoplasias	236.240	253.030	489.270

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Fonte: Instituto Nacional de Câncer - INCA/MS (Brasil, 2009)

Em contraste com outros tipos de câncer, o MCM acomete mais freqüentemente indivíduos mais jovens, com idade média de cinquenta anos (FERRARI JR et al., 2008).

Vários fatores de risco para o desenvolvimento do MCM foram identificados. A origem étnica é particularmente importante sendo uma doença que acomete principalmente as populações de

origem européia. Dentro destas populações suscetíveis, algumas características cutâneas e pigmentares aumentam o risco individual para o desenvolvimento do melanoma incluindo a presença de múltiplos nevos, nevos atípicos ou displásicos, sardas, cabelos ruivos, pele que não adquire uma cor bronzeada (fototipo I) e uma história de queimaduras solares (BRESSAC-DE-PAILLERETS et al., 2002). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a exposição ao sol, especialmente na infância, é uma das principais causas ambientais de melanoma, e que até 65 % dos casos são relacionados a queimaduras (ARMSTRONG; KRICKER, 1993; WHITEMAN; WHITEMAN; GREEN et al., 2001).

No Brasil as maiores taxas de incidência do MCM estão nos Estados da região Sul, onde se concentra a maior proporção de indivíduos de ascendência norte-européia (FIGURA 1). Investigações acerca dos fatores de risco ambientais para o MCM nesta região revelaram a ocorrência da maior proporção de indivíduos de pele clara no País, o recebimento de 10 % mais radiação ultravioleta (UV) e a maior concentração mundial de radiação ultravioleta A (UVA) durante os meses de verão, além da exposição intensa ao sol nestes meses de grande número de pessoas, especialmente crianças e adolescentes, sem fotoproteção adequada (ANGELI et al., 1997).

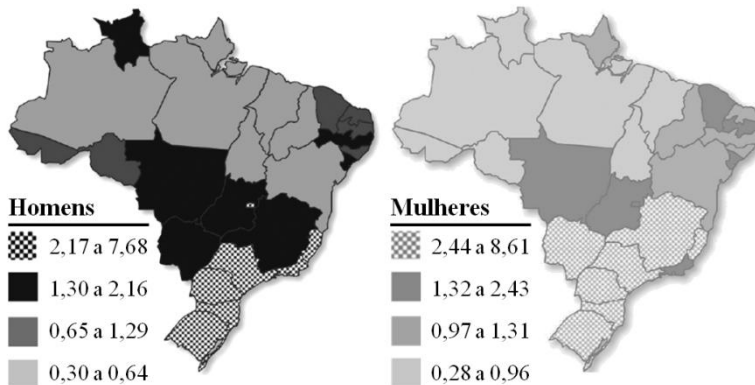


Figura 1: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes, estimadas para o ano de 2010, segundo a Unidade da Federação (melanoma maligno da pele).

Fonte: Adaptado de Brasil, 2009.

A história familiar positiva para a doença foi relatada em cerca de 8 a 14 % dos pacientes com MCM na Europa e na América do Norte (GRANGE et al., 1995). Foi sugerido que a presença de mais de um caso de melanoma na família poderia ocorrer por acaso, por hábitos de exposição solar comuns aos familiares afetados ou devido a genes de baixa penetrância, no entanto em torno de 25 % dos casos de melanoma familiar estaria associado a mutações no gene inibidor de cinase dependente de ciclina 2 (CDKN2A), apresentando-se muitas vezes com um padrão de transmissão autossômica dominante (GREENE, 1999). Esta mutação também foi encontrada na população brasileira (ASHTON-PROLLA et al., 2008).

Segundo a literatura, o melanoma cutâneo é o câncer cujos melhores marcadores prognósticos já identificados em tumores sólidos estão disponíveis, no entanto, com muito pouca compreensão do seu significado biológico. Entre estes marcadores prognósticos citados, estão incluídas a espessura, área transversal e profundidade do tumor, avaliados pelo Índice de Breslow, a presença de ulceração, a taxa de atividade mitótica, a infiltração de linfócitos no tumor e o sexo do indivíduo acometido pela doença (SPATZ; BATIST; EGGERMONT, 2010).

Os biomarcadores também são citados no diagnóstico e classificação de prognóstico de vários tipos de câncer podendo ter utilidade no acompanhamento do curso clínico da doença ou na resposta do paciente à terapia. Geralmente, o biomarcador é uma proteína cuja expressão estaria associada com a doença podendo ter como fonte a própria célula tumoral ou células do microambiente do tumor. Assim, a maioria dos biomarcadores pode ser encontrada principalmente nos tecidos tumorais, mas em muitos casos tornam-se detectáveis nos fluidos corporais, tais como o sangue. Além de biomarcadores morfológicos e histopatológicos uma variedade crescente de marcadores sorológicos foi identificada, fornecendo a possibilidade de uma classificação diagnóstica e prognóstica mais detalhada dos tumores. Em relação ao melanoma são citados como biomarcadores a lactato desidrogenase (LDH), proteína de atividade inibitória de melanoma (MIA) e as proteínas S100 e TA90. Outros marcadores descritos incluem moléculas de adesão, citocinas e fatores angiogênicos. No entanto, a sensibilidade e a especificidade dos marcadores não são suficientes para torná-las valiosas como ferramentas de prognóstico em pacientes com melanoma maligno (MOUAWAD; SPANO; KHAYAT, 2010).

Por isso, entre os objetivos da pesquisa sobre o melanoma está a compreensão das correlações entre os fatores prognósticos e a biologia da doença que poderia levar à identificação de novos alvos terapêuticos além de novos fatores preditivos (SPATZ; BATIST; EGGERMONT, 2010).

A primeira meta do tratamento para câncer é sempre a erradicação da doença. No entanto, em muitas situações, diante da impossibilidade de atingir esta primeira meta, os objetivos da terapêutica buscam promover a melhoria dos sintomas, a preservação da qualidade de vida e o aumento da sobrevida.

O tratamento de doentes com MCM avançado continua sendo um desafio. Os tratamentos quimioterápicos que são eficazes em vários tipos de câncer são muitas vezes ineficazes nesses pacientes (HUNCHAREK; CAUBET; MCGARRY, 2001). As terapias usadas em casos avançados, como quimioterapia, radioterapia, bioquimioterapia e vacinas parecem ser incapazes de prover a cura ou melhora da sobrevida tornando o melanoma uma das neoplasias mais refratárias aos tratamentos (MOUAWAD et al., 2010). Embora a cirurgia e a radioterapia sejam muito importantes no tratamento da doença metastática, o tratamento sistêmico continua sendo a base da terapêutica para a maioria dos pacientes, incluindo neste a quimioterapia, a imunoterapia, ou uma combinação de abordagens como bioquimioterapia (BHATIA; TYKODI; THOMPSON, 2009). Além disso, novas terapias estão atualmente sob investigação. A quimioterapia com agentes citotóxicos tem sido utilizada para o tratamento de melanoma metastático por mais de três décadas. Entre os agentes quimioterapêuticos com eficácia antitumoral modesta em melanoma metastático estão incluídos os agentes alquilantes (dacarbazina, temozolomida, nitrosuréias), análogos da platina (cisplatina, carboplatina) e toxinas microtubulares (vincas e taxanos), os quais têm sido utilizados isoladamente ou em combinação (BHATIA; TYKODI; THOMPSON, 2009). Especificamente em relação à quimioterapia citotóxica, a dacarbazina utilizada como agente quimioterápico único ainda representa a opção mais comum (NASHAN et al., 2007; HAMM et al. 2008, BHATIA; TYKODI; THOMPSON, 2009; JI; FLAHERTY; TSAO, 2010). Foi demonstrado que as combinações de agentes citotóxicos podem produzir taxas de resposta um pouco superiores à monoterapia com dacarbazina, mas estão associados à maior toxicidade e não estendem de forma significativa a sobrevida dos pacientes (BHATIA; TYKODI; THOMPSON, 2009). Há uma necessidade

urgente da busca de agentes individuais mais eficazes e do desenvolvimento de novas opções de tratamento, que, isoladamente ou em combinação, exerçam um impacto mais significativo sobre essa doença (MOUAWAD et al., 2010).

Embora de efeito terapêutico limitado, a dacarbazina não pode ser rejeitada como terapia padrão para o melanoma disseminado, pois, em estudo baseado em evidência, nenhum outro esquema terapêutico apresentou maiores benefícios para a sobrevida dos pacientes (NASHAN et al., 2007). Os mesmos autores da análise citada ressaltam, pela falta de progresso terapêutico nos últimos 40 anos, a necessidade de novos estudos clínicos e da inclusão de pacientes nestes ensaios clínicos, sempre que possível.

No estado neoplásico ocorre a proliferação e o crescimento celular de forma descontrolada originando células transformadas, decorrentes do colapso dos mecanismos normais de controle da proliferação e maturação das células associados a carcinogênese (HANAHAH; WEINBERG, 2000).

As neoplasias são causadas por mutações genéticas que resultam em controle anormal do crescimento. Diz-se que a lesão genética não-letal está no centro da carcinogênese podendo ser uma lesão adquirida nas células somáticas por agentes ambientais ou ser herdada na linhagem germinativa. Os mecanismos genéticos envolvidos nas neoplasias incluem: a) expressão de produtos gênicos com atividade inadequada, que em condições normais estimulam o crescimento (oncogenes), b) perda da atividade de produtos gênicos que em condições normais inibem o crescimento (antioncogenes ou supressores do tumor), c) expressão excessiva de produtos gênicos que impedem o processo normal de morte celular ou d) perda da atividade dos produtos gênicos que em condições normais promovem o reparo do DNA (TAMURA et al., 2004).

Numerosas alterações celulares podem ser encontradas nos melanomas incluindo mutações no gene BRAF e em outros genes que regulam a progressão do ciclo celular tais como o gene do receptor tirosina cinase (KIT) e os genes da ciclina D1 (CCND1) e da cinase dependente de ciclina 4 (CDK4) (TAKATA; MURATA; SAIDA, 2010).

A habilidade das neoplasias malignas de produzirem metástase em órgãos distantes ao do tumor primário (origem) é um evento clínico de ocorrência letal em muitas doenças neoplásicas. Os principais sítios de invasão dos tumores metastáticos são o pulmão e o fígado. No caso do melanoma ocular a metástase pode apenas se

manifestar décadas após a remoção do tumor primário. Já no MCM a recidiva pode ocorrer rapidamente, espalhando-se para os tecidos cutâneos, pulmões, fígado, cérebro e ossos. Entretanto, a recorrência do melanoma ocorre geralmente dentro de dois anos de diagnóstico, com poucas recidivas após cinco anos. Durante a progressão do melanoma, os fatores de transcrição MITF e SNAi2 têm sido reportados como relacionados à sobrevivência e à migração do melanócito durante o processo de metástase e a perda do receptor acoplado à proteína G GpR56 relacionada ao crescimento do tumor (NGUYEN; BOS; MASSAGUÉ, 2009).

Steeg (2003) revisou alguns genes supressores de metástase descritos para o melanoma, como NM23, RMS1, KiSS1, CRSP3e VDUP1 os quais influenciam mecanismos importantes de sinalização celular como as vias das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), as junções comunicantes (GAP) e os receptores acoplados a proteína G e tirosina cinase, sendo sugeridos como alvos potenciais para a terapêutica do melanoma (SONG et al., 2003).

Foi demonstrado que as células de melanoma apresentam baixos níveis de apoptose espontânea *in vivo* em comparação com outros tipos de células tumorais, e são relativamente resistentes à apoptose induzida por agentes químicos *in vitro* (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007; SOENGAS; LOWE, 2003). Essas alterações nas vias de apoptose ou nos seus mecanismos regulatórios são eventos fundamentais nas malignidades humanas e, portanto despertam grande interesse como alvo na intervenção terapêutica (MITA; MITA; TOLCHER, 2006).

A apoptose representa um mecanismo de morte celular universal, dependente de energia e altamente regulado e ocorre em processos fisiológicos e patológicos (DANIAL; KORSMEYER, 2004). A célula apoptótica reorganiza o citoesqueleto, diminui de tamanho e produz corpos apoptóticos que são rapidamente ingeridos por fagócitos que os reconhecem via antígenos de superfície produzidos durante o processo. Os corpos apoptóticos impedem o extravasamento de material citoplasmático para o meio extracelular, não havendo resposta inflamatória (FINK; COOKSON, 2005).

O mecanismo da apoptose ocorre por duas vias principais denominadas extrínseca e intrínseca as quais estão ilustradas na Figura 2. A primeira, via extrínseca ou citoplasmática, é acionada pelo do receptor de morte Fas, membro da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNF). A segunda, via intrínseca ou mitocondrial, quando ativada, resulta na liberação do citocromo C da

mitocôndria para o citoplasma e na ativação do sinal de morte. Independente da via ativada, o processo final que resulta na morte é comum, e envolve a ativação de uma cascata de proteases denominadas caspases (KHAN, 2010). As caspases são proteases específicas para cisteína e aspartato com uma função bem estabelecida na via apoptótica em diversos tipos celulares (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997). São responsáveis pela clivagem de diversos substratos celulares resultando na morte celular por apoptose (BOATRIGT; SALVESEN, 2003; PHILCHENKOV, 2004; BREMER et al., 2006; KUMAR, 2007).

Convém ressaltar que a apoptose também pode ser induzida por estresse no retículo endoplasmático e também já foi descrita a ocorrência de apoptose por uma via independente de caspase (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2005).

Alguns eventos bioquímicos parecem ser importantes na mediação da lesão da morte celular: oxigênio, cálcio intracelular e a perda da homeostase de cálcio, depleção de trifosfato de adenosina (ATP) e defeitos na permeabilidade da membrana (ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2010). A mitocôndria regula o efluxo de cálcio e também tem um papel importante nos estímulos pró e anti-apoptóticos, sendo responsável por 80 a 90 % do ATP necessários para respiração e sobrevivência celular (DIAS; BAILLY, 2005). A depleção intracelular de ATP, pelo desacoplamento da ATP sintase mitocondrial, induz à morte celular por apoptose, exibindo a fragmentação do DNA, demonstrando que a deficiência energética ou depleção de ATP induz a apoptose. Assim, foi sugerido que a proliferação de células tumorais pode ser impedida por substâncias que comprometam a integridade estrutural e funcional da mitocôndria e, conseqüentemente, o metabolismo energético celular (GARLAND; HALESTRAP, 1997).

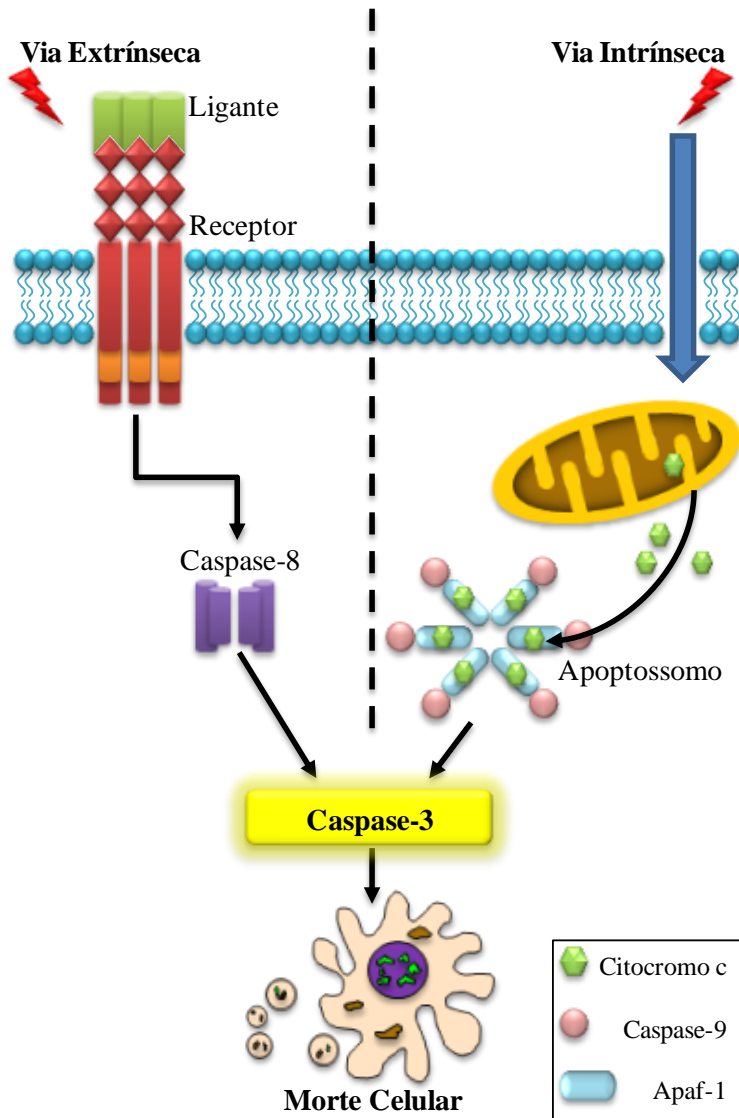


Figura 2: Representação simplificada das duas principais vias de apoptose. A via extrínseca é acionada pelo receptor de morte Fas e ativa a caspase-8. A ativação da via intrínseca resulta na liberação do citocromo c e na ativação da caspase-9. O processo final de ambas as vias consiste na ativação da caspase-3 desencadeando a apoptose.

Fonte: Adaptado de MacFarlane; Williams, 2004.

Outro fator que contribui para novas intervenções na terapia do câncer é o entendimento da complexa interação entre os diferentes mecanismos de defesa em resposta ao estresse celular, que pode possibilitar a identificação de alvos moleculares de sensibilidade ou de resistência em células tumorais (PELICANO; CARNEY; HUANG, 2004).

O estresse oxidativo, definido como o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, tem sido associado a uma variedade de doenças humanas (VALKO et al., 2007).

Durante a tumorigênese, foi relatado que as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) podem influenciar na transdução de sinal, e na expressão de genes demonstrando uma participação importante no processo, sendo os efeitos nocivos destas espécies controlados principalmente pela ação da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), embora as demais enzimas antioxidantes e os antioxidantes endógenos também participem (VALKO et al., 2006).

Entre os alvos celulares para o efeito carcinogênico destas espécies reativas são citados a proteína ativadora 1 (AP-1) e o fator nuclear kappa B (NF- κ B) (VALKO et al., 2006)

Por outro lado, tem sido demonstrada a indução da morte de células tumorais em resposta a agentes pró-oxidativos (MORITA; ARIMOCHI; OHNISHI, 2003). Está bem estabelecido que a geração de EROS pode levar a morte celular por mecanismos distintos, apoptose ou necrose (RYTER et al., 2007). O envolvimento das EROS na morte por apoptose é relatado por estudos em que a adição de baixas concentrações de EROS induz a morte celular apoptótica a qual seria prevenida pela adição de antioxidantes às condições experimentais. A geração de EROS já foi reportada na apoptose mediada por TNF e Fas, assim como nas células expostas à radiação UV e a tratamentos quimioterápicos (CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002; HILEMAN et al., 2004; PELICANO; CARNEY; HUANG, 2004).

A Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de novos fármacos seguem várias etapas, iniciando pela descoberta ou síntese de uma molécula e pela avaliação de sua ação biológica. Após essa etapa, podem ser realizadas alterações na molécula visando acréscimos em seu potencial e em sua seletividade ou a diminuição de uma eventual toxicidade. Finalmente, são necessários testes de eficácia e segurança em modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (animais) para que posteriormente os fármacos possam ser testados em humanos.

Os estágios tecnológicos na indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos fármacos incluem: 1) P&D; 2) Produção de Farmoquímicos; 3) Produção de Especialidades Farmacêuticas; e 4) Marketing e Comercialização das Especialidades Farmacêuticas (VIEIRA; OHAYON, 2006).

No que diz respeito à P&D farmacêutica, a pesquisa corresponde às fases de triagem (*screening*) e de desenho molecular e aos estudos farmacológicos em busca de uma molécula promissora, e o desenvolvimento inclui as fases que compreendem os estudos toxicológicos e clínicos, de eficácia e de segurança, além do patenteamento do fármaco (VIEIRA; OHAYON, 2006).

Considerando o que foi denominado por Vieira e Ohayon (2006) “Ciclo do Medicamento Inovador”, são discriminadas cinco funções, que estão inseridas nos quatro estágios tecnológicos na indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos fármacos. Estas funções incluem a pesquisa básica, o desenvolvimento e a produção, além das funções regulatórias, de marketing e comercial (FIGURA 3).

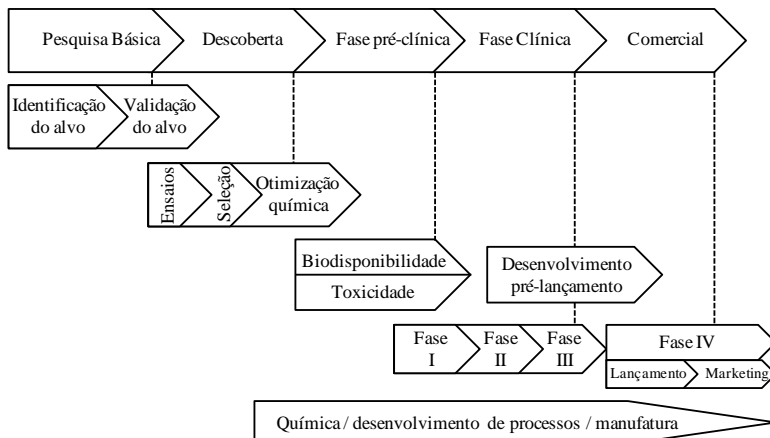


Figura 3: Cadeia de pesquisa e desenvolvimento de fármacos.

Fonte: VIEIRA; OHAYON, 2006.

Na pesquisa básica, após a escolha da doença alvo para o novo medicamento iniciam-se as atividades de pesquisa com a triagem (*screening*) buscando a seleção de uma ou mais moléculas com potencial farmacológico. Neste processo, grande parte das substâncias testadas é descartada, no entanto, Vieira e Ohayon

(2006) ressaltam que embora 75 % dos custos de desenvolvimento de um novo medicamento sejam usados nesta fase, a descoberta de uma única substância ativa é um grande achado, justificado em função do possível retorno financeiro.

Em relação ao desenvolvimento no âmbito internacional, cada país tem sua própria autoridade regulatória, como por exemplo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, a *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA e a *European Medicines Agency* (EMA) na União Européia. Estas autoridades estabelecem os regulamentos para a aprovação dos protocolos de estudos clínicos, assim como são responsáveis por garantir a qualidade no desenvolvimento de novos medicamentos e na produção, distribuição, rotulagem e monitorização da segurança destes e de medicamentos já registrados.

Os modelos de tumores sólidos em murinos fazem parte da pesquisa na busca de novos fármacos antitumorais há pelo menos quatro décadas. Estudos realizados nas décadas de 70 e 80 revelaram que a inclusão destes modelos na pesquisa de novos fármacos proporcionou um grande avanço nesta área embora mais tarde esses estudos acabassem concluindo que apesar desta inclusão favorecer a identificação de novos antitumorais havia baixa correlação entre estes modelos e os estudos clínicos de eficácia. No entanto, a importância da utilização destes modelos permanece, pois fornecem uma avaliação levando em consideração a participação do sistema imune, do estroma hospedeiro e da matriz extracelular (TALMADGE et al., 2007). Estes modelos incluem a inoculação de células de linhagem de melanoma murino em camundongos por via subcutânea (SC) ou intravenosa (IV) para o desenvolvimento de tumores e metástases (YANG et al., 2009). Diversos trabalhos são encontrados na literatura relatando a utilização da linhagem celular de melanoma murino B16F10 por meio dessas vias de inoculação resultando no desenvolvimento dos tumores de melanoma (POSTE et al., 1980, NETLAND; ZETTER, 1984; SONG et al., 1997; HYODOU et al., 2004; DORA et al., 2005).

Com esta perspectiva, iniciamos este trabalho envolvendo a pesquisa de novos fármacos para ação antitumoral, em particular antimelanoma.

Os estudos farmacológicos com compostos extraídos de plantas medicinais, bem como derivados sintéticos destes compostos naturais têm sido intensificados no meio científico nos últimos anos. Entre os compostos mais estudados estão os flavonóides, um grupo

complexo que faz parte dos constituintes de ampla variedade de vegetais, frutas e produtos industrializados como chocolates, chás e vinho (ARTS; HOLLMAN; KROMHOUT, 1999; MAMEDE; CARDELLO; PASTORE, 2005). Vários estudos demonstraram a importância terapêutica destas moléculas, como sua poderosa ação antioxidante, o que protege o organismo de várias doenças incluindo o câncer (DE GAULEJAC; PROVOST; VIVAS, 1999).

O ácido gálico (AG), que consiste em uma estrutura fenólica tri-hidroxilada (FIGURA 4), é um intermediário do metabolismo vegetal secundário, e suas propriedades biológicas e de seus análogos têm sido amplamente investigadas (HASLAM; CAI, 1994). O AG é encontrado em diversas fontes naturais como, por exemplo, nas uvas (HOGAN et al., 2009) e nos chás (HODGSON et al., 2004).

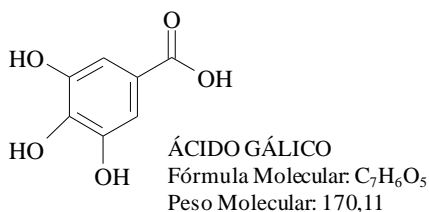


Figura 4: Estrutura química do ácido gálico.

O AG e alguns ésteres do galato, como o galato de octila (G8) e de dodecila (G12), são relatados e utilizados como sequestradores de EROS (LI et al., 2005). No entanto, estes compostos apresentam vários efeitos citotóxicos e antiproliferativos sobre os tecidos e células (JAGAN et al., 2008). O efeito antioxidante dos ésteres do AG está intimamente relacionado com a sua atividade doadora de hidrogênio (SERRANO et al., 1998), os efeitos citotóxicos parecem ocorrer em decorrência de uma ação pró-oxidante (SIERRA-CAMPOS et al., 2009) e o efeito antiproliferativo foi sugerido como consequência de uma atividade inibidora de proteínas tirosina cinases (SERRANO et al., 1998).

Diversos estudos relataram efeitos anticarcinogênicos do AG e de alguns de seus derivados (GALATI; O'BRIEN, 2004; KAWADA et al., 2001; LOCATELLI et al., 2008; CHEN et al., 2009; LOCATELLI et al., 2009; GIFTSON; JAYANTHI; NALINI, 2010; LOCATELLI et al., 2011).

Os derivados ésteres como o G8 e o G12, demonstraram uma potência inibitória na atividade de proteínas cinases que resulta em indução de apoptose entre 50 e 250 vezes maior do que seu precursor, AG, para as diversas linhagens testadas, além de mostrarem uma seletividade para células de crescimento rápido, abrindo a possibilidade de seu estudo como potenciais agentes antitumorais (SERRANO et al., 1998).

Estudos com o AG em linhagens de células revelaram a indução de morte das células cancerosas, como HL-60RG¹, HeLa², dRLh-84³, PLC/PRF/5⁴ e as células KB⁵, com maior sensibilidade do que para as células normais, como hepatócitos de rato em cultura primária, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos (INOUE et al., 1994 e 1995).

Em relação ao G8, foi demonstrado que o mesmo é capaz de promover indução de apoptose com fragmentação do DNA em hepatócitos (INOUE et al., 1994; NAKAGAWA; MOLDÉUS; MOORE, 1997) e em outros tipos de células tumorais (SERRANO et al., 1998; LOCATELLI et al., 2008; LOCATELLI et al., 2009).

Estudos em linhagem celular de linfoma revelaram que o G12 é capaz de promover a perda de potencial da membrana mitocondrial, efluxo de citocromo C para o citosol, ativação da cascata de caspases e indução da desagregação oligonucleosomal de DNA (ROY et al., 2000). Em relação aos tumores sólidos, foi demonstrado que o G12 não só preveniu a formação de tumores quimicamente induzidos na pele de ratos, como também foi capaz de induzir a morte seletiva das células tumorais em tumores estabelecidos (ORTEGA et al., 2003).

Também já foi demonstrada a propriedade do G12 em inibir a atividade da tirosinase (KUBO; CHEN; NIHEI, 2003), enzima responsável pela síntese de melanina (LV et al., 2007). A melanogênese tem sido reportada como necessária para a prevenção de danos ao DNA e câncer causados pela radiação UV, no entanto também já foi demonstrado que o acúmulo excessivo de melanina também pode causar o melanoma (KAWANO et al., 2007).

¹ leucemia promielocítica (humana)

² carcinoma cervical uterino (humana)

³ hepatoma (rato)

⁴ hepatoma (humana)

⁵ carcinoma epidermóide (humana)

Alterações químicas na molécula do AG podem modificar as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, pois alteram a solubilidade, o coeficiente de partição e o grau de ionização (pKa). Conseqüentemente, estas alterações afetam o efeito biológico, pois modificam a afinidade por alvos celulares e a difusão pelas membranas lipídicas (ANCEREWICZ et al., 1998; MEKAPATI et al., 2005).

Leal et al. (2009), promoveram a esterificação da função ácida do AG com alcoóis alifáticos obtendo 14 derivados n-alquil ésteres. Estes derivados diferem-se apenas no número de carbonos da cadeia alifática lateral e isto lhes atribui diferentes características físico-químicas, principalmente de lipofilicidade, avaliada pelo valor do logaritmo do coeficiente de partição (Log P). Este parâmetro fornece uma medida do balanço entre lipofilicidade e hidrofiliicidade por meio da razão da solubilidade de uma substância em um sistema de dois líquidos imiscíveis, uma fase orgânica e outra aquosa.

Os derivados ésteres do AG citados com cadeia alifática lateral contendo de 8 a 14 carbonos têm demonstrado atividade antitumoral, entretanto são solúveis somente em solventes orgânicos, o que prejudica a avaliação adequada do potencial antitumoral (LOCATELLI et al., 2008 e 2009). Embora os compostos não tenham mostrado toxicidade elevada nos modelos já testados *in vitro* (ROSSO et al., 2006) a encapsulação poderia ser uma estratégia para minimizar efeitos tóxicos que puderem ser demonstrados *in vivo*.

Nos últimos anos, a busca por alternativas mais eficientes e menos tóxicas para contornar os efeitos indesejáveis, limitações e inconveniências da quimioterapia para o tratamento do câncer tem despertado o interesse de pesquisadores de várias áreas, no que se refere à utilização de sistemas nanoestruturados. Em geral, estes sistemas caracterizam-se quanto às suas propriedades de vetorizar fármacos, peptídeos ou genes para células e tecidos específicos do organismo, conferir efeito sustentado nos sítios alvos, solubilizar fármacos insolúveis e aumentar a estabilidade de agentes terapêuticos. Especialmente para o câncer, o aumento da permeabilidade vascular do tecido tumoral possibilita o extravasamento de carreadores de fármacos nanoestruturados. Este aumento da permeabilidade capilar é decorrente da má formação da neovasculatura dos tecidos tumorais, a qual apresenta lacunas entre as células endoteliais. Assim, a aplicação de sistemas de transporte vetorizado tem potencial para melhorar a quimioterapia de neoplasias. A liberação seletiva de agentes antitumorais é desejável

por aumentar a morte das células tumorais, enquanto protege os tecidos saudáveis da exposição aos agentes citotóxicos, reduzindo os efeitos indesejados (YEZHELYEV et al., 2006).

Assim, fármacos que apresentam problemas de instabilidade, são poucos solúveis ou promovem efeitos indesejados quando administrados, são bons candidatos para a encapsulação, que apresenta como principais vantagens a vetorização do fármaco, o prolongamento do efeito terapêutico e a redução de efeitos adversos (PATRAVALE; DATE; KULKARNI, 2004; RABINOW, 2004; XIAOHUI et al., 2009).

Nesse contexto, tanto micro quanto nanopartículas são estruturas utilizadas na encapsulação de agentes ativos podendo ser preparadas por diferentes métodos e técnicas. As micropartículas possuem tamanho entre 1 e 1000 μm , já as nanopartículas, estruturas menores, apresentam dimensões entre 1 e 1000 nm. Os menores capilares do corpo têm entre 5 e 6 μm de diâmetro, então partículas menores que 5 μm poderiam, teoricamente, ser administradas sem formarem agregados e sem risco de ocasionar embolia (HANS; LOWMAN, 2002).

As nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais cujo tamanho oscila entre 10 e 1000 nanômetros e que podem ser elaborados a partir de uma ampla variedade de materiais biocompatíveis e biodegradáveis, por diversos métodos de preparação (CHAN et al., 2010).

Nanopartículas lipídicas possuem uma matriz lipídica e diâmetro em torno de uma centena de nanômetros, sendo estabilizadas por tensoativos. Os lipídeos podem ser triglicerídeos altamente purificados, misturas complexas de glicerídeos e até mesmo ceras (WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004).

Uma característica que torna as nanopartículas potencialmente interessantes como sistemas de liberação de fármacos é justamente a sua versatilidade, pois permitem a veiculação de substâncias ativas de diferentes naturezas, desde moléculas hidrofílicas até moléculas com alta hidrofobicidade. O tamanho coloidal das nanopartículas as habilita a atravessar barreiras biológicas, aumentando a tolerância tissular, a captura e o transporte celular (HANS; LOWMAN, 2002; GU et al., 2007).

A encapsulação em nanopartículas também melhora a estabilidade dos princípios ativos principalmente quando estes são suscetíveis a processos de oxidação e degradação como ocorre

frequentemente com ativos de origem vegetal, justificando assim a encapsulação dos galatos em nanopartículas.

Este trabalho deu continuidade à análise do potencial do G8 e do G12 como novos fármacos antitumorais para o tratamento do melanoma iniciada por Locatelli et al. (2009), com ênfase na elucidação do mecanismo de ação e nos estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo*, bem como de atividade antitumoral *in vivo*. Ademais, a encapsulação dos galatos em nanopartículas lipídicas foi analisada como uma estratégia para o aproveitamento do potencial destes ativos como novos fármacos antitumorais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os mecanismos de citotoxicidade e o potencial efeito antitumoral e toxicológico de derivados n-alquil ésteres do AG com 8 e 12 carbonos na cadeia lateral em modelos *in vitro* e *in vivo* para o estudo do melanoma.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o efeito citotóxico do AG e dos derivados G8 e G12 entre a linhagem celular de melanoma murino (B16F10) e duas linhagens não tumorais renais (MDCK e VERO) para verificar se havia seletividade do efeito para a linhagem tumoral;

- Realizar análise tempo e concentração-resposta da citotoxicidade do AG e dos derivados G8 e G12 em células B16F10 por meio de diferentes métodos de medida de viabilidade celular;

- Avaliar os mecanismos de citotoxicidade do AG e dos derivados G8 e G12 em células B16F10 relacionados à apoptose, ao estresse oxidativo e às vias das MAPKs e da AKT;

- Caracterizar e avaliar o potencial citotóxico de nanoformulações poliméricas e lipídicas em células B16F10, MDCK e VERO e selecionar uma nanoformulação para a continuidade dos estudos;

- Encapsular o AG e os derivados G8 e G12 na nanopartícula;

- Comparar a citotoxicidade e a seletividade do AG e dos derivados G8 e G12 livres ou encapsulados na nanopartícula em células B16F10 e VERO;

- Avaliar a toxicidade *in vivo*, em camundongos, do G8 livre e encapsulado na nanopartícula;

- Avaliar o efeito antitumoral, em camundongos, do G8 livre e encapsulado na nanopartícula em modelos de metástase pulmonar e de tumor subcutâneo de melanoma murino.

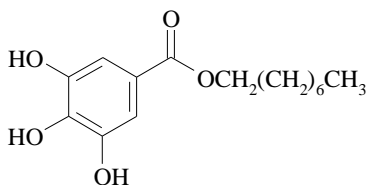
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

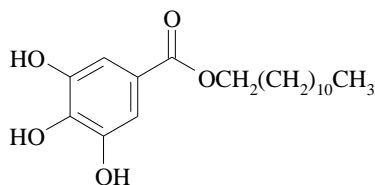
Os equipamentos, reagentes e outros materiais utilizados na realização deste trabalho estão relacionados nos Apêndices A a D.

3.2 ÁCIDO GÁLICO E DERIVADOS N-ALQUIL ÉSTERES

O AG e os derivados n-alkil ésteres foram fornecidos pelo grupo do Professor Rosendo Augusto Yunes do Departamento de Química desta Universidade. A estrutura dos derivados n-alkil ésteres do ácido gálico, G8 e G12, que foram testados neste trabalho são apresentados a seguir (FIGURA 5).



GALATO DE OCTILA
Fórmula Molecular: $C_{15}H_{22}O_5$
Peso Molecular: 282,33



GALATO DE DODECILA
Fórmula Molecular: $C_{19}H_{30}O_5$
Peso Molecular: 338,44

Figura 5: Estrutura química dos derivados ésteres do ácido gálico com 8 e 12 carbonos na cadeia lateral.

3.3 ESTUDOS *IN VITRO*

3.3.1 Cultura celular

3.3.1.1 Linhagens de células

As linhagens de células utilizadas neste trabalho foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), estando disponíveis também no *American Type Culture Collection* (ATCC), EUA e estão relacionadas a seguir:

- B16F10 (BCRJ: CR010; ATCC: CRL-6475): linhagem celular derivada de melanoma murino (melanócito);
- J774 (BCRJ: CR028; ATCC: TIB-67): linhagem celular hematopoética derivada de retículo-sarcoma murino (macrófago);
- MDCK (BCRJ: CR052; ATCC: CCL-34): linhagem celular não tumoral derivada de epitélio renal canino (célula epitelial);
- VERO (BCRJ: CR015; ATCC: CCL-81): linhagem celular não tumoral derivada de rim de macaco verde africano (célula epitelial).

3.3.1.2 Cultivo celular

As células foram cultivadas em garrafas plásticas apropriadas com meio de cultura D-MEM (*Dulbelco's Modified Eagle Medium*), contendo 1,5 g/l de bicarbonato de sódio, 10 mM de ácido etanossulfônico de hidroxietil-piperazina (HEPES), pH 7,4, 100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina e suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), e mantidas a 37 °C, em estufa com atmosfera umidificada contendo 5 % de dióxido de carbono (CO₂).

O número de células viáveis foi avaliado pelo método do Azul de Tripán e a contagem realizada em câmara de Neubauer, utilizando os quadrantes para contagem de leucócitos (STROBER, 2001).

Os repiques foram realizados de acordo com a rotina do laboratório, no máximo a cada três dias, com auxílio de tripsinização com solução contendo 0,25 % de tripsina e 0,03 % de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) em solução salina tamponada (PBS) contendo 0,9 % de NaCl em 10 mM de fosfato de sódio (pH 7,4).

O armazenamento das células foi realizado em nitrogênio líquido. Para tanto, 1 x 10⁶ células suspensas em 1 ml do meio de cultura citado anteriormente acrescido de 10 % (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) foram colocadas em um criotubo e mantidas por 24 horas a -80 °C em um contentor de congelamento criogênico de 1° C/min antes da transferência para o botijão de nitrogênio líquido.

Quando necessário, a suspensão de células foi descongelada rapidamente a 37 °C e transferida para uma garrafa de cultura pequena contendo 10 ml de D-MEM. Após 2 horas, tempo necessário para a adesão das células a superfície da garrafa, o meio

de cultura foi substituído com o objetivo de remoção do meio de congelamento contendo DMSO e das células não aderidas ou dos debrís celulares. Após o descongelamento, as células foram repicadas pelo menos uma vez antes da utilização das mesmas em experimentos.

Na realização dos experimentos, o número de células distribuído nas placas de cultura celular foi padronizado no laboratório buscando evitar a perda de viabilidade celular em função do excesso de células ou da privação de nutrientes pela escassez de meio de cultura. Assim, o número de células e o volume de meio adicionado variou de acordo com o tipo de placa utilizado e com o tempo de incubação necessário conforme o Quadro 3. Para realização dos experimentos, as células foram distribuídas nas placas de cultura celular 24 horas antes da adição dos tratamentos.

Quadro 3: Regra Geral para a escolha do número de células na realização dos experimentos.

Tipo de Placa	Número máximo de células por poço	Volume de Meio de Cultura		
		Até 24 horas	24 a 48 horas	48 a 72 horas
96 poços	1×10^4	200 μ l	200 μ l	200 μ l
24 poços	3×10^5	1000 μ l	2000 μ l	3000 μ l
12 poços	5×10^5	2000 μ l	4000 μ l	6000 μ l
6 poços	1×10^6	4000 μ l	8000 μ l	12000 μ l

3.3.2 Ensaios de viabilidade celular

A viabilidade celular foi testada por diferentes métodos que avaliavam as funções, mitocondrial, lisossomal, a permeabilidade da membrana plasmática e o conteúdo protéico.

Para análise dos resultados foram calculados os valores da concentração inibitória para 50 % do efeito (IC_{50}) e a área sobre a curva (ASC) para cada método utilizado. Os valores da IC_{50} e da ASC foram obtidos por meio do programa Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc®). A IC_{50} foi obtida por meio de análise de regressão não linear entre o logaritmo da concentração e a resposta normalizada (percentual de viabilidade celular) utilizando a equação: $Y=100/\{1+10^{[(X-\text{Log}IC_{50})]}\}$. Os valores da ASC foram calculados pelo método trapezoidal.

3.3.2.1 MTT

O método do MTT baseia-se na utilização de um corante, o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), para determinar a viabilidade celular por meio da atividade mitocondrial. O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em formazan púrpura insolúvel após a clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais. O formazan púrpura é determinado espectrofotometricamente em 540 nm sendo proporcional à viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Decorrido o tempo de incubação das células (1×10^4) com a substância testada em placas de 96 poços, o sobrenadante foi removido e substituído por 100 μ l de D-MEM contendo 0,5 mg/ml de MTT e as células incubadas em estufa a 37 °C em 5 % de CO₂ por 2 horas. Na seqüência, o sobrenadante foi removido e substituído por 100 μ l de DMSO (100 %) para a dissolução do formazan púrpura. Finalmente, os restos celulares foram removidos por centrifugação a 300 xg por 10 minutos, e o sobrenadante foi transferido para outra placa e monitorado espectrofotometricamente em 540 nm. A densidade óptica obtida no grupo controle (sem tratamento) foi considerada como equivalente a 100 % de células viáveis.

3.3.2.2 Vermelho neutro

O teste do vermelho neutro (VN) é baseado na habilidade das células viáveis em incorporar e ligar o corante VN nos lisossomas (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

Após o tempo de incubação das células (1×10^4) com a substância testada em placa de 96 poços, o meio com os tratamentos foi substituído por 100 μ l de D-MEM contendo 0,05 mg/ml do VN e incubado a 37 °C e 5 % de CO₂ durante 30 minutos. Posteriormente, a monocamada de células foi lavada 2 vezes com PBS para a remoção do excesso de corante, antes da extração do VN incorporado aos lisossomas. A extração foi realizada em 100 μ l de uma solução de ácido acético/etanol/água (1:50:49, v/v/v) e a quantidade de VN foi monitorada espectrofotometricamente em 540 nm. Os resultados foram expressos em percentual em relação ao controle sendo a densidade óptica obtida do grupo controle considerada como equivalente a 100 % de células viáveis.

3.3.2.3 Atividade da lactato desidrogenase

A LDH catalisa a conversão do piruvato para lactato, enquanto o dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido (NADH) é oxidado para NAD^+ . O aumento das concentrações de LDH no meio extracelular indica uma redução na integridade da membrana plasmática ou a morte celular sendo a atividade catalítica determinada a partir da velocidade de desaparecimento de NADH medida em 340 nm (HASLAM; WYATT; KITOS, 2000).

As células (1×10^5) foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com a substância testada por 24 horas. Ao término do tempo de tratamento, o meio de cultura foi removido e centrifugado a 300 xg por 10 minutos para remoção de células em suspensão. Posteriormente, alíquotas de 50 μl do sobrenadante foram misturadas a 125 μl de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4 e mantidas a 37°C. O monitoramento cinético da atividade da LDH foi realizado espectrofotometricamente em 340 nm durante 90 segundos com intervalos de 5 segundos imediatamente após a adição de 0,42 mM de NADH e 20 mM de piruvato de sódio (BOO et al., 2009).

O cálculo da atividade da LDH foi realizado a partir do coeficiente angular (K) da equação de reta obtida de cada amostra e do coeficiente de extinção molar (ϵ) do NADH em 340 nm. Para tanto foi utilizada a seguinte fórmula: $\text{LDH } (\mu\text{mol}/\text{min}) = [(K/\epsilon) \times 60 \times 10^6]$, em que K é o coeficiente angular da equação de reta obtida de cada amostra, ϵ é o coeficiente de extinção molar do NADH em 340 nm ($6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 60 é o fator para correção de segundos para minutos e 10^6 é o fator de correção para μmol . Os valores foram expressos em porcentagem de atividade enzimática considerando o controle como 100 % de atividade.

3.3.2.4 Sulforodamina B

O teste da sulforodamina B (SRB) é usado para determinar a densidade celular com base no conteúdo protéico celular.

Após o tempo de incubação das células (1×10^4) em placa de 96 poços com a substância testada, o meio contendo os tratamentos foi removido e as células que permaneceram aderidas à placa foram fixadas pela adição de 100 μl de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10 % (p/v) seguida de uma incubação por 60 minutos a 4 °C. Após a fixação, as células foram lavadas quatro

vezes com água ultra-pura e coradas com 100 µl de uma solução de SRB a 0,057 % (p/v) durante 30 minutos a 37°C. O excesso de corante foi removido por quatro lavagens com solução de ácido acético a 1 % (v/v) e o corante que permaneceu ligado à proteína foi solubilizado em solução 10 mM de Tris, pH 10,5. A leitura das amostras foi realizada em espectrofluorímetro utilizando os comprimentos de onda de 488 nm e 584 nm para excitação e emissão, respectivamente. Alternativamente, a leitura das amostras pode ser realizada em espectrofotômetro em 510 nm. Os resultados foram expressos em percentual em relação ao controle sendo a intensidade de fluorescência obtida do grupo controle considerada como equivalente a 100 % de células viáveis (VICHAI; KIRTIKARA, 2006).

3.3.3 Ensaios de Fragmentação do DNA

3.3.3.1 Eletroforese em gel de agarose

A extração do DNA foi realizada pelo método de Han descrito em Cao et al., 2004.

Após o tratamento com as substâncias estudadas por 24 horas a 37 °C e 5 % de CO₂, as células (1 x 10⁶) foram lavadas com PBS e posteriormente lisadas com 50 µl de tampão de lise (10 mM de EDTA, 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 0,25 % de NP-40 e 0,5 mg/ml de proteinase K) a 50 °C, por 2 horas. O lisado celular foi centrifugado a 300 xg por 15 minutos e ao sobrenadante foram adicionados 125 µl (2,5 volumes) da mistura etanol absoluto/NaCl 5 M (1:1, v/v) e incubado por 12 horas (*overnight*) a -20 °C para precipitação do DNA. Finalizado o tempo para precipitação do DNA, as amostras foram centrifugadas a 15000 xg por 30 minutos e o precipitado formado lavado quatro vezes com 100 µl de etanol a 70 % (ressuspensão do precipitado seguida de centrifugação a 10000 xg por 10 minutos). Finalmente, o precipitado lavado foi seco a 37 °C durante aproximadamente 30 minutos, ressuspensão em tampão TE (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM de EDTA e 0,6 g/ml de RNase A) e incubado a 37 °C, por 1 hora.

O DNA extraído de cada amostra foi quantificado espectrofotometricamente em 260 nm utilizando um fator de diluição da amostra em PBS de 200 vezes (CAVALUZZI; BORER, 2004). A concentração de DNA em µg/µl foi calculada pela fórmula: DNA

($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) = (A_{260} / ϵ) x 100, onde A_{260} é o valor da densidade ótica da amostra em 260 nm, ϵ é o coeficiente de extinção molar do DNA em 260 nm (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e 100 é o fator de diluição da amostra.

A fragmentação do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1 % em tampão TAE (40 mM de Tris, pH 8,0, 20 mM de ácido acético e 1 mM de EDTA) corado com brometo de etídio (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Foram aplicados 2 μg de DNA de cada amostra e a corrida realizada a 150 V e 200 mA, por 30 minutos, em tampão TAE. Os géis foram visualizados em um transiluminador sob iluminação ultravioleta de 320 nm e documentados utilizando-se um sistema de fotodocumentação de géis.

3.3.3.2 Coloração com laranja de acridina e brometo de etídio

Inicialmente, 3×10^5 células foram incubadas em placas de 24 poços por 24 horas a 37 °C e 5 % de CO₂ com os tratamentos. Após, o meio de cultura contendo o tratamento foi substituído por outro contendo 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de laranja de acridina (LA) e 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de brometo de etídio (BE) e as células foram incubadas nas mesmas condições anteriores durante 30 minutos. Antes da visualização das células ao microscópio de fluorescência invertido a monocamada celular foi lavada delicadamente com solução de PBS a 37 °C por quatro vezes para remoção do corante não incorporado às células.

3.3.4 Avaliação da atividade da caspase-3

Para avaliação da atividade da caspase-3, as células (1×10^6) foram distribuídas em placas de 6 poços e incubadas com 50 e 100 μM do G8 e do G12 por períodos de tempos que variaram de 15 minutos a 24 horas (15 minutos e 1, 2, 4, 6 e 24 horas). Após os tratamentos, as células foram lavadas duas vezes com PBS e lisadas com 75 μl do tampão de lise contendo 10 mM de HEPES (pH 7,4), 42 mM de cloreto de potássio (KCl), 5 mM de cloreto de magnésio (MgCl_2), 1 mM de fluoreto de fenilmetil sulfonil (PMSF), 100 μM de EDTA, 100 μM de ácido etilenoglicoltetracético (EGTA), 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de pepstatina A, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina, 0,5 % de sulfonato de 3-[(3-cloroamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano (CHAPS) e 1 mM de ditioneitol (DTT) a 4 °C por 5 minutos. Posteriormente, 25 μl deste lisado celular (1 mg/ml) foram adicionados a 75 μl do meio de reação contendo 25 mM de HEPES

(pH 7,4), 1 % de CHAPS, 1 mM de EDTA, 10 % de sacarose e 3 mM de DTT. A esta mistura foram adicionados 10 μ M do substrato fluorogênico para caspase-3 acetil-Asp-Glu-Val-Asp-amino metil cumarina (Ac-DEVD-AMC) e incubados por 120 minutos a 37 °C. A atividade da caspase-3 foi avaliada por meio da produção da amino metil cumarina (AMC) fluorescente monitorada em espectrofluorímetro utilizando os comprimentos de onda de 380 nm para excitação e 465 nm para emissão. Os valores obtidos nas amostras foram subtraídos da fluorescência dos brancos correspondentes sem lisado celular (ZUSE et al., 2007). O resultado foi expresso em unidades arbitrárias (UA) de fluorescência considerando o controle como atividade igual a um.

3.3.5 Avaliação do potencial mitocondrial

A avaliação da possível interferência das formulações no potencial de membrana mitocondrial foi realizada pela utilização da sonda fluorescente denominada 5,58,6,68-iodeto de tetraetilbenzimidazolcarbocianina (JC-1). Esta substância catiônica, penetra na membrana negativa da mitocôndria quando o potencial está estabelecido e se apresenta na forma de agregados que emitem fluorescência vermelha. Quando há perda do potencial de membrana mitocondrial, como no caso das células apoptóticas, ocorre a liberação desta sonda para o citoplasma e a mesma apresenta-se na forma de monômeros que emitem fluorescência verde. Assim, a despolarização mitocondrial é indicada pela diminuição na intensidade da razão entre a fluorescência vermelha e a verde (COSSARIZZA et al., 1993).

As células (3×10^5) foram distribuídas em placas de 24 poços e tratadas com 50 μ M do G8 e do G12 por 15 minutos. Ao final do tempo de tratamento, foi adicionada a sonda fluorescente JC-1 (10 μ g/ml) e a incubação prolongada em 20 minutos a 37 °C e 5 % de CO₂. Para a remoção do corante não incorporado, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e posteriormente visualizadas ao microscópio de fluorescência invertido ou removidas da placa para quantificação das fluorescências verde e vermelha em espectrofluorímetro. Na quantificação em espectrofluorímetro foram utilizados os comprimentos de onda de excitação/emissão de 488/527 nm para a detecção da fluorescência verde e de 488/590 nm para a vermelha. Na análise dos resultados, foram calculadas as

razões entre as fluorescências vermelha e verde para cada amostra e o potencial mitocondrial foi apresentado em percentual em relação à intensidade da razão obtida no controle sem tratamento (100 %) (SALVIOLI et al., 1997). Um desacoplador do transporte de elétrons, p-trifluoro-metoxicarbonil ciano fenil hidrazina (FCCP 5 μ M), foi utilizado como um controle positivo (XIA et al., 2007).

3.3.6 Imunodeteção de proteínas

3.3.6.1 Preparação dos extratos celulares

As células (3×10^6) foram distribuídas em placas de 6 poços e submetidas aos tratamentos com 50 μ M do G8 e do G12 por 3 horas. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com PBS e o extrato total foi obtido pela adição de 100 μ l do tampão de amostra contendo 4 % de dodecil sulfato de sódio (SDS), 50 mM de Tris, pH 6,8, e 2 mM de EDTA sob a monocamada de células, seguida de aquecimento a 100 °C por 5 minutos. Na seqüência, uma alíquota (20 μ l) foi retirada para a quantificação da concentração de proteínas e foram adicionados ao restante da amostra 8 μ l de β -mercaptoetanol. A preparação da amostra foi finalizada pela adição da solução de diluição de amostra (40 % de glicerol, 25 mM de Tris, pH 6,8, e azul de bromofenol) numa proporção solução de diluição/solução de amostra de 1:4 (v/v) (LAEMMLI, 1970).

As amostras foram armazenadas a -20 °C e a determinação da concentração de proteínas na amostra foi realizada pelo método de Lowry modificado por Peterson (1977) para amostras contendo SDS.

3.3.6.2 Procedimentos para a imunodeteção das proteínas

As proteínas (50 μ g) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), usando gel de separação a 15 % e gel de entrada a 4 % de acrilamida. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 15 mA por placa e voltagem máxima de 140 V (aproximadamente 2 horas), em temperatura ambiente, utilizando-se os tampões superior (190 mM de glicina, 25 mM de Tris e 0,1 % de SDS) e inferior (50 mM de Tris; pH 8,3). Após a corrida, os géis foram estabilizados em tampão de pré-transferência (0,25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 5 % de metanol e 0,1 % de SDS) e submetidos à eletrotransferência.

A transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose foi realizada pelo método *semi-dry* em temperatura ambiente (25 °C) usando corrente de 1,2 mA/cm² de membrana por 90 minutos e tampão de transferência contendo 0,25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 20 % de metanol e sem SDS. Após a eletrotransferência, as membranas foram coradas com solução de Ponceau a 0,5 % em ácido acético a 1 %, fixadas com solução de ácido acético a 7 % e descoradas levemente com água ultra-pura para visualização da qualidade da transferência realizada. As membranas transferidas foram secas e armazenadas para posterior imunodeteção das proteínas (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979).

Na imunodeteção das proteínas foram utilizados anticorpos primários específicos e anticorpo secundário ligado à peroxidase, os quais estão relacionados no Apêndice D. Todas as incubações e lavagens das membranas foram realizadas sob agitação suave de 80 r.p.m. em agitador orbital. Inicialmente, as membranas foram descoradas em solução de TBS (150 mM de Tris, 10 mM de NaCl, pH 7,5) durante 10 minutos e bloqueadas por 1 hora com solução de albumina sérica bovina (BSA) a 5 % em TBS. Previamente à adição do anticorpo primário específico, as membranas foram lavadas com solução de TBS-T (TBS acrescido de 1 % de Tween) por três vezes durante 5 minutos. A incubação com o anticorpo primário específico foi realizada a 4 °C durante 16 horas, na diluição recomendada pelo fabricante. Ao término da incubação, as membranas foram novamente lavadas com solução de TBS-T por quatro vezes durante 5 minutos, antes da adição do anticorpo secundário ligado a peroxidase, o qual foi diluído de acordo com a recomendação do fabricante, e incubado com a membrana durante 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas cinco lavagens da membrana com duração de 5 minutos cada, sendo as três primeiras com TBS-T e as duas últimas com TBS.

Os complexos imunes foram revelados pelo método colorimétrico com 0,05 % do cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) adicionado de 0,03 % de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

As medidas de imunoc conteúdo das proteínas foram realizadas por densitometria utilizando o programa Scion Image for Windows (Alpha 4.0.3.2, Scion Corporation).

3.4 NANOFORMULAÇÕES

Dois tipos de formulações de nanopartículas foram testados para a realização deste trabalho, os quais são nanopartículas lipídicas e nanopartículas poliméricas.

As metodologias das preparações estão apresentadas nos itens subseqüentes, sendo a preparação e a caracterização das nanopartículas realizadas pela Dra. Betina Giehl Zanetti Ramos, a qual à época realizava pós-doutoramento em nosso grupo de pesquisa, sendo atualmente Diretora Técnica e responsável pelo Departamento de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação da empresa Nanovetores - Encapsulados de Alta Tecnologia.

3.4.1 Preparação das nanopartículas lipídicas

As nanopartículas lipídicas foram preparadas pela técnica de homogeneização a quente (VENKATESWARLU E MANJUNATH, 2004).

A técnica consistiu em fundir o lipídeo e dispersá-lo, sob agitação vigorosa, em uma fase aquosa contendo um estabilizante hidrofílico, previamente aquecida a uma temperatura 5° C acima da temperatura de fusão do lipídeo. Assim, com o auxílio de ultra-sonicação foi formada uma emulsão finamente dividida, a qual foi resfriada a temperatura ambiente com conseqüente formação das nanopartículas.

Condições de preparação tais como amplitude e tempo de ultra-sonicação foram modificados para a obtenção de partículas com tamanho apropriado em torno de 140 nm.

Os lipídios utilizados foram designados como M, C, U e B e não terão seus nomes divulgados por razões de patenteamento.

3.4.2 Preparação das nanopartículas poliméricas

As nanopartículas de poliuretano (PU) foram sintetizadas pela técnica de miniemulsão conforme descrito por Zanetti-Ramos et al. (2006). Os monômeros precursores do poliuretano (poliol natural e IPDI), juntamente com o óleo de oliva e o tensoativo hidrofóbico, foram dispersos sob agitação na fase aquosa com o tensoativo hidrofílico durante um período de 4 horas para garantir a polimerização.

Nanopartículas de poliuretano peguiladas (PU-PEG) foram sintetizadas utilizando o polietilenoglicol (PEG) como um comonômero durante a síntese das nanopartículas.

3.4.3 Caracterização das nanopartículas

3.4.3.1 Análise do tamanho

A determinação do diâmetro médio das nanopartículas, distribuição granulométrica e índice de polidispersidade foram realizados pela técnica de espalhamento de luz com a utilização do equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, EUA). As medidas foram realizadas em triplicada em um ângulo de espalhamento de 173 graus a 25 °C. As amostras foram previamente diluídas em água ultra-pura, sem filtração. A distribuição do tamanho médio das partículas foi expressa como diâmetro médio em nanômetros (nm) e índice de polidispersão (PDI).

3.4.3.2 Determinação do potencial zeta

A determinação da carga de superfície das nanopartículas é importante, uma vez que esta influencia na estabilidade da suspensão de nanopartículas e nas interações destas com a membrana celular. Este parâmetro foi determinado pela medida do potencial zeta em milivolt (mV) por anemometria laser, no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). As medidas foram realizadas em triplicata a 25 °C após a diluição das amostras em água ultra-pura. Um potencial de 150 mV foi estabelecido e os valores de potencial zeta foram calculados como a mobilidade eletroforética média usando a equação de Smoluchowski.

3.4.3.3 Avaliação da morfologia

A análise morfológica das nanopartículas foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia de força atômica (AFM).

Na MET, as amostras foram adicionadas sobre suporte metálico de cobre (200 mesh) com revestimento de carbono e Formvar e as partículas foram visualizadas em aumento de até 100.000 vezes em instrumento JEOL JEM - 2000FX.

Nas análises de AFM, as partículas foram previamente imobilizadas em mica, silício hidrofílico ou silício hidrofóbico, conforme suas características. As medidas foram realizadas *in situ* à temperatura ambiente em um microscópio do modelo Pico SPM da Molecular Imaging (Arizona, EUA), com um scanner de 6 μm , operando no modo contato.

3.4.4 Encapsulação das substâncias na nanoformulação

A encapsulação do AG e dos derivados ésteres nas nanoformulações foi realizado durante a síntese das nanopartículas, sendo, no caso das nanopartículas lipídicas, a adição das substâncias realizada na fase lipídica da formulação.

Foram realizados três testes até a padronização da metodologia visando determinar a concentração máxima do AG e dos derivados ésteres G8 e G12 que poderia ser encapsulada nas formulações. Os testes de encapsulação iniciaram com a concentração de 5 mg/ml, seguida por 2,5 mg/ml e finalmente com 1,25 mg/ml até que fosse obtido 100 % de encapsulação das substâncias avaliadas.

As nanoformulações contendo os galatos encapsulados também foram caracterizadas quanto ao tamanho, PDI e potencial zeta. As análises foram realizadas da mesma forma que descrito para as nanoformulações brancas (sem galatos).

3.4.5 Construção da curva analítica para quantificação das substâncias encapsuladas na nanoformulação

Neste procedimento, foi realizada uma varredura em espectrofotômetro, variando-se o comprimento de onda (λ) de 200 a 900 nm, da absorbância apresentada por soluções 1 mM do AG e dos derivados ésteres G8 e G12 em 100 % de DMSO com o objetivo de determinar o pico de absorção das substâncias.

Posteriormente, para construção da curva analítica, soluções dos galatos em concentrações crescentes entre 1 e 1000 μM foram analisadas em espectrofotometricamente no comprimento de onda determinado na varredura realizada anteriormente. Os valores de absorbância obtidos foram utilizados para a elaboração de um gráfico da absorbância em função da concentração. O segmento linear com absorbâncias que não excedessem ao valor de 0,800 foi analisado por

regressão linear ($Y = AX + B$) e a equação obtida foi utilizada para determinação da concentração para cada valor de absorbância encontrado nas amostras avaliadas posteriormente; considerando que Y representa a absorbância obtida, X a concentração das soluções analisadas, A o coeficiente angular da reta (inclinação) e B o coeficiente linear da reta (ponto de intersecção da reta no eixo Y).

3.4.6 Determinação da concentração e da eficiência de encapsulação das substâncias na nanoformulação

Para determinar a concentração total dos galatos nas formulações foram realizados alguns testes até a padronização da metodologia.

Inicialmente, 10 μ l das formulações de nanopartículas contendo os galatos foram diluídos em 990 μ l de água ultra-pura e outros 10 μ l em 990 μ l de DMSO. Durante este procedimento as formulações, que apresentavam aspecto leitoso originalmente, permaneceram com o aspecto original quando diluídas em água e ficaram translúcidas quando diluídas em DMSO. Com base nesta observação e após análise no equipamento Zetasizer Nano ZS concluiu-se que o DMSO promovia o rompimento ou a solubilização das nanopartículas lipídicas. A leitura da absorbância em 300 nm destas amostras diluídas em DMSO e posterior determinação da concentração dos galatos com base na equação da curva de calibração dos galatos foi utilizada como medida da concentração total de galato na formulação para fins de comparação com a concentração teórica.

Para a determinação da concentração dos galatos, a nanoformulação (500 μ l) foi submetida a centrifugação a 2000 xg por 5 minutos a 25°C para a separação do galato não encapsulado que precipita tendo em vista a sua baixa hidrossolubilidade. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e diluído 1:20 (v/v) em DMSO 100 %. O precipitado foi ressuspenso em 1 ml e posteriormente diluído 1:10 (v/v) em DMSO 100 %. Ambos, sobrenadante e precipitado, foram avaliados por espectrofotometria em 300 nm. A concentração do galato no sobrenadante foi considerada como a fração de galato encapsulado nas nanopartículas, uma vez que a centrifugação realizada não é suficiente para precipitar as nanopartículas utilizadas neste trabalho. O monitoramento espectrofotométrico do galato foi possível após o rompimento das partículas pela adição de DMSO ao sobrenadante. O

valor de concentração obtido no precipitado foi considerado como a fração de galato não encapsulado.

A concentração dos galatos nas amostras foi calculada pela interpolação da densidade óptica obtida nas análises na curva analítica de cada substância avaliada, considerando também a diluição realizada em cada amostra durante o processo analítico. A eficiência de encapsulação foi calculada pela relação entre a concentração dos galatos adicionados na formulação e a concentração obtida no método analítico de quantificação.

Finalmente, como contraprova da viabilidade do procedimento adotado para a quantificação dos galatos na nanoformulação, realizamos uma medida da concentração na amostra obtida após diluição 1:20 (v/v) da formulação total sem centrifugação e comparamos com a concentração teórica.

3.5 ESTUDOS *IN VIVO*

Estes estudos foram realizados em colaboração com a pesquisadora Claudriana Locatelli da Universidade do Alto Vale do Rio do Peixe (UNIARP), na época dos experimentos ainda pertencente à Universidade do Contestado (UnC), e com o pesquisador Celso Pilati da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC).

O tratamento dos animais, assim como as coletas das amostras, o hemograma e análise da bioquímica sérica foram realizados na UnC e a avaliação histopatológica foi realizada na UDESC.

Os experimentos seguiram os preceitos éticos para experimentação animal e o protocolo experimental foi submetido para avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UnC, o qual foi aprovado sob parecer número 137/08 (ANEXO A).

O G8 foi escolhido para as avaliações *in vivo* por apresentar em estudos anteriores a maior capacidade de gerar estresse oxidativo nas células de melanoma B16F10 (LOCATELLI et al., 2009). Esta capacidade poderia tornar o G8 capaz de induzir efeitos tóxicos *in vivo* e ainda candidato a encapsulação na tentativa de minimizar a ocorrência deste efeito.

3.5.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos com idade de 2 meses, fornecidos pelo biotério da UnC, Campus Caçador.

Os animais foram alojados em gaiolas de plástico (15 x 36 x 30 cm) forradas com serragem, substituída a cada 3 dias para manutenção e higiene das gaiolas. Durante o período de permanência no biotério e durante os experimentos os animais foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso à água e comida em ambiente com temperatura de 23 ± 1 °C e ciclo claro/escuro de 12 horas.

3.5.2 Soluções

Foram preparadas inicialmente soluções estoque de G8 na concentração de 62,5 mg/ml em 100 % de DMSO. A nanoformulação foi preparada conforme descrito anteriormente em uma concentração de 1,25 mg/ml de G8. Para a administração aos animais a solução estoque de G8 foi diluída a uma concentração final de 1,25 mg/ml (2 % DMSO) em PBS.

A dose de galato administrada aos animais foi determinada em função da concentração máxima que foi possível encapsular na nanopartícula (1,25 mg/ml) e do volume máximo possível de ser aplicado no animal por via intraperitoneal (IP) (0,3 ml). Assim, considerando o peso do animal em torno de 30 g determinamos a dose de 12,5 mg/kg.

3.5.3 Avaliação da toxicidade *in vivo* do G8

Para a avaliação da toxicidade do G8 os camundongos foram divididos em quatro grupos de cinco animais que receberam os tratamentos por via IP durante 28 dias, três vezes por semana. Os grupos receberam os tratamentos conforme apresentados no Quadro 4.

Os parâmetros de toxicidade avaliados incluíram avaliação da variação de peso corporal, exame anatomopatológico ante- e pós-morte, hemograma e testes bioquímicos de funções hepática e renal, além da medida do estresse oxidativo no fígado.

A avaliação do peso corporal foi realizada individualmente no início e ao término do tratamento.

No hemograma, a contagem diferencial leucocitária foi realizada por meio de esfregaço sanguíneo e foram determinados

valores relativos de polimorfos e mononucleares. A contagem de hemácias e leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se como diluidor o líquido de Dacie e de Turk, respectivamente.

Na determinação dos parâmetros bioquímicos das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina e gama-glutamil transferase (GGT) e na determinação de proteínas totais, uréia e creatinina foram utilizados kits comerciais (Labtest® Diagnóstica SA, Brasil) de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante.

Os sinais de toxicidade também foram investigados na avaliação pós-morte incluindo hemorragias e aumento ou diminuição de volume dos órgãos principalmente nos rins, fígado e baço. Durante a necropsia foram coletadas amostras dos tecidos do coração, pulmão, estômago, intestinos, baço, rins, fígado e cérebro para exame histopatológico e de fígado para a medida do estresse oxidativo.

Para avaliação do estresse oxidativo no fígado os mesmos foram coletados e imersos em solução de sacarose 20 % em PBS e armazenados a -20 °C para posterior processamento. Os procedimentos para a coleta e preparação das amostras para avaliação histopatológica, bem como para a preparação dos homogenatos e determinação de espécies reativas, lipoperoxidação e atividades enzimáticas no fígado estão descritos mais adiante em seção específica.

Quadro 4: Grupos experimentais e respectivos tratamentos para a avaliação da toxicidade *in vivo* do G8.

Grupo	Tratamento*	Administração		Dose do G8
		Via	Volume	
N	Nenhum	IP	0,3 ml	-
DMSO	DMSO 2 %	IP	0,3 ml	-
NVM [#]	NVM branca	IP	0,3 ml	-
G8	G8 livre	IP	0,3 ml	12,5 mg/kg
NVMG8 [#]	G8 encapsulado na NVM	IP	0,3 ml	12,5 mg/kg

* o veículo utilizado para a diluição das soluções administradas aos animais foi PBS; IP: intraperitoneal; [#]denominação da nanoformulação selecionada a partir dos resultados apresentados na seção 4.1.5 desta tese.

3.5.4 Avaliação da atividade antitumoral do G8

3.5.4.1 Modelo de metástase pulmonar

No modelo de metástase pulmonar, os animais foram inoculados pela veia lateral da cauda com as células B16F10 (1×10^6 células/0,1 ml de PBS) com o objetivo de induzir metástases pulmonares (LV et al., 2009; SALINAS-JAZMÍN et al., 2009).

Os animais foram divididos em grupos de cinco animais, de acordo com o número de tratamentos realizados conforme apresentados no Quadro 5.

Os tratamentos, realizados durante 28 dias com intervalos de três dias, foram iniciados imediatamente após a inoculação das células tumorais e os grupos controles, inoculados ou não, receberam apenas o veículo.

Ao final dos tratamentos, os animais foram eutanasiados e os pulmões foram removidos, fotografados e submetidos à avaliação macroscópica quanto à presença de lesões metastáticas. Em seguida, o pulmão direito foi destinado à análise histopatológica e o pulmão esquerdo foi utilizado para avaliar o estresse oxidativo e a atividade da caspase-3.

A atividade da caspase-3 nos homogenatos de pulmão foi realizada utilizando o protocolo descrito anteriormente para os extratos celulares, exceto pela maior quantidade de proteína adicionada ao ensaio. Os demais procedimentos estão descritos mais adiante em seção específica.

Quadro 5: Grupos experimentais e respectivos tratamentos para a avaliação da atividade antitumoral do G8 em modelos de melanoma

Grupo	Tratamento*	Células B16F10	Administração		Dose do G8
			Via	Volume	
NI	Nenhum	Não	IP	0,3 ml	-
DMSO	DMSO 2 %	Sim	IP	0,3 ml	-
NVM [#]	NVM branca	Sim	IP	0,3 ml	-
G8	G8 livre	Sim	IP	0,3 ml	12,5 mg/kg
NVMG8 [#]	G8 encapsulado na NVM	Sim	IP	0,3 ml	12,5 mg/kg

* o veículo utilizado para a diluição das soluções administradas aos animais foi PBS; IP: intraperitoneal; [#]denominação da nanoformulação selecionada a partir dos resultados apresentados na seção 4.1.5 desta tese.

3.5.4.2 Modelo de tumor subcutâneo

Para o desenvolvimento do modelo de tumor subcutâneo, os animais foram inoculados por via SC na região lombar com as células B16F10 ($2,5 \times 10^5$ células/0,2 ml de PBS) com o objetivo de induzir o crescimento de uma massa tumoral no local da inoculação.

Os animais foram avaliados 15 dias após a inoculação e aqueles que apresentaram crescimento visível da massa tumoral foram divididos aleatoriamente em grupos com no mínimo 5 animais, de acordo com o número de tratamentos realizados, conforme apresentado anteriormente no Quadro 5. Foram realizados quatro tratamentos com intervalos de 3 dias, iniciados 15 dias após a inoculação nos animais que apresentaram crescimento tumoral visível. Os grupos controles receberam apenas o veículo.

Para a avaliação final dos efeitos dos tratamentos nos animais, o crescimento tumoral foi determinado por meio da medida da massa dos tumores nos grupos de animais. Para isso, os animais foram eutanasiados por inalação em atmosfera saturada de éter etílico e os tumores foram cuidadosamente removidos e avaliados quando ao diâmetro máximo, com o auxílio de um paquímetro digital, e quanto ao peso. O percentual de inibição do crescimento do tumor foi calculado considerando a massa média do grupo controle como o percentual de crescimento máximo dos tumores (100 %).

Os tumores foram imersos em solução de sacarose 20 % em PBS e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior processamento e determinação do teor de melanina e da atividade da tirosinase. Os procedimentos para estas determinações estão descritos a seguir.

3.5.4.2.1 Teor de melanina

A concentração de melanina foi quantificada nos tumores subcutâneos após homogeneização em tampão fosfato 20 mM contendo 0,1 % de Triton X-100. O homogenato foi precipitado pela adição de TCA a 20 % na proporção de 1:1 (v/v) e lavado duas vezes com TCA a 10 %, uma vez com a mistura etanol/éter etílico 3:3 (v/v) e uma vez com éter etílico sempre seguido de centrifugação a 10000 xg por 10 minutos. Após as lavagens, o precipitado foi seco em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) e a melanina dissolvida em solução 850 mM de hidróxido de potássio (KOH) por 15 minutos a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. A absorvância das amostras foi monitorada em 405 nm e a concentração de melanina foi expressa em percentual em relação ao

grupo controle sem tratamento (KAWANO et al., 2007; LV et al., 2007; NGUYEN et al., 2007).

3.5.4.2.2 Atividade da tirosinase

Para a medida da atividade da tirosinase os tumores foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0) contendo 1 % de Triton X-100 a 4°C seguido de centrifugação a 10000 xg por 10 minutos. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços em um meio de reação contendo a amostra (0,1 mg de proteína) e 250 µM de L-tirosina em PBS (pH 6,8). A atividade da enzima foi monitorada espectrofotometricamente em 475 nm após 1 hora de incubação a 37 °C e os resultados expressos em percentual em relação ao grupo controle sem tratamento (AOKI et al., 2007; LIN et al., 2007).

3.5.5 Atividade da caspase-3 no pulmão

Para avaliação da atividade da caspase-3 os pulmões foram homogeneizados a 4 °C na proporção 1:5 (p/v) em tampão contendo 10 mM de HEPES (pH 7,4), 42 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 1 mM de PMSF, 100 µM de EDTA e de EGTA, 1 µg/ml de pepstatina e de leupeptina, 5 µg/ml de aprotinina, 1 mM de DTT e 0,5 % de CHAPS. Posteriormente, a amostra (0,5 mg de proteína) foi adicionada a um meio de reação contendo 25 mM de HEPES (pH 7,4), 1 % de CHAPS, 1 mM de EDTA, 10 % de sacarose, 3 mM de DTT e 10 µM do substrato fluorogênico para caspase-3 Ac-DEVD-AMC e incubada por 120 minutos a 37 °C. A atividade da caspase-3 foi avaliada pela produção da AMC fluorescente monitorada em fluorímetro utilizando os comprimentos de onda de 380 e 465 nm para excitação e emissão, respectivamente (ZUSE et al., 2007). Os valores obtidos nas amostras foram subtraídos da fluorescência dos brancos correspondentes sem a adição do substrato fluorescente. O resultado foi expresso em unidades de fluorescência (UF) por hora e normalizado pela concentração de proteínas na amostra.

3.5.6 Avaliação histopatológica

As amostras de tecidos para avaliação histopatológica foram coletadas, fixadas por 24 horas e posteriormente conservadas em

solução de formalina a 4 % tamponada com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4.

No processamento do material, os fragmentos de tecidos foram desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina líquida para a realização dos cortes histológicos com 5 μm de espessura, os quais foram submetidos a coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E). As lâminas foram observadas no microscópio ótico para a elaboração do laudo histopatológico.

3.6 ESTRESSE OXIDATIVO

3.6.1 Tratamentos e obtenção das amostras

3.6.1.1 Células B16F10

As células B16F10 foram distribuídas em placas de 24 poços contendo 3×10^5 células por poço na determinação das espécies reativas e placas de 6 poços contendo 1×10^6 células por poço nos demais ensaios. Os tratamentos com 50 μM do AG e dos derivados G8 e G12 foram realizados durante 3 horas, a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5 % de CO_2 . Foram utilizados 1 mM de H_2O_2 e 200 μM de Trolox como controles positivo e negativo, respectivamente.

O extrato celular para as avaliações da lipoperoxidação e das atividades enzimáticas foi obtido pela adição de tampão de lise (20 mM de tampão fosfato de sódio, 150 mM de NaCl, pH 7,4) com detergente aniônico (1 % de Triton X-100) e inibidores de protease (7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de pepstatina A, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina e 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de SBTI) a 4°C seguida de ultra-sonicação. O lisado celular foi centrifugado a 10000 xg por 10 minutos e as determinações das atividades enzimáticas e da lipoperoxidação foram realizadas no sobrenadante obtido. Os extratos foram mantidos a -20°C até a sua utilização, exceto na determinação da atividade da CAT e na avaliação da lipoperoxidação que foram realizadas com a amostra fresca.

3.6.1.2 Tecido pulmonar e hepático dos camundongos

Os animais foram tratados conforme descrito anteriormente na avaliação da toxicidade e da atividade antitumoral *in vivo*.

Os fragmentos dos tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo 0,1 % de Triton X-100 e 150 mM de cloreto de sódio, na proporção de 1:10 (p/v) no caso do fígado e 1:5 (p/v) no caso do pulmão ou do tumor subcutâneo. A homogeneização foi realizada com um homogeneizador de tecidos por cerca de 20 segundos, seguido de centrifugação a 10000 xg durante 10 minutos, sendo todo o procedimento realizado a 4 °C. Os sobrenadantes obtidos foram utilizados nas determinações das atividades enzimáticas, lipoperoxidação, tióis não-protéicos e espécies reativas. A avaliação do dano celular por meio da medida da lipoperoxidação foi realizada em homogenato fresco, ou seja, logo após a sua preparação, assim como a determinação dos tióis não-protéicos, das espécies reativas e da atividade da CAT. Para as demais determinações os sobrenadantes foram mantidos a -20 °C até a sua utilização em um prazo máximo de uma semana.

3.6.2 Determinação de espécies reativas

O método avalia a presença de espécies reativas por meio da sonda diacetato de dicloro-dihidrofluoresceína (DCFH₂-DA). A DCFH₂-DA é uma substância não fluorescente permeável à membrana celular que após a clivagem do componente acetato pelas esterases no citoplasma forma a diclorofluoresceína reduzida (DCFH), a qual é impermeável, e na presença de espécies reativas é oxidada em diclorofluoresceína (DCF) emitindo fluorescência verde após excitação em 488 nm, proporcional à quantidade intracelular de espécies reativas (SAUER et al., 2003).

Nas culturas celulares, ao término dos tratamentos foram adicionados às células 10 µM de DCFH₂-DA e a incubação prolongada em 30 minutos, nas mesmas condições citadas anteriormente. A seguir, as células foram lavadas três vezes com PBS para a remoção do corante não incorporado. A avaliação foi realizada pela visualização das células ao microscópio de fluorescência invertido e da quantificação da fluorescência verde em espectrofluorímetro após remoção das células da placa de cultura, sendo a leitura da fluorescência realizada utilizando os comprimentos de onda de excitação emissão de 480 e 520 nm,

respectivamente. Uma curva analítica de DCF foi construída para a análise dos resultados os quais foram normalizados para serem expressos em percentual do controle sem tratamento (100 %).

Algumas adaptações da técnica descrita anteriormente foram realizadas para possibilitar a medida das espécies reativas nos homogenatos de tecidos.

Assim, a determinação das espécies reativas nos homogenatos foi realizada e placas de 96 poços apropriadas para a leitura em espectrofluorímetro pela incubação de 0,2 mg de proteína da amostra diluída em PBS com 40 nM de DCFH2-DA durante 30 minutos a 37 °C, ao abrigo da luz. A quantificação da fluorescência verde em espectrofluorímetro foi realizada da mesma forma descrita para as células, no entanto os resultados foram expressos em picomol de DCF por miligrama de proteína.

3.6.3 Avaliação da lipoperoxidação

A lipoperoxidação foi avaliada pela análise das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o malondialdeído (MDA), produzindo uma base de Schiff de coloração rosa (BIRD; DRAPER, 1984).

No ensaio, as proteínas das amostras (0,3 mg no caso do extrato celular, 1 mg no caso do fígado e 0,5 mg no caso do pulmão) foram precipitadas em um tubo de ensaio de vidro pela adição de TCA a 12 %. Em seguida, foram adicionados ao tubo uma solução tampão contendo 60 mM de Tris-HCl, pH 7,4, e 0,1 mM de DPTA, além de uma solução de TBA a 0,73 % (homogenatos) ou 1% (extrato celular) na proporção de 1:1:1 (v/v/v) e incubados por 60 (homogenato) ou 120 (extrato celular) minutos a 100 °C. Após a incubação, o material foi resfriado durante 30 minutos a 5 °C e centrifugado por 5 minutos a 10000 xg. A absorbância do sobrenadante foi medida em 535 nm e utilizada no cálculo da concentração de MDA na amostra com base na curva analítica de MDA construída simultaneamente ao ensaio. Os valores finais foram expressos em porcentagem de lipoperoxidação em relação ao controle sem tratamento (100 %) no caso dos extratos celulares ou em nanomol de MDA por miligrama de proteína no caso dos homogenatos.

3.6.4 Catalase

Para análise da atividade da CAT foi utilizado o método descrito por Aebi (1984), que quantifica a velocidade de decomposição do H_2O_2 em 240 nm pela enzima presente na amostra.

No ensaio, foi utilizada uma solução 10 mM de H_2O_2 em 50 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,0) preparada e titulada no dia da análise, a qual foi adicionada a amostra (0,1 mg de proteína no caso do extrato celular, 1 mg no caso do fígado e 0,5 mg no caso do pulmão). O decaimento da absorbância foi monitorado durante 20 segundos para as amostras de fígado, 90 segundos para as amostras de pulmão e 10 minutos para os extratos celulares, para a obtenção do valor da constante de velocidade da atividade da enzima indicada pelo coeficiente angular (K) da reta obtida por regressão linear dos dados obtidos durante o monitoramento. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os valores expressos em porcentagem em relação ao controle sem tratamento (100 %) no caso dos extratos celulares ou em milimol por minuto por miligrama de proteína no caso dos homogenatos.

A atividade da CAT foi calculada da seguinte forma:

$$\text{CAT (mmol/min/mg de proteína)} = [(K/\varepsilon) \times \text{FD}]/\text{PTN}$$

Sendo:

- K: coeficiente angular da reta obtida por regressão linear dos dados da atividade da enzima
- ε : coeficiente de extinção molar do H_2O_2 em 240 nm ($43,6 \times 10^{-3} \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
- FD: fatores de diluição do tecido no homogenato (fígado: 10x, pulmão: 5x) e do homogenato na cubeta (100x).
- PTN: concentração de proteína no homogenato em mg/ml

3.6.5 Glutathione S-transferase

As glutathionas S-transferases são um grupo de enzimas que catalisam a formação de tioésteres pela adição de glutathione reduzida (GSH) a um grande número de compostos que contém um carbono eletrofílico.

Neste ensaio, a atividade da GST foi medida espectrofotometricamente em 340 nm de acordo com Keen e

colaboradores (1976). O método consistiu na adição da amostra (0,1 mg de proteína no caso do extrato celular, 1 mg no caso do fígado e 0,5 mg no caso do pulmão) a um meio de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,0), 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e 1 mM de GSH sendo a absorbância em 340 nm monitorada durante 3 minutos em intervalos de 10 segundos para a obtenção do valor da constante de velocidade da atividade da enzima indicada pelo coeficiente angular (K) da reta obtida por regressão linear dos dados obtidos durante o monitoramento. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os valores expressos em porcentagem em relação ao controle sem tratamento (100 %) no caso dos extratos celulares ou em milimol por minuto por miligrama de proteína no caso dos homogenatos.

A atividade da GST foi calculada da seguinte forma:

$$\text{GST (mmol/min/mg de proteína)} = [(K/\varepsilon) \times \text{FD}]/\text{PTN}$$

Sendo:

- K: coeficiente angular da reta obtida por regressão linear dos dados da atividade da enzima
- ε : coeficiente de extinção molar do CDBN em 340 nm ($9600 \times 10^{-3} \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
- FD: fatores de diluição do tecido no homogenato (fígado: 10x, pulmão: 5x) e do homogenato na cubeta (100x).
- PTN: concentração de proteína no homogenato em mg/ml

3.6.6 Glutationa peroxidase

A enzima glutaciona peroxidase (GPx) catalisa a redução do H_2O_2 , bem como de outros hidroperóxidos, utilizando a GSH como substrato para esta reação, produzindo glutaciona oxidada (GSSG) (FLOHE; GUNZLER, 1984). O ensaio é uma medida indireta que consiste em registrar a diminuição do dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfato reduzido (NADPH) pela atividade da glutaciona redutase (GR) adicionada ao meio de reação com o intuito de reciclar a GSH consumida pela GPx da amostra.

Para este ensaio, a amostra (1 mg de proteína no caso do fígado e 0,5 mg no caso do pulmão) foi adicionada a um meio de reação composto por 50 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,0, 100 μM de DPTA, 232 μM de NADPH, 0,1 U/ml de GR e 2 mM de

GSH sendo a reação iniciada pela adição de 3,8 μM de *ter-butilhidroperóxido* (t-BuOOH). A absorbância em 340 nm foi monitorada durante 3 minutos para a obtenção do valor da constante de velocidade da atividade da enzima indicada pelo coeficiente angular (K) da reta obtida por regressão linear dos dados obtidos durante o monitoramento. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os valores expressos em milimol por minuto por miligrama de proteína.

A atividade da GPx foi calculada da seguinte forma:

$$\text{GPx (mmol/min/mg de proteína)} = [(K/\epsilon) \times \text{FD}]/\text{PTN}$$

Sendo:

- K: coeficiente angular da reta obtida por regressão linear dos dados da atividade da enzima
- ϵ : coeficiente de extinção molar do NADPH em 340 nm ($6220 \times 10^{-3} \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
- FD: fatores de diluição do tecido no homogenato (fígado: 10x, pulmão: 5x) e do homogenato na cubeta (102x).
- PTN: concentração de proteína no homogenato em mg/ml

3.6.7 Glutathiona redutase

O método utilizado para análise da atividade da GR foi proposto por Carlberg e Mannervik (1975) e consiste em monitorar em 340 nm a taxa de oxidação do NADPH devido à redução da GSSG pela GR presente na amostra.

Neste ensaio, a amostra (1 mg de proteína no caso do fígado e 0,5 mg no caso do pulmão) foi adicionada a um meio de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,0, 100 μM de DPTA, 232 μM de NADPH e 1 mM de GSSG, sendo a absorbância em 340 nm monitorada durante 3 minutos para a obtenção do valor da constante de velocidade da atividade da enzima indicada pelo coeficiente angular (K) da reta obtida por regressão linear dos dados obtidos durante o monitoramento. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os valores expressos em milimol por minuto por miligrama de proteína.

A atividade da GR foi calculada da seguinte forma:

$$\text{GR (mmol/min/mg de proteína)} = [(K/\epsilon) \times \text{FD}]/\text{PTN}$$

Sendo:

- K: coeficiente angular da reta obtida por regressão linear dos dados da atividade da enzima
- ϵ : coeficiente de extinção molar do NADPH em 340 nm ($6220 \times 10^{-3} \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
- FD: fatores de diluição do tecido no homogenato (10x para o fígado e 5x para o pulmão) e do homogenato na cubeta (50x).
- PTN: concentração de proteína no homogenato em mg/ml

3.6.8 Quantificação dos tióis não-protéicos

A concentração de tióis não protéicos nos homogenatos do fígado e dos pulmões dos animais foi determinada pelo método descrito por Beutler, Kelly & Duron (1963). Neste ensaio, a GSH reage com o ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico (DTNB), formando um ânion tiolato (TNB) de cor amarelada (quanto maior a presença de GSH, mais acentuada a cor), mensurável em 412 nm.

O ensaio foi realizado em placa de 96 poços sendo a amostra (1 mg de proteína no caso do fígado e 0,5 mg no caso do pulmão) adicionada a um meio de reação contendo 20 μM de DTNB em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 8,0) adicionado de 0,1 U/ml de GR para a determinação da glutatona total (GT). A formação do TNB foi monitorada após 10 minutos em 405 nm. Simultaneamente, foi construída uma curva analítica de GSH (0 a 200 μM) e a equação obtida por meio de regressão linear utilizada na determinação das concentrações de GT nas amostras.

3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de Lowry (1955) clássico ou modificado por Peterson (1977).

O método de Lowry baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (Reagente Folin-Ciocalteu), o qual na presença do catalisador cobre (II) em meio alcalino, reage com proteínas sendo reduzido e produzindo um composto com absorção máxima em 750 nm. É sugerido que esta redução ocorra diretamente pelas cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina), que contribuem com quatro elétrons, ou pela retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela

formação do quelato entre o cobre (II) e peptídeos/proteínas. O método de Peterson (1977) usa como base o método de Lowry et al.(1951), com modificações que possibilitam a presença do detergente SDS nas amostras (PETERSON, 1977).

Nas determinações da concentração de proteína, 5 µl das amostras (diluídas 1:4 (v/v) em água no caso dos homogenatos ou não diluídas no caso dos extratos celulares) foram adicionadas a um meio contendo solução alcalina (1,5 % de carbonato de sódio, 0,3 % de hidróxido de sódio, 0,02 % de tartarato de sódio e 0,01 % de sulfato de cobre) com ou sem 1,25 % de SDS. Após incubação por 10 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado o reagente de Folin-Ciocalteu previamente diluído a 0,4 N e incubado por mais 30 minutos. A leitura foi realizada em 750 nm e as concentrações obtidas por meio de uma curva padrão utilizando BSA.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos experimentos *in vitro* os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos três vezes em dias diferentes. Nos experimentos *in vivo* foram utilizados no mínimo cinco animais por grupo e as determinações foram realizadas em duplicata.

Para a análise estatística, foram utilizados os programas GraphPad Prism versão 5 e GraphPad InStat versão 3.01 para Windows (GraphPad Software). Inicialmente, foi elaborada uma planilha dos dados e processada a Estatística Descritiva de onde foram retirados os valores de média e erro padrão da média (EPM), forma como os resultados foram expressos. Na Estatística Inferencial, para a comparação entre dois grupos foi utilizado o teste "t" de Student. Na comparação entre três ou mais grupos, foi utilizada inicialmente a análise de variância de uma via (ANOVA) e na presença de diferenças significativas a ANOVA foi seguida pelos testes de comparações múltiplas de Tukey, para comparar todos os grupos entre si sem fixar o controle, ou de Dunnett, para realizar as comparações fixando um grupo controle. As diferenças observadas durante a análise foram consideradas estatisticamente significativas quando a probabilidade foi menor que 0,05 (5 %).

3.9 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.9.1 Triagem da atividade citotóxica do ácido gálico e derivados ésteres em células de linhagem de melanoma murino

A triagem da atividade citotóxica do AG e de 14 derivados n-alquil-ésteres nas células B16F10 foi realizada em estudos anteriores deste laboratório (LOCATELLI et al., 2009). Para tanto, as células B16F10 foram incubadas por 24, 48 e 72 horas na presença de 100 µM das substâncias citadas e avaliadas pelo teste de viabilidade do MTT. As substâncias com atividade citotóxica superior a 50 % foram novamente testadas nas células para determinação da IC₅₀ por ensaios concentração e tempo-resposta.

Posteriormente, foi realizada análise de fragmentação do DNA e diferenciação do tipo de morte celular induzida pelas substâncias, com o objetivo de selecionar aquelas substâncias cuja citotoxicidade estivesse relacionada à via de apoptose. Com base neste critério, destacaram-se os derivados com 8, 10, 12 e 14 carbonos, os quais foram testados quanto ao envolvimento de alguns mecanismos na via de indução de morte nesta linhagem.

O referido estudo sugeriu que o mecanismo de ação do G8 parecia envolver a geração de espécies reativas, que o galato de decila (G10) e o G12 ativaram o NF-κB e que o galato de tetradecila (G14) promoveu inibição da adesão celular. Assim, para o desenvolvimento deste trabalho de doutorado foram selecionados, com base nos mecanismos sugeridos anteriormente, os derivados G8 e G12 para a continuidade dos estudos de determinação do mecanismo de indução de morte celular nas células B16F10.

Outro fator, além dos mecanismos sugeridos no trabalho anterior, que contribuiu para a escolha destes dois derivados para a continuidade do estudo foi o fato de ser possível adquiri-los comercialmente em maior quantidade do que aquela que tem sido possível ser sintetizada no laboratório que nos fornece a série de derivados n-alquil éster para teste de atividade biológica. Este cuidado foi importante, pois os estudos iniciais de encapsulação nas nanopartículas exigiram uma quantidade de substância na ordem de gramas.

3.9.2 Comparação do efeito citotóxico dos galatos de octila e de dodecila entre células de linhagem de melanoma murino e de duas linhagens não tumorais

Para avaliar se existe seletividade do efeito citotóxico dos derivados G8 e G12 para as células B16F10, estas substâncias foram testadas pelo teste de viabilidade celular do MTT na linhagem B16F10 e nas linhagens não tumorais MDCK e VERO conforme delineamento proposto na Figura 6.

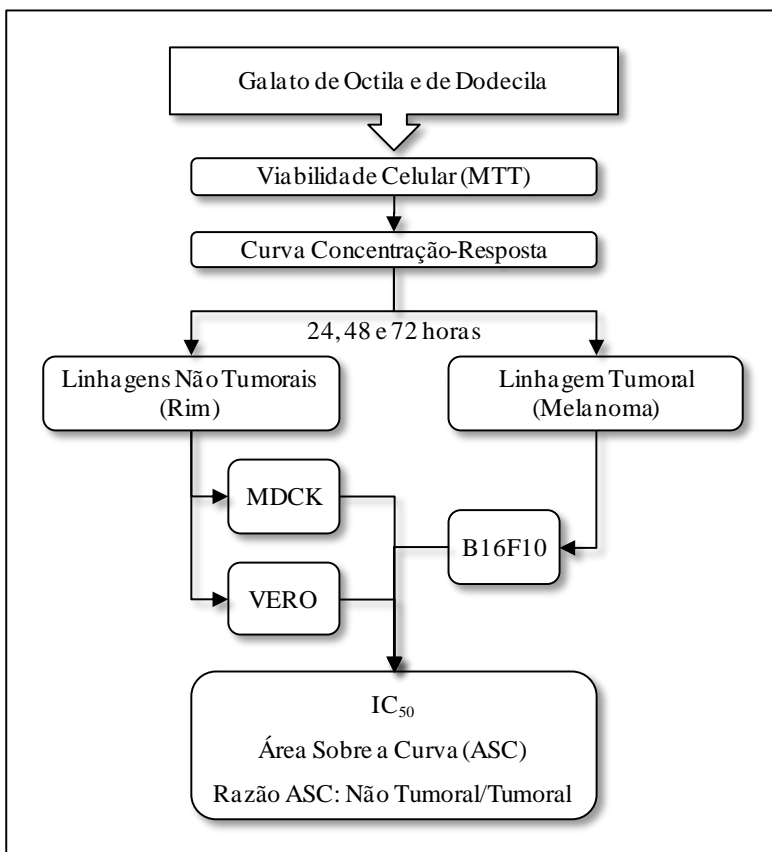


Figura 6: Delineamento experimental para a avaliação da seletividade do efeito citotóxico do G8 e do G12 para a linhagem tumoral B16F10.

3.9.3 Avaliação tempo e concentração-resposta da citotoxicidade dos galatos de octila e de dodecila nas células de linhagem de melanoma murino

Buscando-se identificar o alvo celular e o tempo de tratamento necessário para a observação do efeito citotóxico do G8 e do G12 nas células B16F10, foram realizadas análises concentração e tempo-resposta por diferentes ensaios de viabilidade celular, conforme delineamento experimental apresentado na Figura 7.

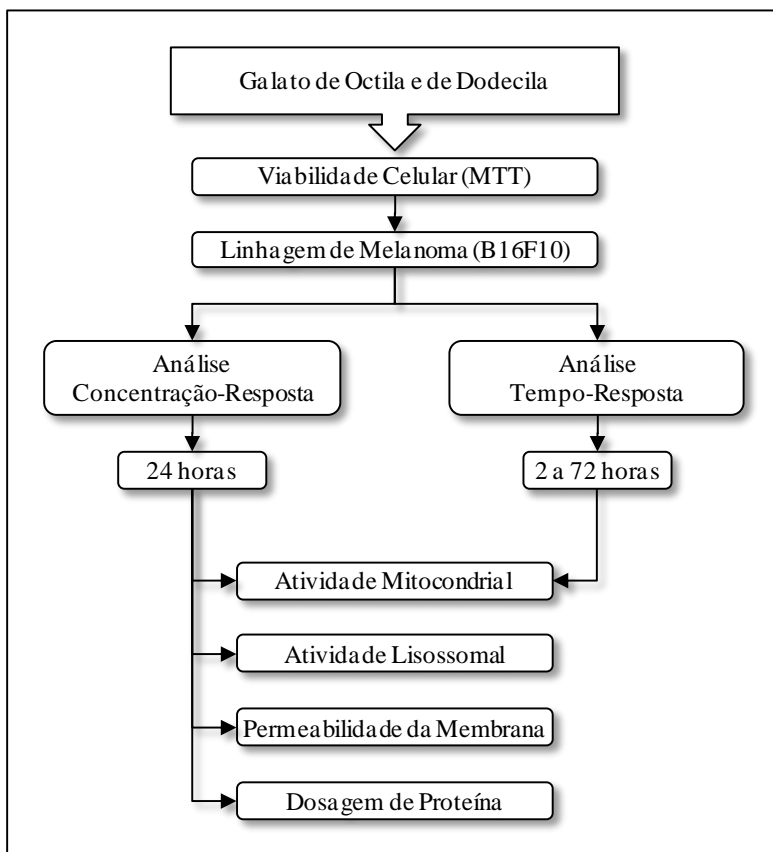


Figura 7: Delineamento experimental para a avaliação concentração e tempo resposta para o efeito citotóxico do G8 e do G12 nas células B16F10.

3.9.4 Avaliação dos mecanismos de citotoxicidade dos galatos de octila e de dodecila nas células de linhagem de melanoma murino

O estudo dos mecanismos de citotoxicidade foi dividido em três grupos: apoptose, estresse oxidativo e vias das MAPKs e da AKT, conforme delineamento experimental apresentado na Figura 8.

No estudo das vias de apoptose foi realizada inicialmente uma avaliação temporal dos efeitos do G8 e do G12 sobre a atividade da caspase-3. Com base nesta avaliação temporal foi determinado o tempo de incubação necessário para a investigação do efeito dos galatos sobre o potencial mitocondrial. Na seqüência, foram investigados os efeitos dos galatos sobre a expressão do receptor de morte Fas e de proteínas anti-apoptótica (Bcl-2) e pró-apoptótica (Bax) nas células B16F10.

O estresse oxidativo foi avaliado pela investigação dos efeitos do G8 e do G12 na indução de lipoperoxidação, na geração de espécies reativas e sobre atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx e GST.

O envolvimento das MAPKs e da AKT foi avaliado por meio de comparação dos efeitos do G8 e do G12 sobre a viabilidade celular no teste do MTT na presença e na ausência de inibidores específicos relacionados no Quadro 6. As células (1×10^4) foram incubadas previamente por 1 hora com os inibidores das vias da MAPKs ou da AKT antes da adição de 50 μM dos galatos. Paralelamente foram realizadas incubações com os galatos nas mesmas condições, no entanto na ausência de inibidores e na presença do solvente. A viabilidade celular foi avaliada após 24 horas pelo método do MTT.

Quadro 6: Inibidores das vias das MAPKs e da AKT utilizados.

Inibidor	Alvo	Concentração (μM)	Referência
PD098,059	MEK1/2	25	Osanai et al., 2006 Pérez et al., 2008 Shin et al., 2008
LY294,002	PI3K	10	Osanai et al., 2006 Shin et al., 2008
SP600125	JNK	1	Bennet et al., 2001
SB203480	P38	10	Osanai et al., 2006; Ordan et al., 2003

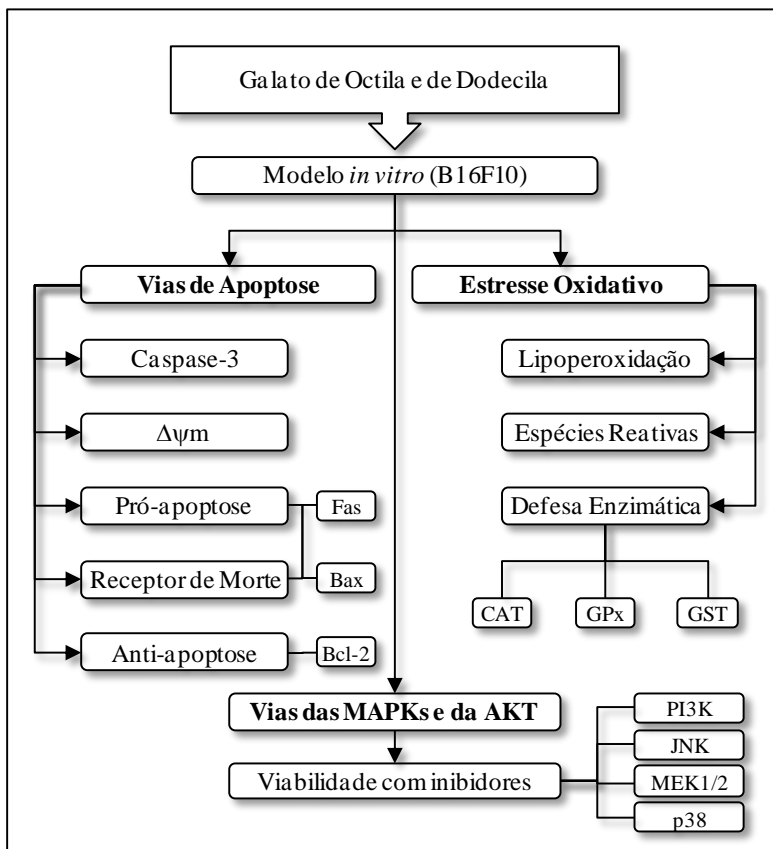


Figura 8: Delineamento experimental para a avaliação dos mecanismos de citotoxicidade do G8 e do G12 nas células B16F10.

3.9.5 Nanoformulações: caracterização e avaliação de potencial citotóxico

Seis nanopartículas foram caracterizadas e avaliadas quanto ao potencial citotóxico nas linhagens não tumorais VERO e MDCK (FIGURA 9). Os resultados destas análises foram utilizados para a seleção de uma nanopartícula para a continuidade dos estudos. Esta nanopartícula foi testada novamente quanto ao efeito citotóxico nas células B16F10 em duas escalas de tamanho, tendo por objetivo garantir a ausência de efeito citotóxico desta nanopartícula, tanto em termos de análise da constituição quanto de análise do tamanho.

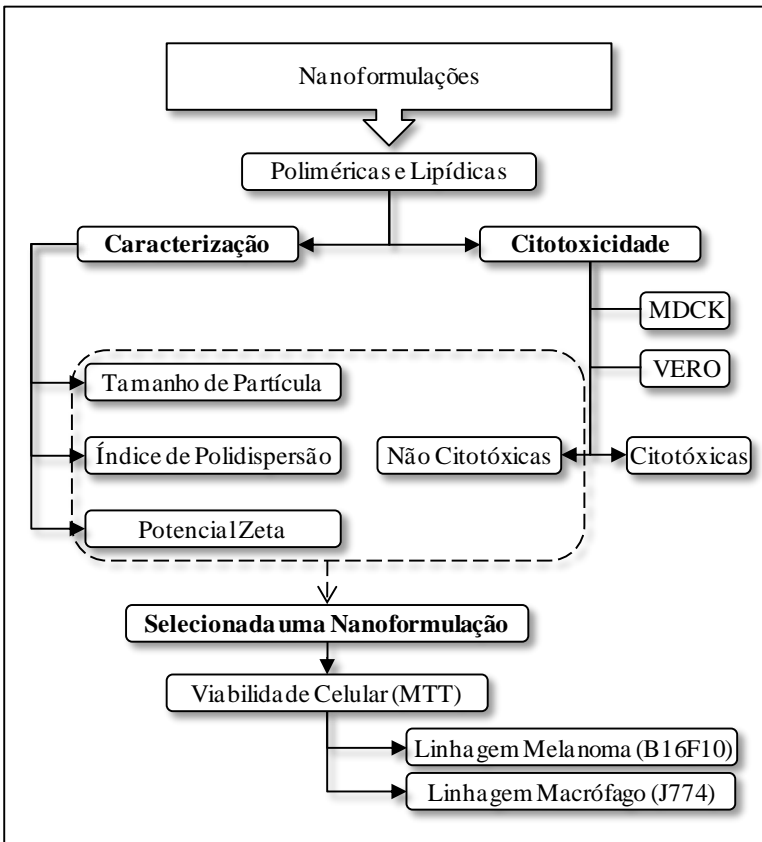


Figura 9: Delineamento experimental para a caracterização e avaliação do potencial citotóxico de nanopartículas poliméricas e lipídicas.

3.9.6 Encapsulação do ácido gálico e dos derivados ésteres galato de octila e galato de dodecila na nanopartícula

Após comprovada a ausência de citotoxicidade da nanopartícula selecionada, os procedimentos para a encapsulação do AG e dos derivados G8 e G12 foram realizados, conforme apresentado na Figura 10.

Inicialmente foi desenvolvida uma metodologia para quantificação do teor das substâncias incorporadas e eficiência de encapsulação. Após a encapsulação dos galatos as nanopartículas foram novamente caracterizadas.

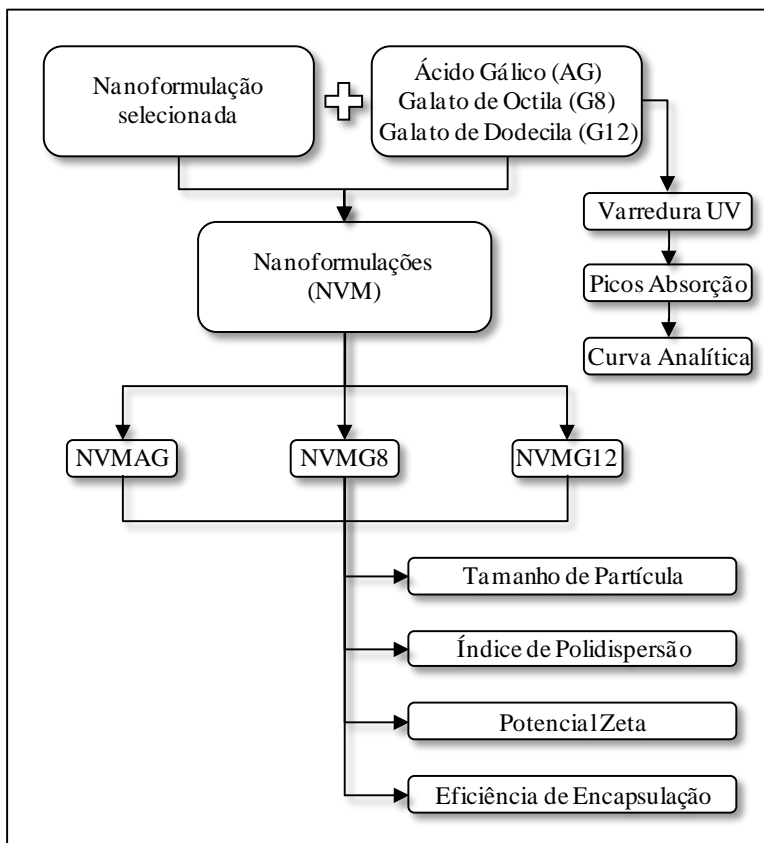


Figura 10: Delineamento experimental para a encapsulação e a quantificação dos galatos na nanopartícula lipídica.

3.9.7 Citotoxicidade do ácido gálico e derivados ésteres galato de octila e galato de dodecila encapsulados na nanopartícula

Os efeitos das nanoformulações contendo o AG e os derivados G8 e G12 sobre a viabilidade celular no teste do MTT foram avaliados nas células B16F10 e nas células da linhagem não tumoral renal VERO e posteriormente, comparados com os resultados obtidos nos estudos com as substâncias livres por meio dos valores das IC_{50} e da ASC, conforme delineamento apresentado na Figura 11.

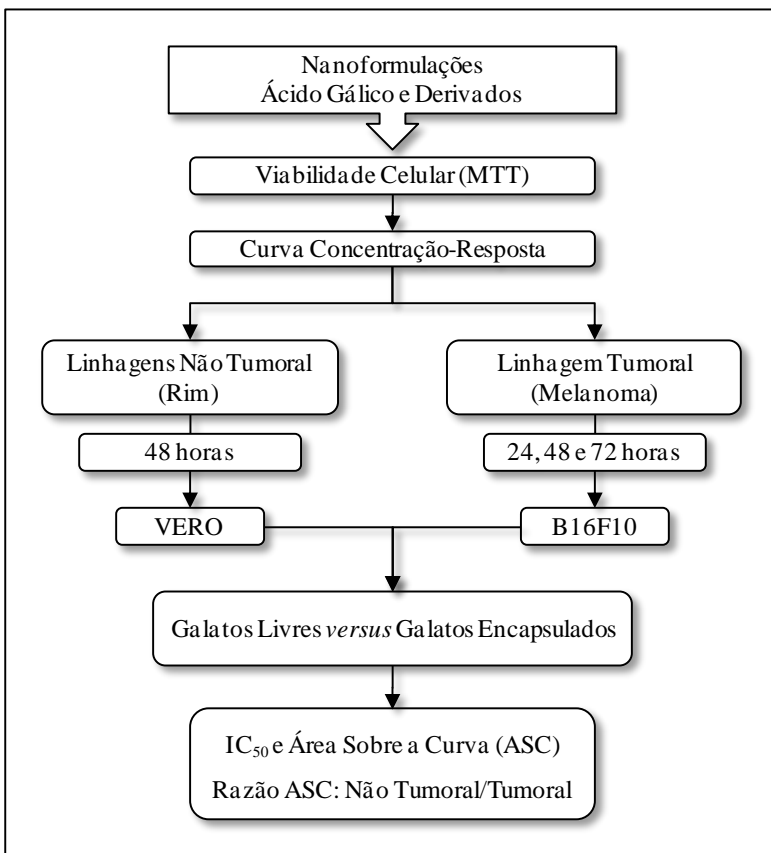


Figura 11: Delineamento experimental para a comparação do efeito citotóxico do AG, G8 e G12 livres ou encapsulados em nanopartículas em células de linhagem tumoral e não tumoral.

3.9.8 Toxicidade *in vivo* do galato de octila livre e encapsulado na nanopartícula lipídica

A toxicidade do G8 livre e encapsulado na nanopartícula lipídica foi avaliada em camundongos por meio de parâmetros como a variação de peso corporal, hemograma e testes bioquímicos de funções hepática e renal, além da avaliação anatomopatológica ante e pós-morte e do estresse oxidativo no fígado, conforme o delineamento experimental apresentado na Figura 12.

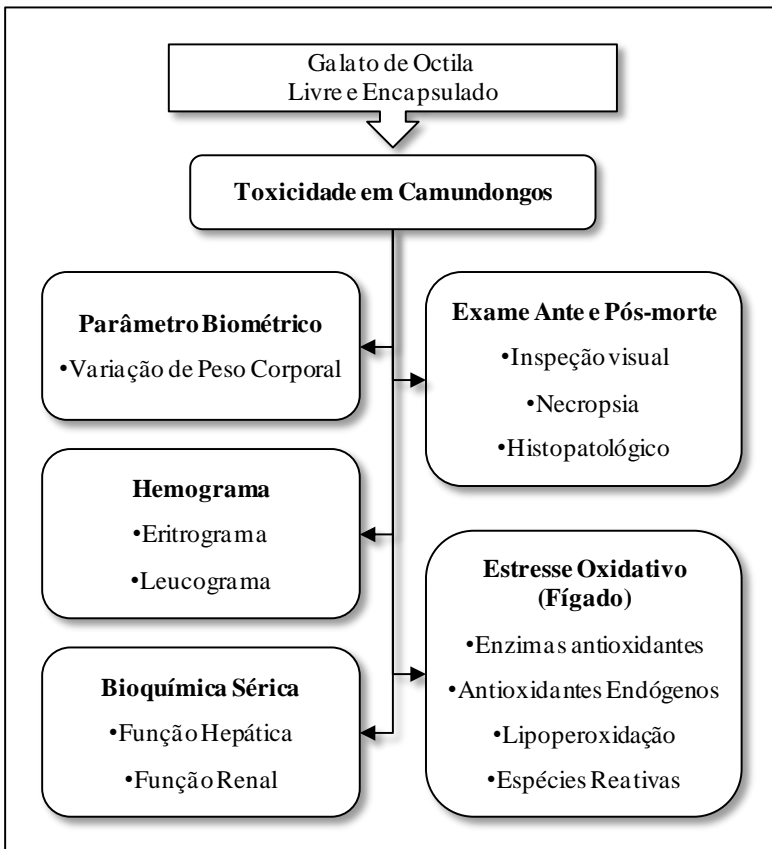


Figura 12: Delineamento experimental para a avaliação da toxicidade *in vivo* do G8 livre e encapsulado na nanopartícula lipídica.

3.9.9 Efeito antitumoral e antimetastático do galato de octila livre e encapsulado na nanopartícula em modelo de melanoma murino

Os efeitos, antitumoral e antimetastático, do G8 livre e encapsulado na nanopartícula foram avaliados *in vivo* utilizando dois modelos de melanoma murino B16F10, conforme delineamento experimental apresentado na Figura 13.

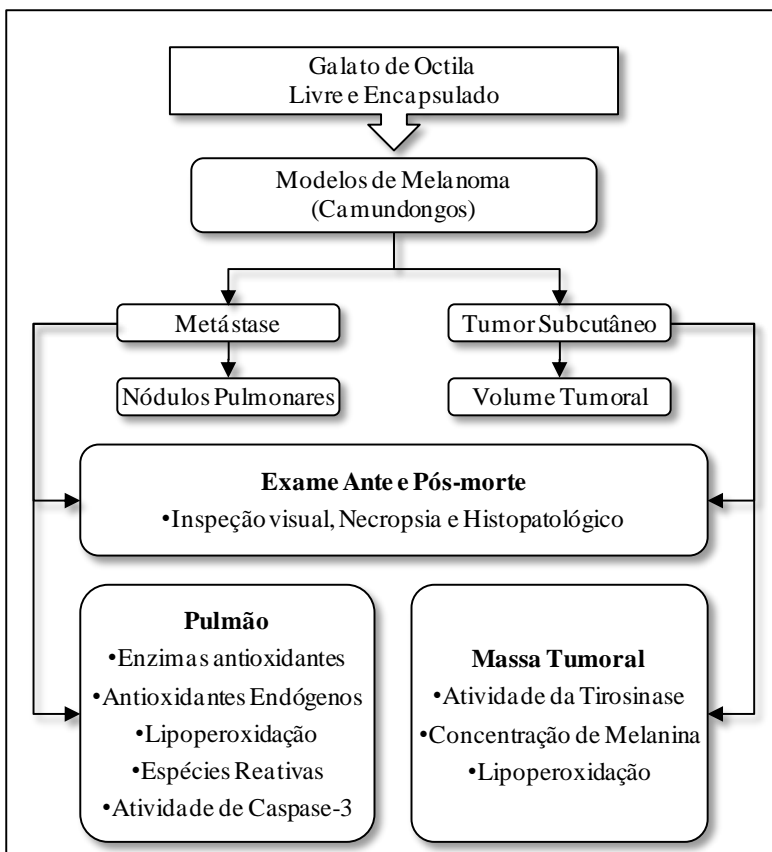


Figura 13: Delineamento experimental para a avaliação da atividade antitumoral *in vivo* do G8 livre e encapsulado na nanopartícula lipídica em modelo de melanoma murino.

4 RESULTADOS

Os resultados aqui apresentados estão divididos em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os ensaios *in vitro* consistem na avaliação dos efeitos e mecanismos de citotoxicidade do AG e derivados G8 e G12 livres ou encapsulados em nanopartículas lipídicas nas células B16F10 e nas células VERO e MDCK, para efeitos comparativos. Incluem ainda os testes de seleção das nanopartículas e encapsulação dos galatos citados. Os ensaios *in vivo* compreendem a avaliação da toxicidade do G8 livre ou encapsulado em nanopartículas em camundongos, assim como os testes de atividade antitumoral em modelos de melanoma murino.

4.1 ESTUDOS *IN VITRO*

4.1.1 Triagem da atividade citotóxica do ácido gálico e derivados ésteres em células de linhagem de melanoma murino

A triagem da atividade citotóxica do AG e de 14 derivados n-alquil-ésteres nas células B16F10 realizada em estudos anteriores deste laboratório (LOCATELLI, et al. 2009), como mencionado anteriormente, selecionou os derivados G8, G10, G11, G12 e G14 por apresentarem atividade citotóxica superior a 50 % após 72 horas de incubação conforme ilustrado na Figura 14.

Posteriormente, os derivados do AG selecionados na triagem, foram testados nas células B16F10 para diferenciação do tipo de morte celular induzida pelas substâncias, com o objetivo de selecionar aquelas substâncias cuja citotoxicidade estivesse relacionada à via da apoptose. A análise foi inicialmente realizada por Locatelli et al. (2009) por meio de eletroforese dos extratos nucleares em gel de agarose 1 %, corado com BE para visualização em transiluminador. Com base neste critério, destacaram-se os derivados com 8, 10, 12 e 14 carbonos (FIGURA 15).

No presente trabalho, este efeito foi confirmado para o AG e para os derivados G8 e G12, objetos deste estudo, utilizando microscopia de fluorescência para avaliar as alterações morfológicas nucleares características de apoptose por meio de marcação com LA e BE. Neste ensaio as células não tratadas (controle) e as tratadas com o AG apresentaram o núcleo uniformemente corado pelo LA, caracterizando a viabilidade destas células. As células tratadas com

G8 e G12 apresentaram manchas brilhantes no núcleo que caracteriza a condensação da cromatina que ocorre durante o processo da apoptose (Figura 16).

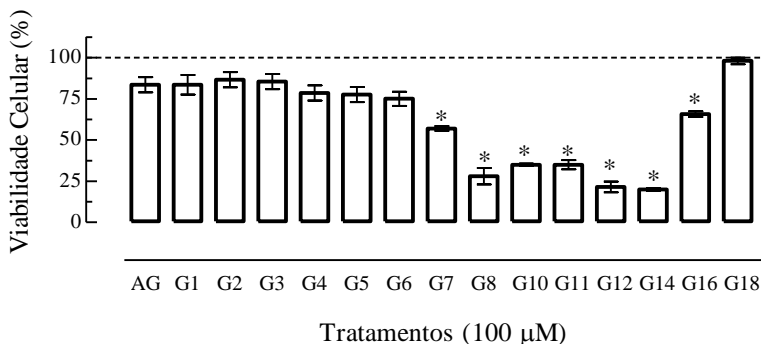


Figura 14: Triagem da citotoxicidade do AG e de 14 derivados ésteres (G1 a G18) nas células B16F10. As células (1×10^4) foram tratadas por 72 horas e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Os resultados estão expressos em percentual do controle como Média \pm EPM ($n=3$). *indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle sem tratamento (linha tracejada) usando ANOVA seguida de teste de Dunnett.

Fonte: adaptado de Locatelli et al. (2009)

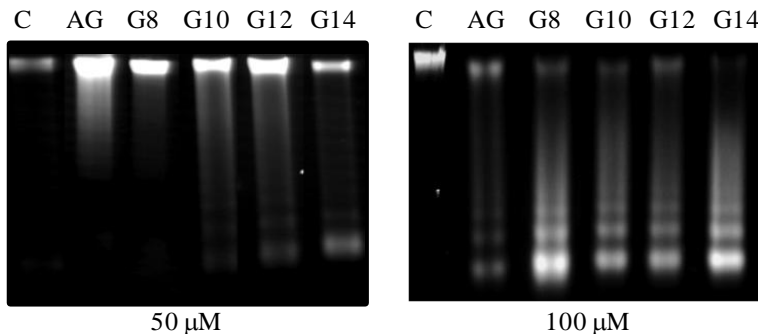


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose de DNA extraído de células B16F10 submetidas ao tratamento com o AG e com os derivados G8, G10, G12 e G14. As células (1×10^6) foram tratadas durante 24 horas. “C” representa o controle de células sem tratamento. Observar a fragmentação internucleossômica evidenciada pelo “padrão em escada”.

Fonte: adaptado de (Locatelli, et al. 2009)

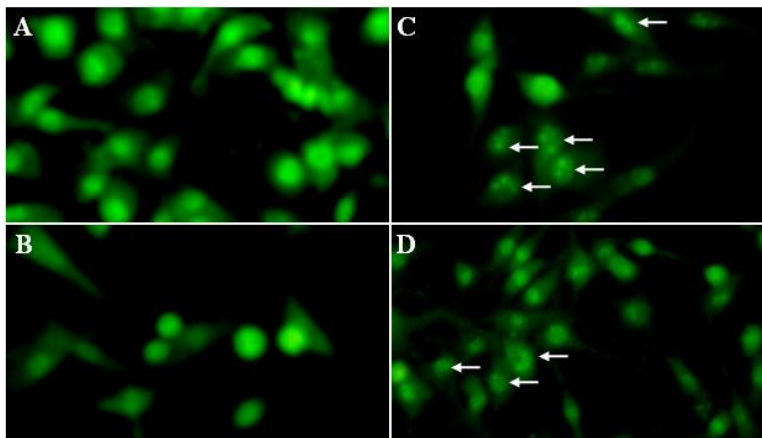


Figura 16: Análise da apoptose por coloração com laranja de acridina e brometo de etídio das células B16F10 submetidas ao tratamento com AG e derivados G8 e G12. As células (3×10^5) foram incubadas com $25 \mu\text{M}$ dos tratamentos por 12 horas. (A) Controle sem tratamento, (B) AG, (C) G8, (D) G12. As setas indicam alterações morfológicas nucleares características da morte celular por apoptose.

4.1.2 Comparação do efeito citotóxico dos galatos de octila e de dodecila entre as células de linhagem de melanoma murino e de duas linhagens não tumorais

O efeito citotóxico do G8 e G12 avaliado pelo teste do MTT nas células B16F10 foi comparado ao efeito dos mesmos em duas linhagens não tumorais renais, MDCK e VERO. Para tanto, foram realizadas curvas concentração resposta (0 a $100 \mu\text{M}$) nos tempos de 24, 48 e 72 horas e calculados os valores de IC_{50} e da ASC. A comparação foi efetuada com base nos valores de IC_{50} para cada linhagem e no cálculo da razão entre a ASC da linhagem não tumoral pela linhagem tumoral.

Os resultados apontaram uma menor citotoxicidade dos derivados G8 e G12 nos três tempos em que foram avaliados (24, 48 e 72 horas) para a linhagem VERO e no tempo de 24 horas para a linhagem MDCK, sugerida pela menor IC_{50} na linhagem tumoral e pelo valor da razão da ASC superior a um, indicando uma possível seletividade dos derivados para a linhagem tumoral (TABELAS 1 e 2).

Tabela 1: Valores de IC₅₀ para citotoxicidade do G8 e do G12 em células da linhagem tumoral B16F10 e das linhagens não tumorais renais VERO e MDCK.

Galato / Tempo	IC ₅₀ (µM)		
	B16F10 ^a	VERO ^a	MDCK ^a
G8			
24 h	42,1 ± 2,1	106,3 ± 2,5 *	65,6 ± 2,0 *
48 h	18,7 ± 1,0	71,5 ± 2,2 *	23,1 ± 1,1
72 h	16,0 ± 0,8	84,0 ± 1,5 *	18,1 ± 0,7
G12			
24 h	24,0 ± 0,8	71,3 ± 1,5 *	30,7 ± 1,1 *
48 h	12,4 ± 0,7	61,7 ± 1,0 *	16,1 ± 0,6
72 h	11,4 ± 0,5	70,7 ± 2,5 *	7,2 ± 0,4

^aMédia ± EPM (n=3).

*Diferenças significativas (p<0,05) em relação à linhagem B16F10 usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

Tabela 2: Comparação da ASC de citotoxicidade do G8 e do G12 em células da linhagem tumoral B16F10 e das linhagens não tumorais renais VERO e MDCK.

Tratamento	ASC (% do controle)			Razão ASC	
	B16F10	VERO	MDCK	<u>VERO^a</u> B16F10	<u>MDCK^a</u> B16F10
G8					
24 h	5406 (53)	7689 (75)	6335 (62)	1,42*	1,17*
48 h	4110 (40)	7029 (69)	4177 (41)	1,71*	1,02
72 h	3814 (37)	6752 (66)	3725 (37)	1,77*	0,98
G12					
24 h	4065 (40)	6870 (67)	4864 (48)	1,69*	1,20*
48 h	3214 (32)	6591 (65)	3477 (34)	2,05*	1,08
72 h	3105 (30)	6405 (63)	2586 (25)	2,06*	0,83

^aMédia ± EPM (n=3); ASC do controle (células sem tratamento) = 10193

*Diferenças significativas (p<0,05) em relação à linhagem B16F10 usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

4.1.3 Avaliação tempo e concentração-resposta da citotoxicidade dos galatos de octila e de dodecila em células de linhagem de melanoma murino

Esta avaliação permitiu determinar o tempo e a concentração necessários para a ocorrência da morte celular em resposta aos tratamentos. A importância desta avaliação está na necessidade da utilização de células viáveis para o estudo dos mecanismos de ação. Da mesma forma que a variação de tempo pode interferir no efeito de uma determinada concentração da substância, a concentração também pode interferir no tempo para o aparecimento do evento. Por este motivo a avaliação foi realizada variando-se não só o tempo, mas também a concentração dos galatos testados. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 17 e nos permitem concluir que a alteração na função mitocondrial avaliada pelo teste do MTT foi significativa após 24 horas de tratamento com todas as concentrações testadas dos derivados G8 e G12. No entanto, o G12 promoveu, ainda, alteração significativa na função mitocondrial em tempos inferiores a 24 horas de tratamento, podendo ser observada após 12 horas de tratamento com 75 μM ou a partir de 6 horas com 100 μM .

Na análise concentração-resposta, por meio da comparação entre os diferentes ensaios de viabilidade celular com base nos valores de IC_{50} e ASC, foi observada uma redução significativa na IC_{50} e no valor da ASC quando a viabilidade foi avaliada pelos testes do VN e do LDH em comparação com o teste do MTT (FIGURA 18). Desta forma, parece que os derivados G8 e G12 promovem alterações na atividade lisossomal e na permeabilidade da membrana celular de forma mais significativa do que a interferência na atividade mitocondrial.

Além disso, por meio de comparação entre a concentração de proteínas e a de DNA extraídos das células viáveis após 24 horas de tratamento com G8 e G12, foi observado que a diminuição do teor de proteínas celulares foi semelhante à do conteúdo de DNA celular, sugerindo que os tratamentos não influenciaram na síntese de proteínas (FIGURA 19).

O tempo de 24 horas nas comparações concentração-resposta foi determinado após ensaios preliminares em que se observou que em tempos superiores (48 horas) a avaliação por meio dos ensaios do VN e LDH não poderia ser efetuada em concentrações equivalentes às utilizadas nos estudos anteriores com o MTT em função da elevada citotoxicidade (100 %) dos galatos nos dois métodos citados.

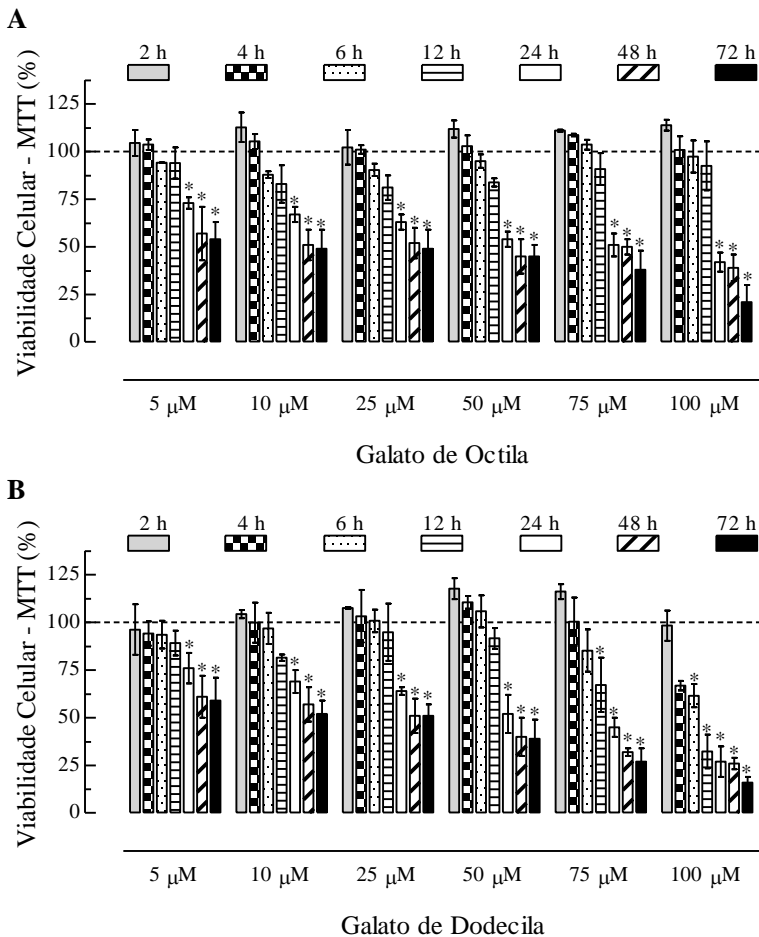


Figura 17: Avaliação tempo-resposta da citotoxicidade do G8 e do G12 nas células B16F10. As células (1×10^4) foram incubadas por período de tempos que variaram de 2 a 72 horas em concentrações crescentes (0 a 100 μM) de G8 e G12 e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. (A) G8 e (B) G12. Os resultados estão expressos em percentual do controle como Média \pm EPM ($n=3$). *indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero (linha tracejada) usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

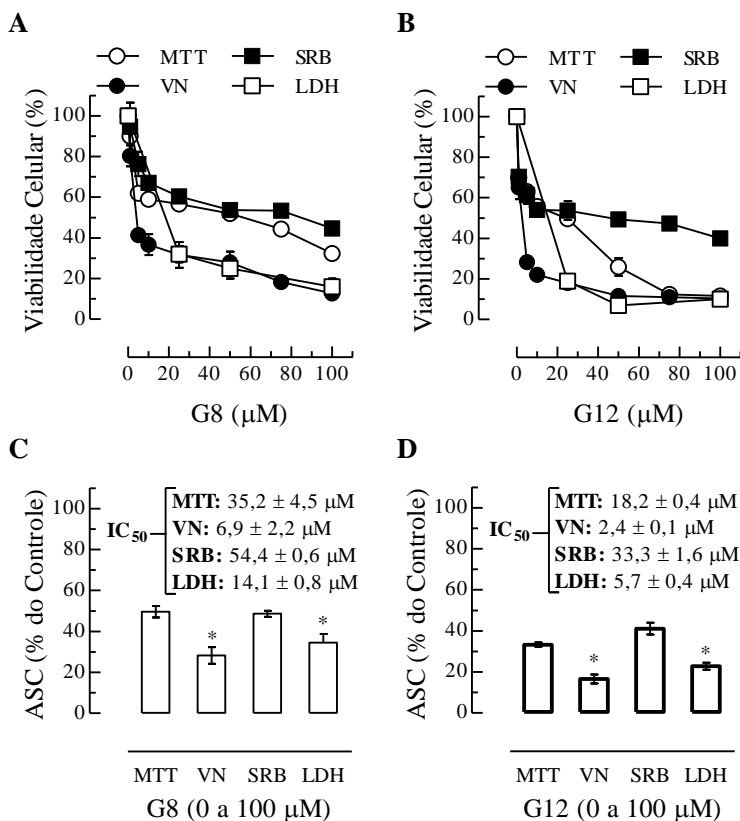


Figura 18: Avaliação comparativa da citotoxicidade do G8 e do G12 nas células B16F10 utilizando diferentes métodos de avaliação da viabilidade celular. As células (1×10^4) foram incubadas por 24 horas em concentrações crescentes (0 a 100 μM) de G8 e G12 e a viabilidade celular foi avaliada pelos métodos do MTT, VN, LDH e SRB. Curva concentração-resposta do G8 (A) e G12 (B). Comparação da ASC e dos valores de IC₅₀ obtidas a partir do tratamento com o G8 (C) e com o G12 (D). Os resultados estão expressos como Média \pm EPM (n=3). * indica as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao teste do MTT usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

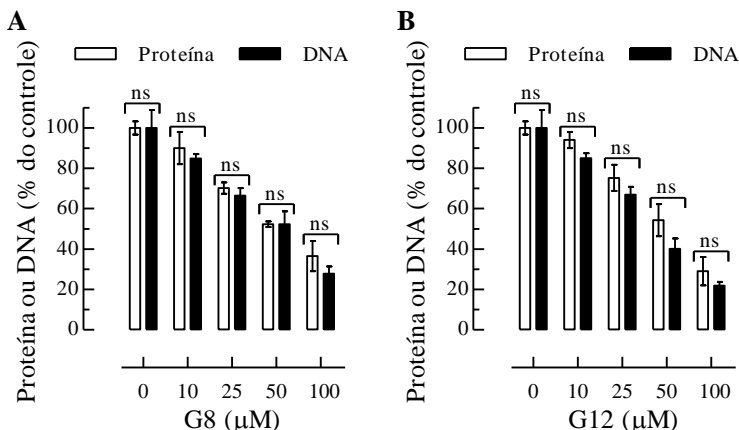


Figura 19: Comparação entre a concentração de proteína e de DNA nas células B16F10 após tratamento com o G8 e o G12. (A) G8 (B) G12. Os resultados estão expressos como Média \pm EPM (n=3). ns = diferença não significativa ($p < 0,05$) no teste t de Student.

4.1.4 Avaliação dos mecanismos de citotoxicidade dos galatos de octila e de dodecila nas células de linhagem de melanoma murino

Neste tópico estão apresentados os efeitos do G8 e do G12 em algumas proteínas relacionadas a morte celular por apoptose, no estresse oxidativo e nas vias das MAPKs e da AKT.

4.1.4.1 Efeitos sobre as vias de apoptose

Os dois galatos testados, G8 e G12, promoveram aumento significativo da atividade da caspase-3 nos tempos iniciais de 15 minutos e 1 hora de incubação. A partir de 2 horas até 24 horas de incubação não ocorreu modificação da atividade da protease em relação ao controle sem tratamento (FIGURA 20).

Além da ativação da caspase-3, o tratamento com o G8 e o G12 nas células B16F10 resultou também na perda do potencial de membrana mitocondrial, como pode ser observado na Figura 21 por meio da diminuição na intensidade da razão entre a fluorescência vermelha e a verde. Este resultado sugere o envolvimento da via intrínseca da apoptose no mecanismo de morte por estes galatos.

Resultados

Foi avaliada, ainda, a expressão do Fas e das proteínas Bcl-2 e Bax nas células B16F10 em resposta ao tratamento com 50 μM do G8 e do G12. Os resultados obtidos evidenciaram que o tratamento com os dois galatos, G8 e G12, não promoveu alterações na expressão do Fas, no entanto, aumentou de forma significativa a expressão da proteína pró-apoptótica Bax e diminuiu a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (FIGURA 22).

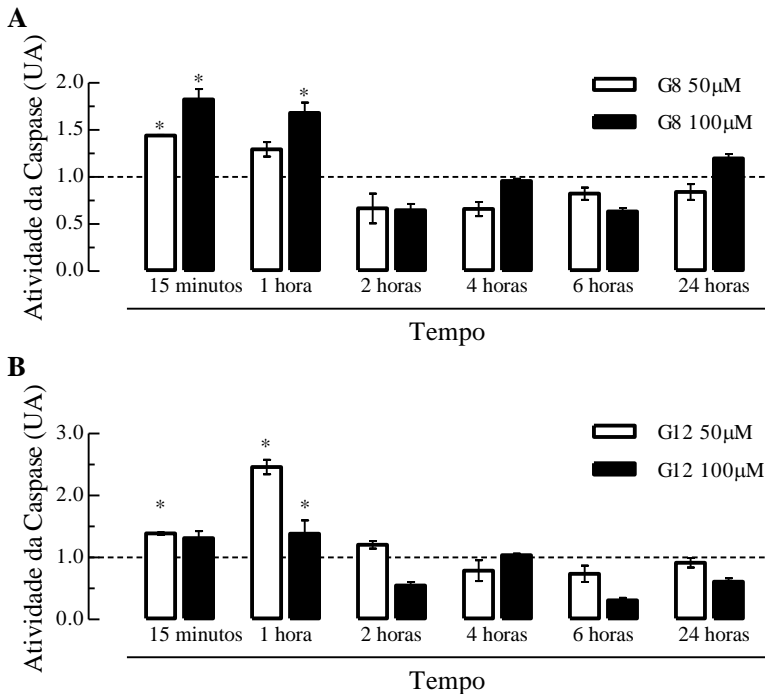


Figura 20: Avaliação tempo-resposta do efeito do G8 e do G12 sobre a atividade da caspase-3 nas células B16F10. As células (1×10^6) foram incubadas com 50 e 100 μM do G8 (A) e do G12 (B) por períodos de tempos que variaram de 15 minutos a 24 horas. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA) como Média \pm EPM ($n=3$). *indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle sem tratamento (linha tracejada) usando ANOVA seguida de teste de Dunnett.

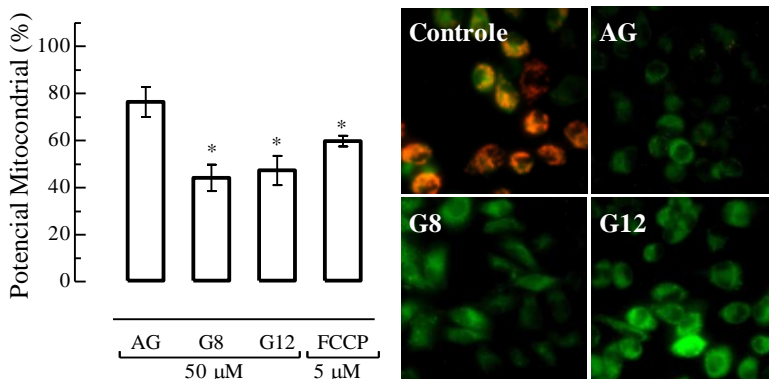


Figura 21: Efeito do AG e dos derivados G8 e G12 sobre o potencial mitocondrial nas células B16F10. As células (3×10^5) foram tratadas por 15 minutos e o FCCP utilizado como controle positivo. A despolarização mitocondrial é indicada pela diminuição na intensidade da razão entre a fluorescência vermelha e a verde. Os resultados estão expressos em percentual em relação ao controle sem tratamento como Média \pm EPM (n=3). *indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle sem tratamento usando ANOVA seguida de teste de Dunnett.

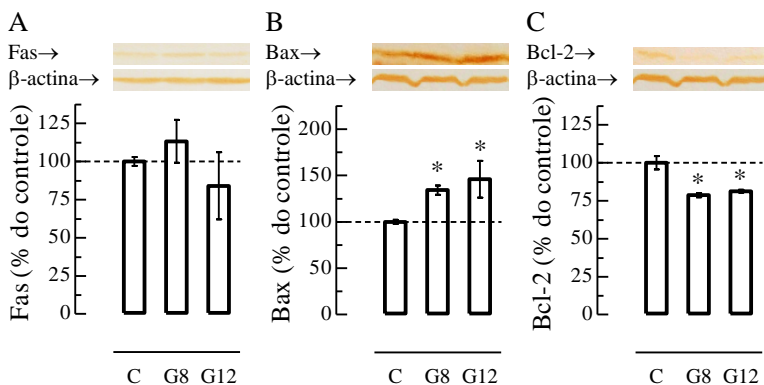


Figura 22: Efeito do G8 e do G12 sobre a expressão do Fas e das proteínas Bax e Bcl-2 nas células B16F10. As células (1×10^6) foram tratadas por 3 horas. (A) Fas, (B) Bax e (C) Bcl-2. Os resultados estão expressos como Média \pm EPM (n=3). * indica as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle sem tratamento, "C" ou linha tracejada, usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

4.1.4.2 Efeitos sobre o estresse oxidativo

O estresse oxidativo nas células B16F10 foi avaliado por meio da investigação dos efeitos do G8 e do G12 na lipoperoxidação, nas espécies reativas intracelulares e na atividade das enzimas antioxidantes CAT e GST.

O G8 promoveu aumento da lipoperoxidação e da geração de espécies reativas de forma significativa em relação ao controle sem tratamento, 34 ± 1 e 123 ± 11 %, respectivamente. O G12, embora tenha aumentado a geração de espécies reativas em 69 ± 8 %, não promoveu indução da lipoperoxidação (FIGURAS 23 e 24).

O G8 e o G12 também promoveram inibição da atividade da CAT, respectivamente, em 47 ± 11 e 30 ± 14 % em relação ao controle, e não alteraram a atividade da GST (FIGURA 25).

Pelos métodos utilizados não foi possível detectar a atividade das enzimas SOD, GPx e GR. No entanto, a ação do G8 e do G12 em induzir a lipoperoxidação, aumentar a geração de espécies reativas intracelulares e inibir a atividade da CAT sugere que ambos são capazes de promover estresse oxidativo nas células B16F10

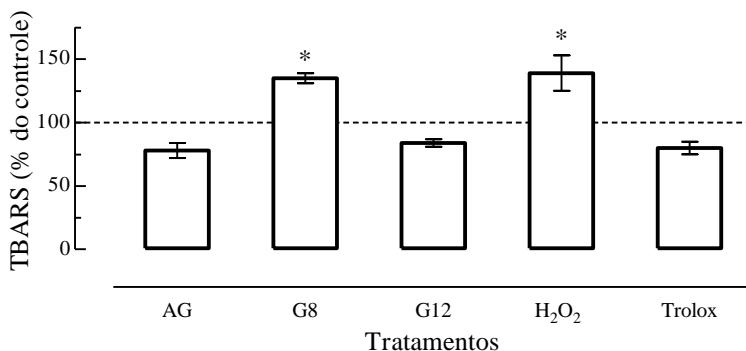


Figura 23: Avaliação da lipoperoxidação em células B16F10 tratadas com o AG e derivados G8 e G12. As células (3×10^6) foram incubadas por 3 horas com $50 \mu\text{M}$ do AG, G8 e G12 ou com 1 mM de H_2O_2 (controle positivo) ou $200 \mu\text{M}$ de Trolox (controle negativo). Os resultados estão expressos em percentual em relação ao controle sem tratamento ($218 \pm 36 \text{ nmol/mg}$ de proteína) como Média \pm EPM ($n=3$). *indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle sem tratamento (linha tracejada) usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

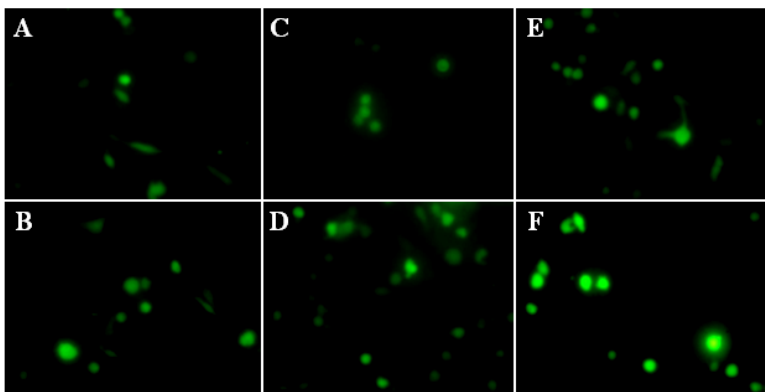
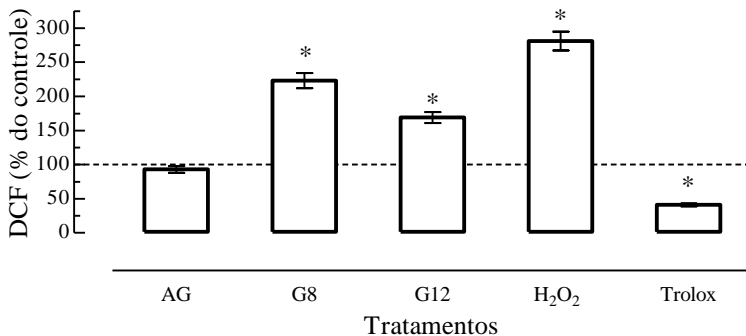


Figura 24: Avaliação das espécies reativas intracelulares nas células B16F10 tratadas com o AG e derivados G8 e G12. As células (3×10^5) foram incubadas por 3 horas com 50 μM do AG, G8 e G12 ou com 1 mM de H_2O_2 (controle positivo) ou 200 μM de Trolox (controle negativo). A geração de espécies reativas foi avaliada em espectrofluorímetro e em microscópio de fluorescência, por meio da sonda diacetato de diclorofluoresceína (DCFH₂-DA, Invitrogen, USA). (A) controle sem tratamento, (B) AG, (C) Trolox, (D) H_2O_2 , (E) G8, (F) G12. Os resultados estão expressos em percentual em relação ao controle sem tratamento como Média \pm EPM ($n=3$). *indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle sem tratamento (linha tracejada) usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

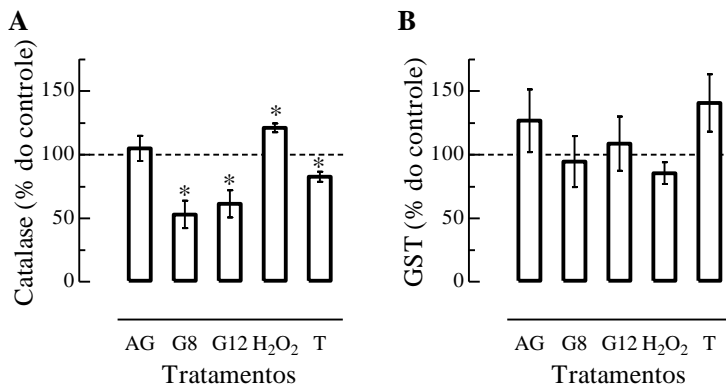


Figura 25: Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes CAT e GST nas células B16F10 tratadas com o AG e derivados G8 e G12. As células (3×10^6) foram incubadas por 3 horas com 50 μM do AG, G8 e G12 ou com H_2O_2 (1 mM) ou Trolox (200 μM), utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. As atividades enzimáticas foram avaliadas espectrofotometricamente considerando o consumo de H_2O_2 (CAT) ou a oxidação do DTNB (GST). Os resultados estão expressos em percentual em relação ao controle sem tratamento como Média \pm EPM ($n=3$). (A) Catalase, controle = $8,8 \pm 0,9$ $\mu\text{mol}/\text{minuto}/\text{mg}$ de proteína; (B) GST, controle = 181 ± 10 $\mu\text{mol}/\text{minuto}/\text{mg}$ de proteína. *indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle sem tratamento (linha tracejada) usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

4.1.4.3 Envolvimento das vias das proteínas cinases ativadas por mitógenos e da proteína cinase serina/treonina ou proteína cinase B

O envolvimento das MAPKs e da proteína cinase serina/treonina (AKT) ou proteína cinase B (PKB) foi avaliado pela comparação dos efeitos do G8 e do G12 sobre a viabilidade celular no teste do MTT na presença e na ausência dos inibidores específicos relacionados anteriormente no delineamento experimental. Neste sentido, foi observada uma redução no efeito citotóxico do G12 na presença do inibidor da PI3K sugerindo o envolvimento da via da AKT no mecanismo de citotoxicidade do mesmo. Em relação ao G8, os inibidores testados não foram capazes de alterar o seu efeito citotóxico (FIGURA 26).

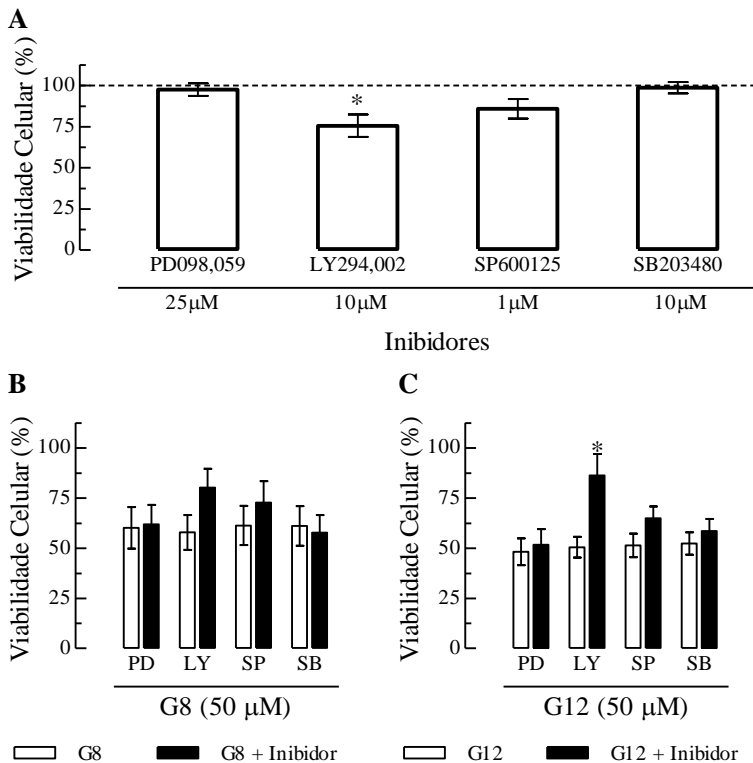


Figura 26: Avaliação comparativa da citotoxicidade do G8 e do G12 nas células B16F10 utilizando inibidores das vias das MAPKs e da AKT. As células (1×10^4) foram tratadas com 50 μM do G8 e G12 por 24 horas, associados ou não aos inibidores: PD098,059 25 μM (MEK1/2), LY294,002 10 μM (PI3K), SP600125 1 μM (JNK) e SB203480 10 μM (p38). A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. (A) Efeito dos inibidores sobre a viabilidade celular; (B) G8; (C) G12. Os resultados estão expressos em percentual em relação ao controle (linha tracejada) como Média \pm EPM ($n=3$). *indica as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os efeitos do galato na presença e na ausência do inibidor usando teste t de Student.

4.1.5 Nanoformulações: caracterização e avaliação de potencial citotóxico

Foram avaliadas seis nanoformulações contendo nanopartículas de diferentes constituições sendo quatro lipídicas (M, C, U, e B) e duas poliméricas (PU, PU-PEG).

4.1.5.1 Caracterização das nanoformulações

As nanopartículas foram caracterizadas quanto a morfologia, tamanho, PDI e potencial zeta.

4.1.5.1.1 Morfologia das nanopartículas

A avaliação da morfologia das nanopartículas poliméricas por MET e por AFM revelou partículas esféricas e polidispersas (FIGURAS 27 e 28). Foi possível observar o recobrimento das PU pelo PEG, confirmando o sucesso na obtenção de partículas PU-PEG (FIGURA 27B). A avaliação morfológica da nanopartícula lipídica (M) por MET está apresentada na Figura 29.

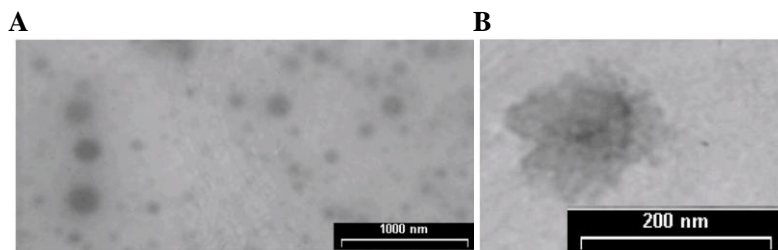


Figura 27: Imagens obtidas por MET de nanopartículas poliméricas de poliuretano. (A) PU; (B) PU-PEG.

Fonte: Zanetti-Ramos, 2010.

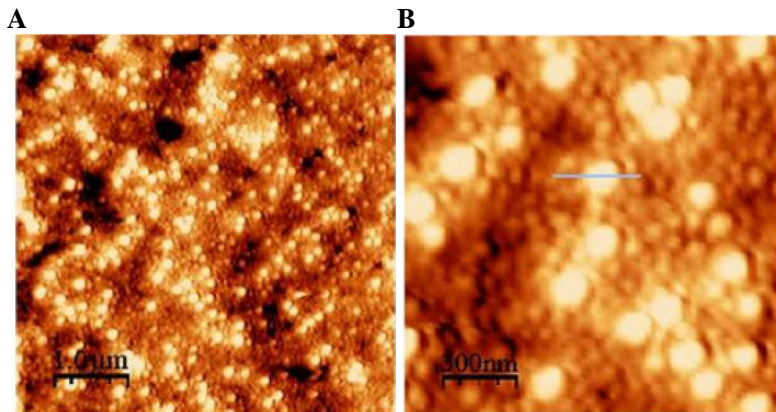


Figura 28: Imagens obtidas por AFM de nanopartículas poliméricas de poliuretano. Análise no modo contato de nanopartículas de poliuretano a 1 mg/ml depositadas em mica (A) 5 µm scan range (B) 1,5 µm scan range.
Fonte: Zanetti-Ramos, 2010.

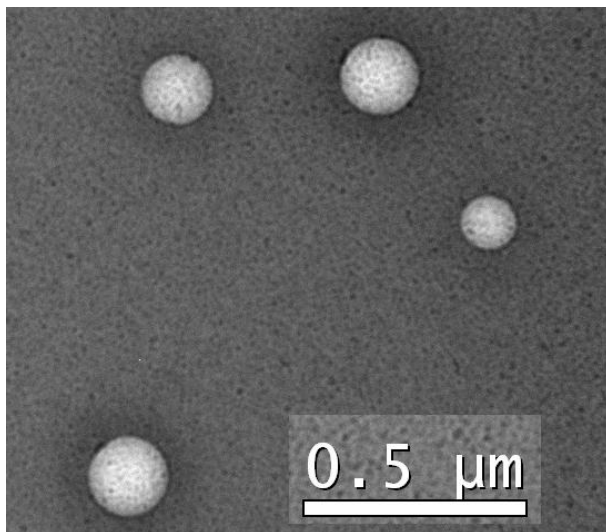


Figura 29: Imagens obtidas por MET da nanopartículas lipídica M.
Fonte: imagem cedida por Nanovetores-Departamento de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação

Resultados

4.1.5.1.2 Tamanho, índice de polidispersão e estabilidade das nanopartículas

A Tabela 3 demonstra os valores obtidos para o tamanho de partícula, PDI e potencial zeta das nanoformulações. As nanopartículas poliméricas PU e PU-PEG apresentaram um diâmetro médio de 250 nm e PDI de 0,4. Já as nanopartículas lipídicas M e C apresentaram diâmetro médio de 120 nm e um menor PDI. Quanto ao potencial zeta, pode ser observado um maior valor para as nanopartículas lipídicas.

Tabela 3: Tamanho de partícula, índice de polidispersão e valores de potencial zeta. Nanopartículas de diferentes constituições: quatro lipídicas (M, C, U, e B) e duas poliméricas (PU, PU-PEG).

Nanoformulação	Tamanho (nm)	Índice de Polidispersão (PDI)	Potencial zeta (mV)
PU	246 ± 7,9	0,40 ± 0,02	- 16 ± 2,5
PU-PEG	261 ± 5,4	0,39 ± 0,04	- 22 ± 5,3
M	148 ± 9,9	0,39 ± 0,03	-34 ± 3,9
C	108 ± 8,3	0,22 ± 0,02	- 25 ± 3,2
U	58 ± 4,2	0,18 ± 0,05	- 43 ± 2,7
B	62 ± 5,2	0,22 ± 0,04	- 42 ± 3,1

Os resultados apresentados representam a Média ± EPM (n=3)

4.1.5.2 Citotoxicidade das nanoformulações em células de linhagem não tumoral renal

O potencial citotóxico das nanoformulações foi avaliado nas células VERO e MDCK e está apresentado na Figura 30 por meio das curvas de viabilidade celular obtidas para as seis nanoformulações preparadas e previamente caracterizadas.

As nanoformulações lipídicas B e U apresentaram efeito citotóxico nas células das duas linhagens testadas em concentrações acima de 250 µg/ml e 500 µg/ml, respectivamente. Este resultado pode estar relacionado ao tamanho destas nanopartículas, cujo diâmetro médio foi menor que 100 nm (TABELA 3), em virtude de um maior poder de penetração e acessibilidade intracelular e intraorganelas destas partículas.

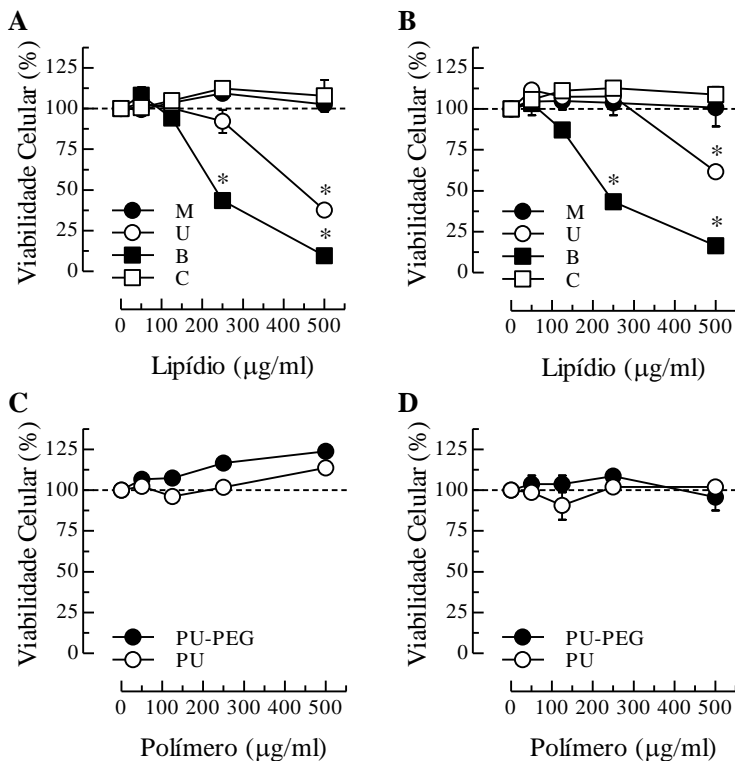


Figura 30: Avaliação do efeito de nanoformulações poliméricas e lipídicas sobre a viabilidade das células de duas linhagens não tumorais renais. As células (1×10^4) foram incubadas por 72 horas em concentrações crescentes das nanoformulações e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Nanoformulações lipídicas: (A) VERO, (B) MDCK; Nanoformulações poliméricas: (C) VERO, (D) MDCK. Os resultados estão expressos como Média \pm EPM (n=3). *indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle sem tratamento usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

4.1.5.3 Escolha da nanoformulação para a continuidade dos estudos

A nanoformulação M foi selecionada para a continuidade dos estudos com base nos critérios ausência de citotoxicidade e maior estabilidade e será denominada deste ponto em diante de NVM. Os motivos que levaram a exclusão das demais nanoformulações deste estudo estão descritos a seguir.

As nanoformulações B e U apresentaram efeito citotóxico nas células das duas linhagens testadas. A nanoformulação C, apesar de não demonstrar citotoxicidade, apresentou contaminação após 4 semanas de seu preparo, muito provavelmente porque não foram adicionados agentes preservantes nas formulações. Da mesma forma, as nanoformulações poliméricas de PU e PU-PEG apesar de não citotóxicas, mostraram-se instáveis durante o armazenamento a 5 °C.

4.1.5.4 Citotoxicidade da nanoformulação selecionada nas células de linhagem de melanoma e de macrófago murinos

A NVM em concentrações que variaram de 10 a 200 µg/ml, não revelou efeito citotóxico pelo teste do MTT após 48 horas de tratamento nas células das linhagens avaliadas, como demonstrado na Figura 31.

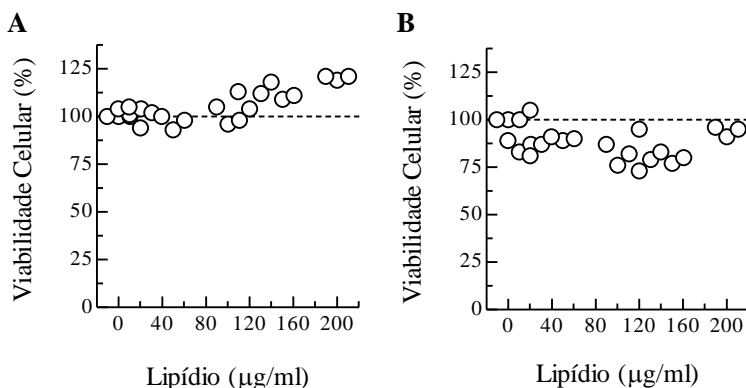


Figura 31: Ensaio de citotoxicidade da NVM nas células das linhagens B16F10 e J774. As células (1×10^4) foram incubadas por 48 horas em concentrações crescentes da NVM e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. (A) B16F10, (B) J774. Os resultados estão expressos em percentual do controle (linha tracejada) como Média \pm EPM (n=3).

Da mesma forma, o aumento do tamanho da nanopartícula de 140 para 1000 nm, mantendo a mesma composição, qualitativa e quantitativa, não alterou seu efeito sobre a viabilidade das células B16F10 (FIGURA 32).

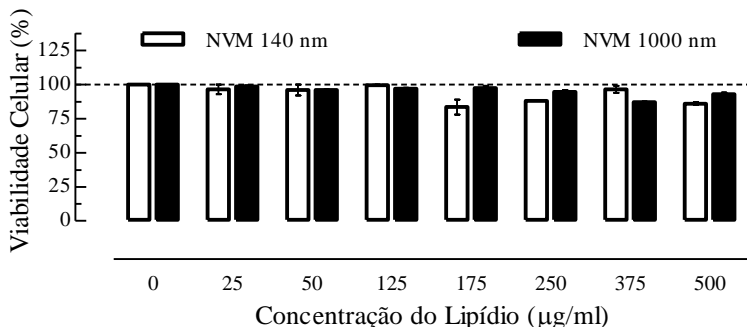


Figura 32: Avaliação do efeito do tamanho da NVM sobre a viabilidade em células da linhagem B16F10. As células (1×10^4) foram incubadas por 48 horas em concentrações crescentes da NVM em dois tamanhos (140 e 1000 nm) e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Os resultados estão expressos como Média \pm EPM (n=3).

4.1.6 Encapsulação do ácido gálico e dos derivados ésteres galato de octila e galato de dodecila na nanopartícula

Depois de comprovada a ausência de citotoxicidade da nanoformulação selecionada nas linhagens testadas, os procedimentos para encapsulação do AG e derivados G8 e G12 na NVM foram realizados, sendo as nanoformulações denominadas NVMAG, NVMG8 e NVMG12, respectivamente. A seguir, estão descritos os resultados referentes ao desenvolvimento da metodologia para quantificação do teor das substâncias incorporadas e à caracterização das nanopartículas contendo o AG e os derivados G8 e G12.

4.1.6.1 Curva analítica para quantificação dos galatos

A varredura em espectrofotômetro e os picos de absorção de soluções 1 mM do AG e derivados G8 e G12 em 100 % de DMSO estão apresentados na Figura 33 e no Quadro 7. Foi observado que o pico de absorção aproximado das três substâncias avaliadas, sem sobreposição aos picos do DMSO, ocorreu em 300 nm. As curvas analíticas obtidas em 300 nm para serem utilizadas nos cálculos posteriores da concentração de AG, G8 e G12 nas nanoformulações estão apresentadas na Figura 34.

Resultados

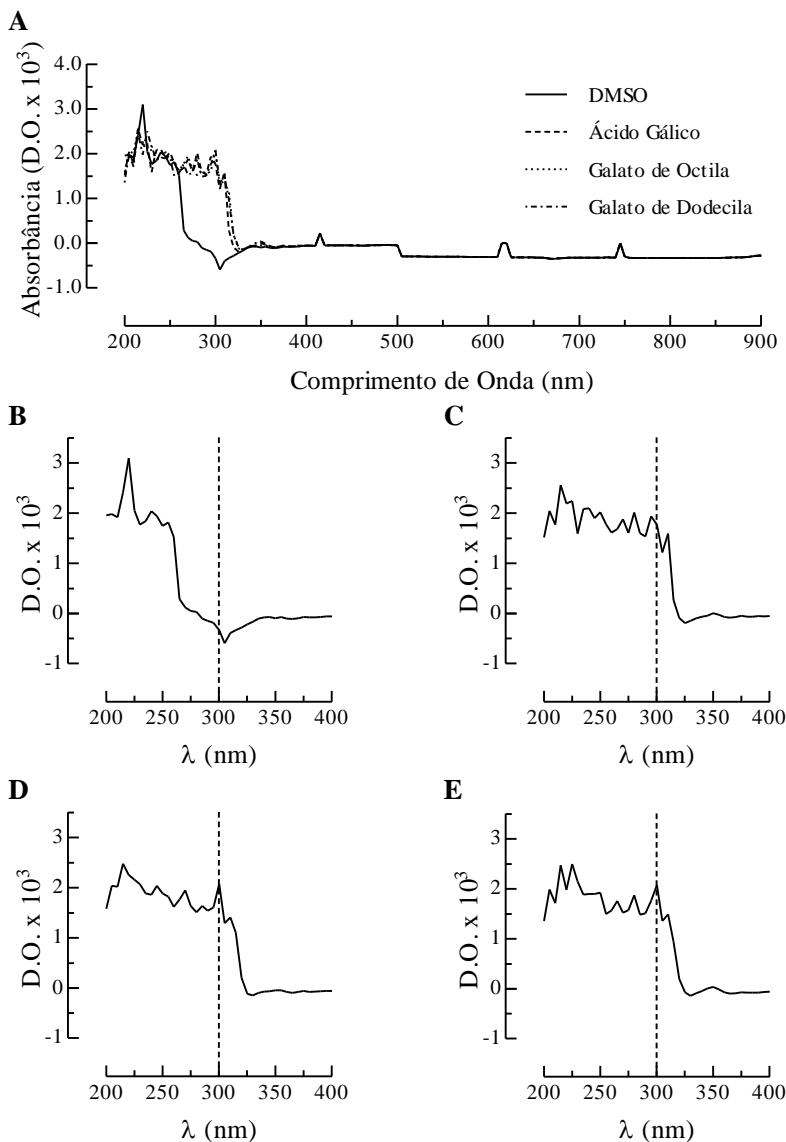
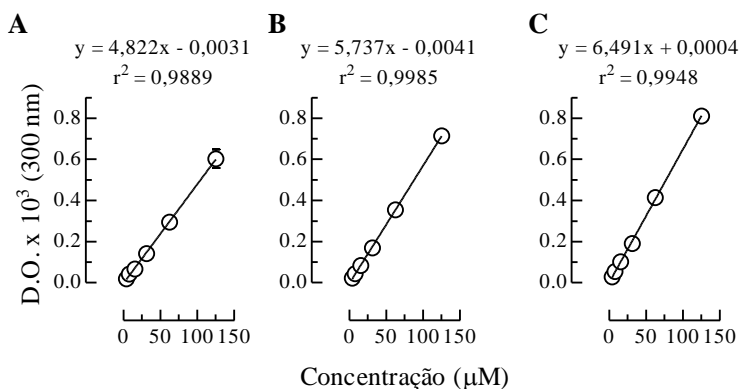


Figura 33: Espectro de absorção do AG e dos derivados G8 e G12 entre 200 e 900 nm. Foram avaliadas soluções de AG, G8 e G12 na concentração de 1 mM em 100 % de DMSO. (A) Espectro total; Picos de absorção: (B) DMSO, (C) AG, (D) G8 e (E) G12. O resultado representa a média de 3 experimentos.

Quadro 7: Picos de absorção do AG e dos derivados G8 e G12 após varredura espectrofotométrica entre 200 e 900 nm.

DMSO		AG		G8		G12	
λ (nm)	Abs	λ (nm)	Abs	λ (nm)	Abs	λ (nm)	Abs
415	0,223	415	0,223	415	0,223	415	0,223
240	2,037	310	1,588	300	2,073	350	0,038
220	3,094	295	1,938	270	1,946	310	1,487
-	-	280	2,013	245	2,036	300	2,073
-	-	270	1,877	215	2,475	280	1,871
-	-	215	2,558	-	-	265	1,758
-	-	-	-	-	-	225	2,498

**Figura 34:** Curvas analíticas do AG e dos derivados G8 e G12 em 300 nm. Foram avaliadas concentrações de AG (A), G8 (B) e G12 (C) que variaram entre 4 e 125 µM em 100 % de DMSO. O resultado representa a média de 3 experimentos.

4.1.6.2 Testes de encapsulação dos galatos na nanoformulação M

Os percentuais de encapsulação obtidos nos testes realizados com três diferentes concentrações do G8 estão apresentados na Tabela 4. A concentração que permitiu 100 % de encapsulação de todos os galatos testados foi a de 1,25 mg/ml, a qual foi utilizada nos estudos posteriores.

Resultados

Foi realizada ainda uma comparação entre as concentrações (1) teórica, (2) obtida na formulação total sem centrifugação e (3) obtida a partir da soma das concentrações do precipitado e do sobrenadante, cujo resultado está apresentado na Figura 35. A concentração teórica e a calculada por dois métodos distintos não diferem significativamente evidenciando que o procedimento de quantificação adotado foi adequado.

Tabela 4: Testes de encapsulação do AG e dos derivados G8 e G12 na NVM.

Nanoformulação: Concentração e Tipo	Concentração Galatos (mM)			Percentual de Encapsulação	
	Sobrenadante	Precipitado	Total		
5 mg/ml:	Branca	0,00	0,00	0,00	-
	G8	10,99	6,85	17,84	61,6
	G12	5,88	7,68	13,56	43,4
2,5 mg/ml:	Branca	0,00	0,00	0,00	-
	G8	6,84	0,00	6,84	100,0
	G12	5,45	3,78	9,23	59,1
1,25 mg/ml:	Branca	0,00	0,00	0,00	-
	AG	8,46	0,12	8,6	98,6
	G8	5,66	0,02	5,7	99,6
	G12	4,66	0,01	4,7	99,7

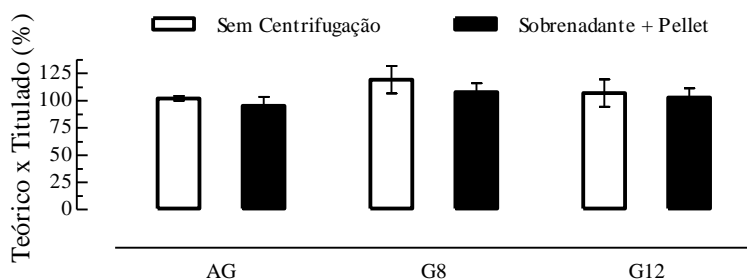


Figura 35: Comparação dos valores da concentração teórica com os valores obtidos por titulação da formulação total ou após separação por centrifugação. O resultado representa a média de 3 experimentos.

4.1.6.3 Caracterização das nanoformulações contendo os galatos

A Tabela 5 demonstra que a encapsulação do AG e dos derivados G8 e G12 não alterou as características da nanopartícula M, relacionadas ao tamanho, ao PDI e ao potencial zeta.

Tabela 5: Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta da NVM após encapsulação com o AG e com os derivados G8 e G12.

Nanoformulação	Tamanho (nm)	Índice de Polidispersão (PDI)	Potencial zeta (mV)
NVM	148 ± 10	0,36 ± 0,04	-34,1 ± 3,9
NVMAG	149 ± 10	0,29 ± 0,04	-28,9 ± 3,1
NVMG8	177 ± 15	0,27 ± 0,05	-43,0 ± 3,2
NVMG12	121 ± 6	0,37 ± 0,04	-38,3 ± 6,6

4.1.7 Citotoxicidade do ácido gálico e derivados ésteres galato de octila e galato de dodecila encapsulados na nanopartícula

As Figuras 36 a 38 apresentam a comparação entre o efeito citotóxico dos galatos livres ou encapsulados na NVM nas células da linhagem B16F10 após 24, 48 e 72 horas de incubação. Os resultados revelam que não há diferença significativa entre as curvas do efeito citotóxico dos galatos livres em comparação com o mesmo galato encapsulado nos três tempos avaliados.

Os valores de IC₅₀ e a ASC obtidos a partir da curva concentração-resposta do efeito citotóxico dos galatos nas células da linhagem VERO após 48 horas de incubação estão apresentados na Tabela 6. Da mesma forma observada para as células B16F10, não houve diferença entre os tratamentos com os galatos livres ou encapsulados em nanopartículas.

Para concluir esta análise, foi avaliado o efeito de 50 µM dos galatos sobre a viabilidade celular nas células B16F10, os quais foram administrados em três formas: (1) livre, (2) encapsulado na nanopartícula M ou (3) em solução com os demais componentes da nanopartícula após lise da mesma pela adição de DMSO a 100 %. Não foram observadas diferenças no efeito citotóxico dos galatos independente da forma de administração utilizada (FIGURA 39).

Resultados

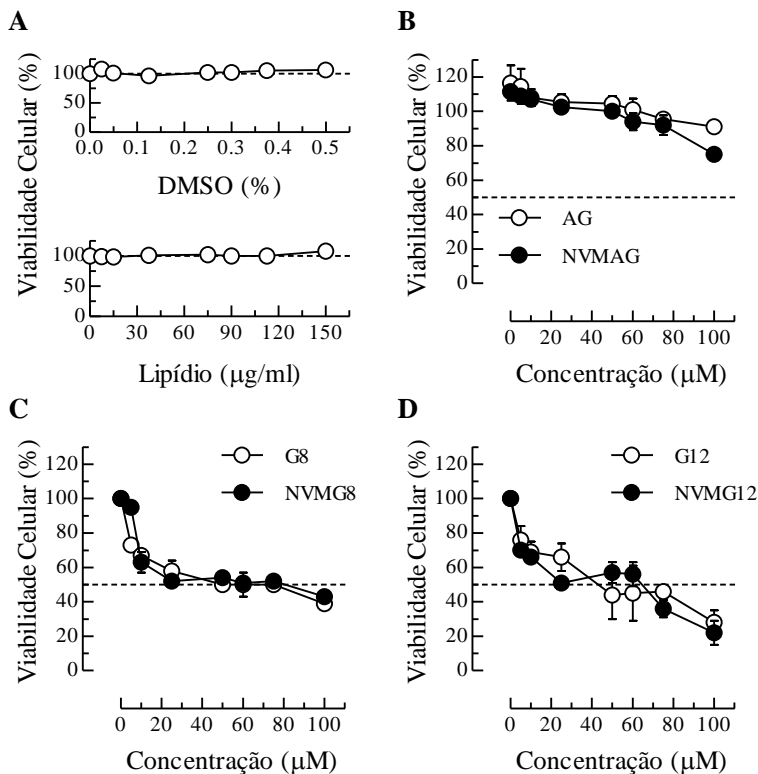


Figura 36: Comparação da citotoxicidade do AG e dos derivados G8 e G12 livres ou encapsulados na NVM após 24 horas de tratamento em células B16F10. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Curvas concentração-resposta: (A) controles (DMSO ou NVM branca), (B) AG e NVMAG, (C) G8 e NVMG8 e (D) G12 e NVMG12. A linha tracejada indica 50% de viabilidade celular. Os resultados estão expressos como Média \pm EPM ($n=3$).

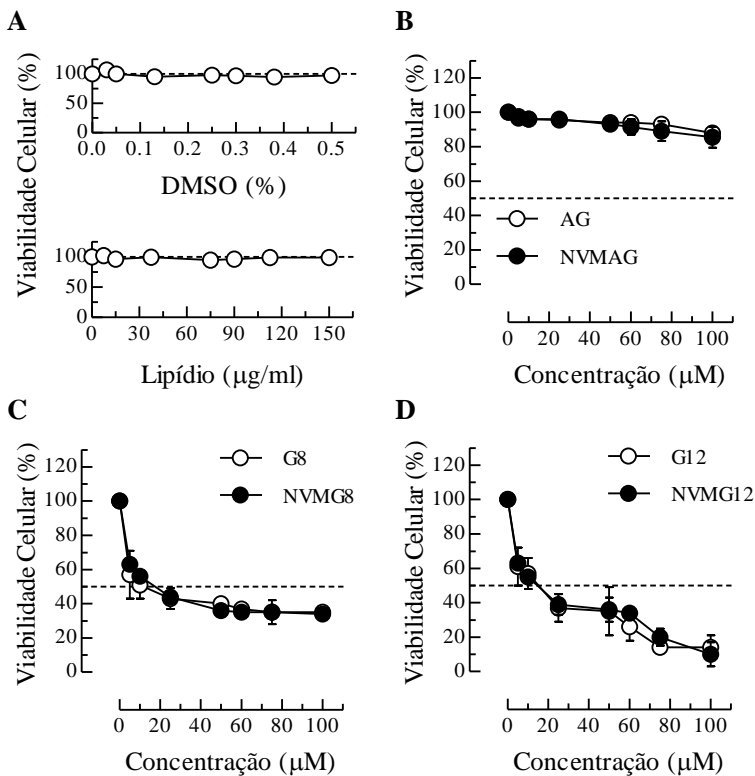


Figura 37: Comparação da citotoxicidade do AG e dos derivados G8 e G12 livres ou encapsulados na NVM após 48 horas de tratamento em células B16F10. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Curvas concentração-resposta: (A) controles (DMSO ou NVM branca), (B) AG e NVMAG, (C) G8 e NVMG8 e (D) G12 e NVMG12. A linha tracejada indica 50% de viabilidade celular. Os resultados estão expressos como Média \pm EPM (n=3).

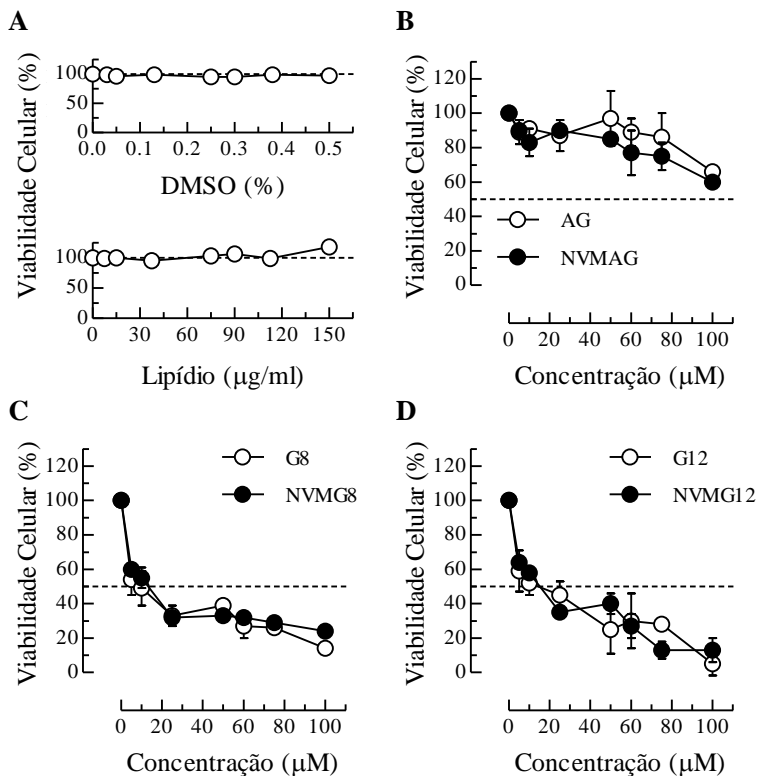


Figura 38: Comparação da citotoxicidade do AG e dos derivados G8 e G12 livres ou encapsulados na NVM após 72 horas de tratamento em células B16F10. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Curvas concentração-resposta: (A) controles (DMSO ou NVM branca), (B) AG e NVMAG, (C) G8 e NVMG8 e (D) G12 e NVMG12. A linha tracejada indica 50% de viabilidade celular. Os resultados estão expressos como Média \pm EPM (n=3).

Tabela 6: Valores de IC₅₀ e ASC da citotoxicidade induzida pelo AG e pelos derivados G8 e G12 livres ou encapsulados na NVM em células das linhagens B16F10 e VERO.

Tratamento	IC50 (µM)		ASC (% do controle)		Razão ASC
	B16F10 ^a	VERO ^a	B16F10	VERO	VERO/B16F10
AG					
Livre	>100	>100	9388 (85)	9221 (95)	1,12
Encapsulado	>100	>100	9233 (89)	9947 (102)	1,15
G8					
Livre	22,3 ± 1,5	72,2 ± 1,6	4205 (38)	6323 (65)	1,72
Encapsulado	23,2 ± 1,0	81,6 ± 2,5	4198 (40)	6505 (67)	1,66
G12					
Livre	14,5 ± 1,0	51,49 ± ,4	3258 (30)	5620 (58)	1,97
Encapsulado	16,2 ± 0,8	53,36 ± 1,2	3475 (33)	5668 (58)	1,75

Média ± EPM, n=3, ASC do controles (células sem tratamento): DMSO = 11038/9678 (B16F10/VERO); NVM = 10415/9731 (B16F10/VERO).

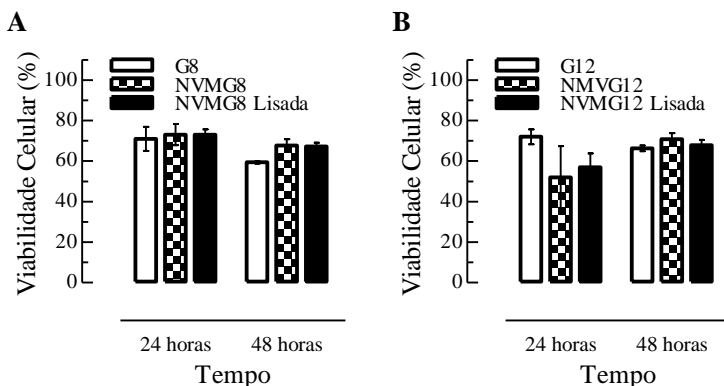


Figura 39: Avaliação comparativa da citotoxicidade dos galatos em três formas de tratamento nas células B16F10. As células (1×10^4) foram incubadas por 48 horas com 50 µM de G8 e G12 livres, encapsulados na nanopartícula (NVMG8 e NVMG12) ou em solução com os demais componentes da nanoformulação (NVMG8 lisada e NVMG12 lisada). A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. (A) G8, (B) G12. Os resultados estão expressos como Média ± EPM (n=3).

4.2 ESTUDOS *IN VIVO*

4.2.1 Toxicidade *in vivo* do galato de octila livre e encapsulado na nanopartícula lipídica

Os parâmetros de toxicidade avaliados incluíram avaliação da variação de peso corporal, exame anatomopatológico ante e pós-morte, hemograma e testes bioquímicos de funções hepática e renal, além da medida do estresse oxidativo no fígado.

A Figura 40 apresenta os dados referentes à variação do peso corporal revelando que os animais que receberam o G8 livre apresentaram uma redução significativa no ganho de peso corporal, indicando uma toxicidade sistêmica do G8. Nos animais que receberam a formulação NVMG8 este efeito não foi observado.

Além disso, durante o período de tratamento os animais que receberam o G8 livre apresentaram outros sinais de toxicidade sistêmica como endoftalmia, piloereção, caquexia, ptose e dispnéia. Estes efeitos não foram observados nos animais pertencentes aos demais grupos.

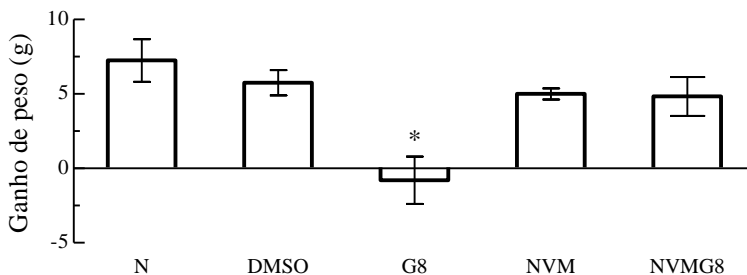


Figura 40: Variação do peso corporal dos animais tratados com o G8 livre ou encapsulado na NVM (NVMG8). N: não tratado; DMSO: DMSO 2 % em salina (controle G8 livre); NVM: nanopartícula branca (controle G8 encapsulado); G8: 12,5 mg/kg de G8 livre; NVMG8: 12,5 mg/kg de G8 encapsulado; N: animal não tratado. Os resultados estão expressos como Média \pm EPM (n=10). *indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle sem tratamento usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

Na avaliação histopatológica foi evidenciada a presença de degeneração maculosa no fígado e necrose tubular renal nos animais que foram tratados com o G8 livre, indicativos de toxicidade renal e hepática. Este efeito não foi observado nos animais que receberam tratamento com a formulação NVMG8 e nos grupos controles (FIGURA 41).

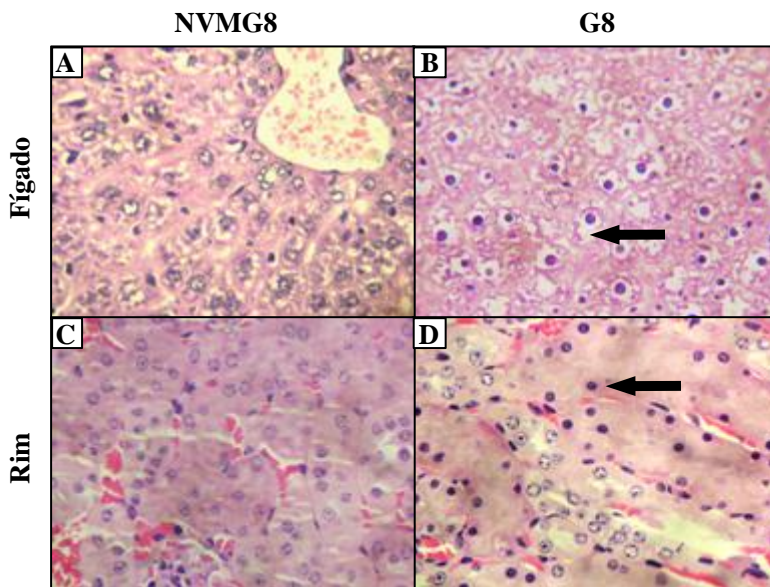


Figura 41: Avaliação histopatológica do fígado e do rim por meio de coloração com hematoxilina e eosina (aumento de 400x). (A) Fígado de animal tratado com NVNG8 sem alterações, (B) Fígado de animal tratado com G8 apresentando degeneração maculosa (seta), (C) Rim de animal tratado com NVNG8 sem alterações, (D) Rim de animal tratado com G8 apresentando necrose tubular (seta).

Os testes de bioquímica sérica estão de acordo com os resultados encontrados na avaliação histopatológica do rim e do fígado. Foram observados aumentos nas atividades das enzimas ALT e AST, assim como nas concentrações de uréia e creatinina no soro dos animais tratados com G8 livre, indicativos de lesão hepática e renal. Estas alterações não foram evidenciadas nos demais grupos, exceto pelo aumento da atividade da ALT nos animais que receberam NVMG8 (TABELA 7).

*Resultados***Tabela 7:** Hemograma e bioquímica sérica dos animais tratados com o G8 livre ou encapsulado na NVM (NMVG8).

Parâmetros	Grupos				
	N	DMSO	G8	NVM	NVMG8
Soro					
AST (UI/l)	127 ± 2	96 ± 7	271 ± 14*	100 ± 5	142 ± 12*
ALT (UI/l)	56,0 ± 4,5	45,0 ± 8,0	128 ± 6*	48,0 ± 4,5	68,0 ± 5,0
GGT (UI/l)	289 ± 27	376 ± 45	438 ± 56	333 ± 49	269 ± 22
Proteína Total (g/dl)	5,80 ± 0,23	6,35 ± 0,56	5,40 ± 0,27	6,26 ± 0,40	5,90 ± 0,30
Uréia (mg/dl)	41,0 ± 2,8	38,0 ± 2,6	49,7 ± 2,0*	40 ± 3,5	40,6 ± 2,6
Creatinina (mg/dl)	0,40 ± 0,03	0,50 ± 0,06	0,67 ± 0,08*	0,48 ± 0,02	0,51 ± 0,05
Sangue					
Eritrócitos (x10 ⁶ /mm ³)	3,55 ± 0,09	3,35 ± 0,14	3,40 ± 0,08	3,28 ± 0,05	3,60 ± 0,10
VCM (fl)	92 ± 4	90 ± 2	90 ± 2	88 ± 5	87,5 ± 3
HCM (pg)	29 ± 2	29 ± 3	30 ± 4	29 ± 2	29 ± 3
CHCM (g/dl)	32 ± 4	33 ± 3	32 ± 4	33 ± 2	32 ± 2
Hemoglobina (g/dl)	10,6 ± 0,65	10 ± 1	10,2 ± 2	9,6 ± 2	10,5 ± 2
Hematócrito (%)	32 ± 4	30,2 ± 2	30,6 ± 1	29 ± 3	31,5 ± 1
Leucócitos (mm ³)	4900 ± 200	3800 ± 196	4540 ± 348	3750 ± 469	4365 ± 323
Neutrófilos (%)	10 ± 2	8 ± 2	10 ± 2	6 ± 2	9 ± 2
Eosinófilos (%)	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	2 ± 1
Mononucleares (%)	88 ± 6	89 ± 5	81 ± 6	92 ± 4	88 ± 2

Abreviaturas: ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), GGT (gama glutamiltransferase), VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração da hemoglobina corpuscular média). N: não tratado; DMSO: DMSO 2 % em salina (controle G8 livre); NVM: nanopartícula branca (controle G8 encapsulado); G8: 12,5 mg/kg de G8 livre; NVMG8: 12,5 mg/kg de G8 encapsulado; N: animal não tratado. Os resultados estão expressos como Média ± EPM (n=10). *indicam as diferenças significativas (p<0,05) em relação ao controle sem tratamento usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

O G8 ainda foi capaz de induzir estresse oxidativo importante promovendo aumento da geração de espécies reativas no fígado dos animais quando administrado na forma livre. Além disso, independente da forma de administração do G8, livre ou encapsulado, foram observados nos grupos que o receberam, efeitos como a inibição da atividade da GPx, indução da atividade da GR e diminuição da concentração de GT (TABELA 8).

Tabela 8: Estresse oxidativo no fígado dos animais tratados com o G8 livre ou encapsulado na NVM (NVMG8).

Parâmetros	Grupos			
	DMSO	G8	NVM	NVMG8
DCF (pmol/mg proteína)	39 ± 6,7	109 ± 15,0 *	39 ± 14,0	57 ± 10,0
MDA (nmol/mg proteína)	374 ± 52	403 ± 61	278 ± 23	372 ± 52
CAT (mmol/min/mg proteína)	1405 ± 146	1236 ± 196	1348 ± 208	1442 ± 174
GPx (mmol/min/mg proteína)	3,3 ± 0,32	1,6 ± 0,16 *	3,0 ± 0,31	2,1 ± 0,18 *
GR (mmol/min/mg proteína)	185 ± 18	282 ± 16 *	194 ± 27	254 ± 20 *
GT (mM)	15,37 ± 1,79	6,31 ± 0,60 *	12,90 ± 2,20	5,39 ± 0,42 *

Abreviaturas: DCF (diclorofluoresceína), MDA (malondialdeído), CAT (catalase), GPx (glutaciona peroxidase), GR (glutaciona redutase), GT (glutaciona total). DMSO: DMSO 2 % em salina (controle G8 livre); NVM: nanopartícula branca (controle G8 encapsulado); G8: 12,5 mg/kg de G8 livre; NVMG8: 12,5 mg/kg de G8 encapsulado. Os resultados estão expressos como Média ± EPM (n=10). *indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle sem tratamento usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

4.2.2 Efeito antitumoral e antimetastático do galato de octila livre e encapsulado na nanopartícula em modelo de melanoma murino

A seguir estão descritos os resultados referentes à avaliação da atividade antitumoral do G8 nos dois modelos estudados: metástase e tumor subcutâneo.

4.2.2.1 Modelo de metástase

Ao término do tratamento, no exame ante-morte, foi observado que os animais submetidos à inoculação com as células B16F10 e que não receberam tratamento com G8 ou NVMG8 apresentavam tumores visíveis externamente. Dos animais tratados apenas um animal no grupo tratado com G8 apresentou um tumor na base da cauda, enquanto nenhum dos animais tratados com a NVMG8 apresentou tumores visíveis externamente (FIGURA 42).

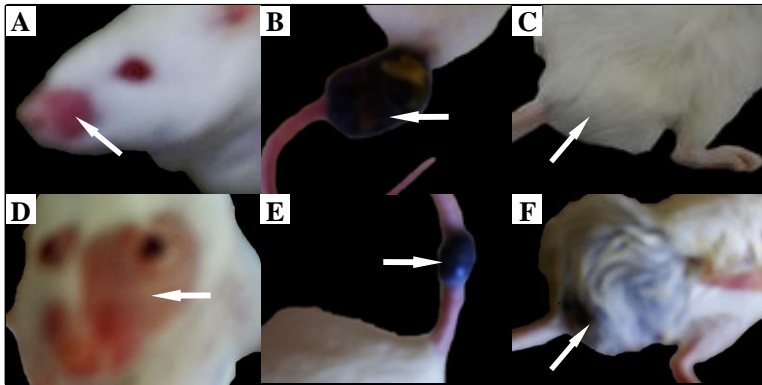


Figura 42: Lesões na face (A e D) e na cauda (B, C, E e F) dos animais inoculados com células da linhagem B16F10 para o desenvolvimento de modelo de metástase de melanoma murino. As imagens são representativas dos grupos controle sem tratamento.

Foram realizados exames macro e microscópico buscando nódulos pulmonares sugestivos de melanoma. Estes resultados estão apresentados na Figura 43. Nos grupos controles foi evidenciada a presença de nódulos macroscópicos nos pulmões (FIGURA 43D) assim como o aparecimento de grandes focos de metástases pigmentadas na microscopia do tecido pulmonar (FIGURA 43F). Os animais dos grupos tratados com G8 apresentaram focos macroscópicos de metástase pulmonar de forma mais discreta que a observada no grupo controle, como pode ser observado na Figura 43G. As alterações microscópicas pulmonares indicativas de focos de melanoma estavam presentes nos grupos G8 e NVMG8, no entanto os tumores apresentavam menor pigmentação em comparação à observada no grupo controle (Figuras 43I e 43L). Além disso, as lesões no grupo NVMG8 estavam restritas aos pulmões enquanto no grupo G8 foi observada uma metástase no estômago de um dos animais (FIGURA 44B).

A Figura 44A apresenta, a título de ilustração, o ponto de inoculação das células B16F10 na veia da cauda, evidenciando a proliferação das células tumorais de melanoma murino B16F10.

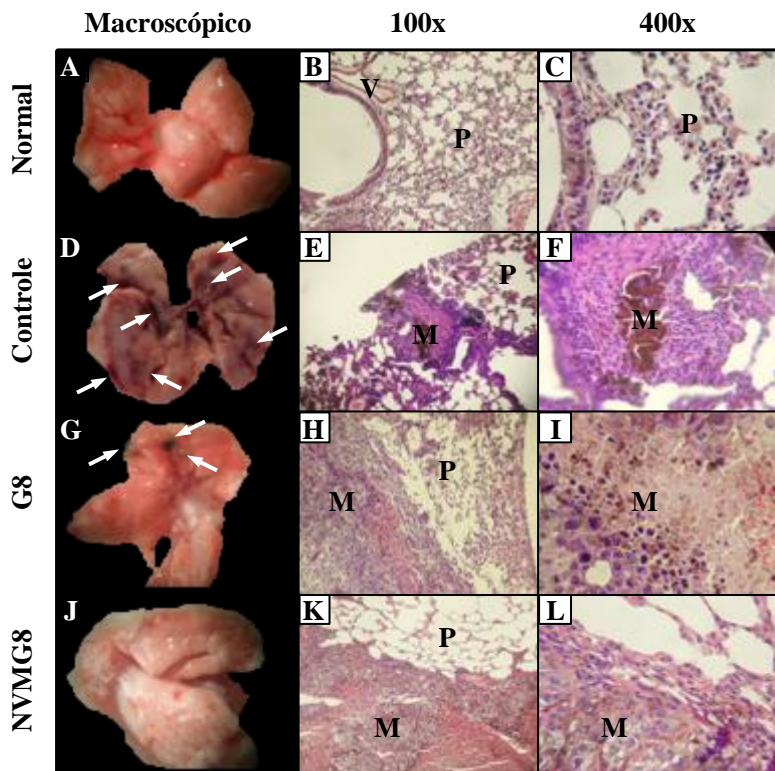


Figura 43: Aspecto macroscópico e avaliação histopatológica por meio de coloração com hematoxilina e eosina do pulmão dos animais inoculados com células da linhagem B16F10 para o desenvolvimento de modelo de metástase de melanoma murino. (A, B e C) Animais não inoculados: pulmão sem alterações, (D, E e F) Controle Inoculado: pulmão com diversos nódulos macroscópicos e apresentando grande massa tumoral pigmentada na microscopia (G, H e I) G8: pulmão com poucos nódulos macroscópicos e apresentando infiltração de células tumorais pouco pigmentadas na microscopia, (J, K e L) NVMG8: pulmão sem nódulos macroscópicos e apresentando infiltração de células tumorais pouco pigmentadas na microscopia. As imagens representam da esquerda para a direita, o aspecto macroscópico e o aspecto microscópico em aumentos de 100 x e de 400x. M: metástase, P: parênquima; V: vaso sanguíneo.

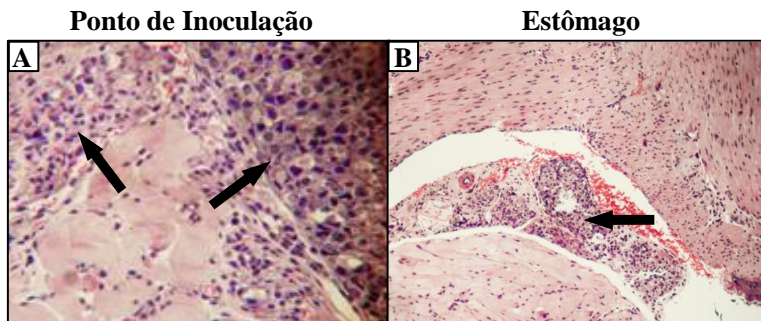


Figura 44: Avaliação histopatológica por meio de coloração com hematoxilina e eosina do ponto de inoculação e do estômago dos animais inoculados com células da linhagem B16F10 para o desenvolvimento de modelo de metástase de melanoma murino. (A) Controle inoculado: ponto de inoculação apresentando proliferação das células tumorais (setas) - aumento de 400x, (B) G8: Estômago apresentando foco de disseminação tumoral (seta) - aumento de 100x.

Em relação à avaliação do estresse oxidativo no pulmão, foi observado aumento da geração de espécies reativas e inibição da atividade da GPx no grupo tratado com o G8 livre, em comparação ao grupo controle inoculado. A comparação entre os animais inoculados e os não inoculados revelou que a presença do tumor levou a uma redução na atividade da CAT e na concentração de GT, exceto nos animais tratados com NVMG8 (TABELA 9).

O último parâmetro avaliado neste modelo foi a atividade da caspase-3, que como já mencionado, atua como agente efetor da morte celular pela via de apoptose podendo ser utilizado como um marcador de morte por esta via. Nos homogenatos de pulmão dos animais tratados com G8 e NVMG8 foi observado um aumento da atividade da caspase-3 (FIGURA 45). Este efeito está de acordo com os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* que mostram que o G8 é capaz de promover a fragmentação do DNA e ativação da caspase-3 sugerindo um mecanismo de indução da citotoxicidade nas células B16F10 relacionado às vias de morte celular por apoptose.

Tabela 9: Estresse oxidativo no pulmão dos animais tratados com G8 ou NMVG8 em modelo de metástase de melanoma.

Parâmetro	Grupo				
	NI	DMSO	G8	NVM	NVMG8
DCF (pmol/mg)	21 ± 0,40	34 ± 5,70	51 ± 1,83 **	26 ± 7,65	36 ± 5,00
CAT (mmol/min/mg)	503 ± 49	366 ± 35 *	307 ± 34 *	357 ± 40*	434 ± 11
GPx (mmol/min/mg)	1,10 ± 0,03	1,04 ± 0,08	0,67 ± 0,07 **#	1,06 ± 0,11	1,05 ± 0,09
MDA (nmol/mg)	377 ± 43	457 ± 63	476 ± 14	470 ± 67	488 ± 29
GT (mM)	11,6 ± 0,9	6,7 ± 0,7 *	7,4 ± 1,2 *	7,7 ± 1,2 *	9,7 ± 0,9

Abreviaturas: DCF (diclorofluoresceína), MDA (malondialdeído), CAT (catalase), GPx (glutaciona peroxidase), GR (glutaciona redutase), GT (glutaciona total). NI: não inoculado e não tratado; DMSO: DMSO 2 % em salina (controle G8 livre); NVM: nanopartícula branca (controle G8 encapsulado); G8: 12,5 mg/kg de G8 livre; NVMG8: 12,5 mg/kg de G8 encapsulado; N: não inoculado. Os resultados estão expressos como Média ± EPM (n=5). *indicam as diferenças significativas (p<0,05) em relação aos animais não inoculados (NI) ou #controle inoculado (C ou NVM) usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

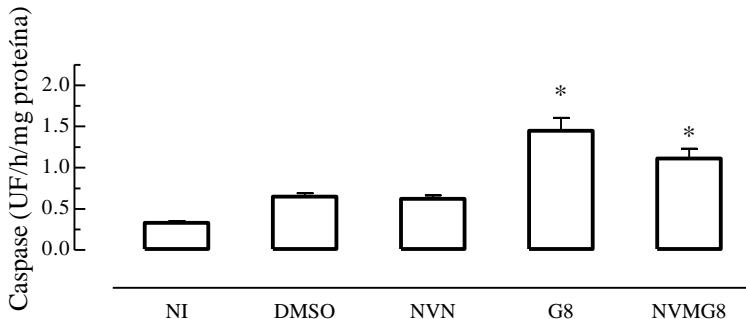


Figura 45: Atividade da caspase-3 em homogenatos do pulmão dos animais inoculados com células da linhagem B16F10 para o desenvolvimento de modelo de metástase de melanoma murino e tratados com o G8 ou NMVG8. NI: não inoculado e não tratado; DMSO: DMSO 2 % em salina (controle G8 livre); NVM: nanopartícula branca (controle G8 encapsulado); G8: 12,5 mg/kg de G8 livre; NVMG8: 12,5 mg/kg de G8 encapsulado; N: não inoculado. Os resultados estão expressos como Média ± EPM (n=5). *indicam as diferenças significativas (p<0,05) em relação ao controle sem tratamento usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

4.2.2.2 Modelo de tumor subcutâneo

A Figura 46 apresenta os valores referentes ao volume da massa tumoral, por meio dos parâmetros peso e tamanho, os quais demonstram que o tratamento com G8 promoveu uma inibição de 57 ± 11 % no crescimento tumoral em relação ao controle sem tratamento. O tratamento com NVMG não resultou em inibição do crescimento tumoral neste modelo de tumor subcutâneo.

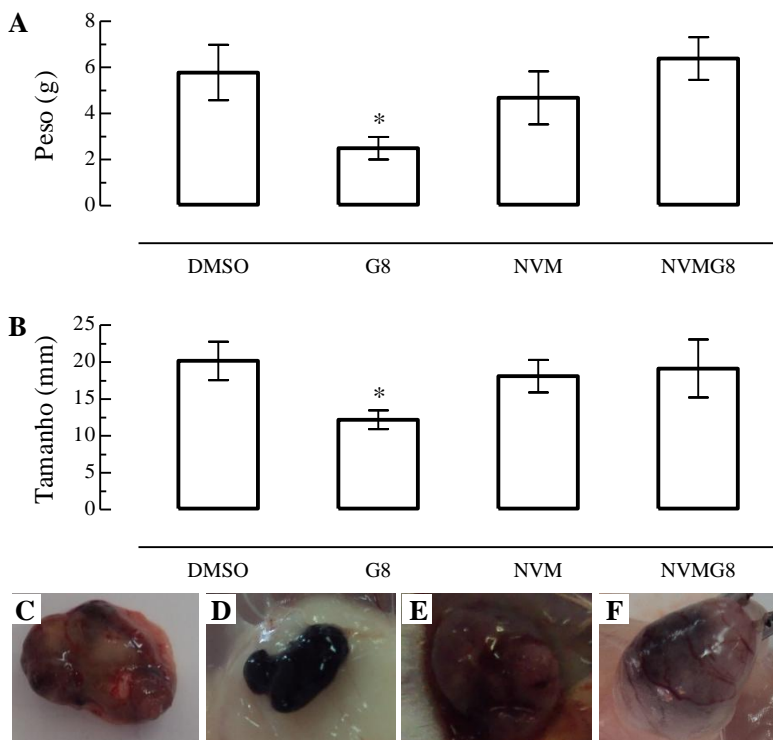


Figura 46: Tamanho e peso do tumor subcutâneo dos animais inoculados com células B16F10 e tratados com o G8 ou NVMG8. (A-B): peso e tamanho do tumor. (C-F): imagens representativas dos tumores: (C) DMSO, (D) G8, (E) NVM e (F) NVMG8. DMSO: DMSO 2 % em salina (controle G8 livre); NVM: nanopartícula branca (controle G8 encapsulado); G8: 12,5 mg/kg de G8 livre; NVMG8: 12,5 mg/kg de G8 encapsulado. Os resultados estão expressos como Média \pm EPM (n=5). *indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle sem tratamento usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

No entanto, apesar de apenas o G8 promover alteração na massa tumoral, os dois tratamentos, G8 e NVMG8 aumentaram a lipoperoxidação no fragmento de tumor analisado. O aumento correspondeu a $20,4 \pm 0,3$ e $22,6 \pm 0,7$ % para o tratamento com G8 e NVMG8, respectivamente (FIGURA 47).

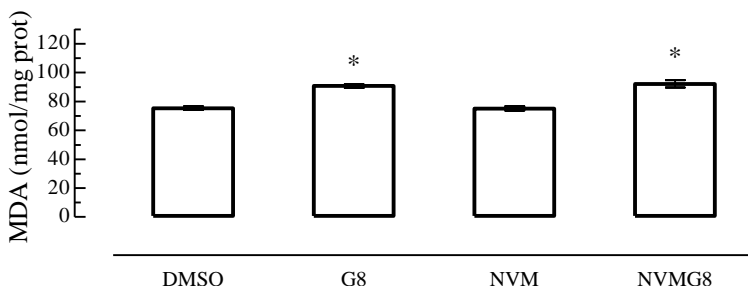


Figura 47: Lipoperoxidação nos homogenatos de fragmentos do tumor subcutâneo dos animais inoculados com células da linhagem B16F10 e tratados com o G8 ou NVMG8. DMSO: DMSO 2 % em salina (controle G8 livre); NVM: nanopartícula branca (controle G8 encapsulado); G8: 12,5 mg/kg de G8 livre; NVMG8: 12,5 mg/kg de G8 encapsulado. Os resultados estão expressos como Média \pm EPM (n=5). *indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle sem tratamento usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

A análise do teor de melanina e da atividade da tirosinase na massa tumoral revelou que os tratamentos com G8 e NVMG8 inibiram o teor de melanina na massa tumoral em $49,8 \pm 5$ e $20 \pm 0,5$ %, respectivamente (FIGURA 48A).

Quanto à atividade na tirosinase, o tratamento com a NVMG8 resultou em inibição de $43 \pm 0,7$ %, na atividade da enzima, conforme demonstra a Figura 48B, enquanto o tratamento com o G8 livre não promoveu alterações.

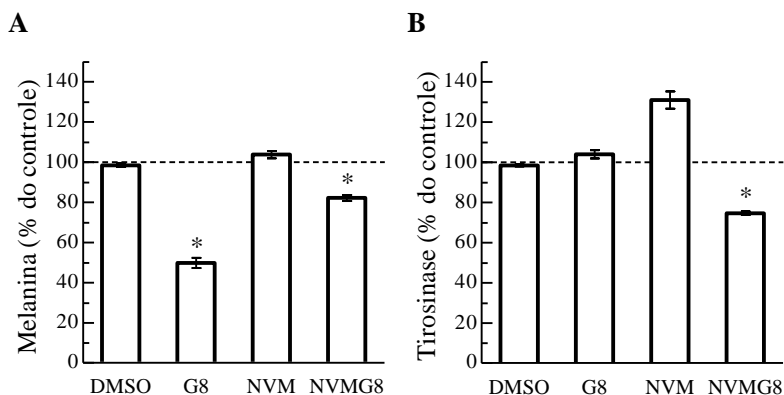


Figura 48: Atividade da tirosinase e teor de melanina no tumor subcutâneo dos animais inoculados com células da linhagem B16F10 e tratados com o G8 ou NVMG8. (A) Teor de melanina; (B) Atividade da tirosinase. DMSO: DMSO 2 % em salina (controle G8 livre); NVM: nanopartícula branca (controle G8 encapsulado); G8: 12,5 mg/kg de G8 livre; NVMG8: 12,5 mg/kg de G8 encapsulado. Os resultados estão expressos como Média \pm EPM (n=5). *indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle sem tratamento (linha tracejada) usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

5 DISCUSSÃO

O estudo da citotoxicidade é importante na compreensão dos mecanismos de ação das substâncias sobre as células e tecidos (WEYERMANN; LOCHMANN; ZIMMER, 2005). Entre os métodos de avaliação da citotoxicidade mais utilizados estão os ensaios com os sais de tetrazolium, o ensaio de captação do VN, a avaliação da liberação de LDH e o ensaio de citotoxicidade da SRB (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

Neste trabalho, com a avaliação mais abrangente do efeito citotóxico do G8 e G12 utilizando técnicas de viabilidade celular distintas, foi possível observar que ambos os galatos promovem alterações na atividade lisossomal e na permeabilidade da membrana celular de forma mais significativa do que a interferência na atividade mitocondrial apresentando valores de IC_{50} mais baixos, cerca de seis vezes para o VN e de três vezes para o LDH. Esta diferença pode ser devido ao fato de que a membrana plasmática, sendo o primeiro alvo exposto aos galatos pode ser atacada mais facilmente em comparação aos alvos internos como a mitocôndria. Este efeito também pode estar relacionado ao processo final da morte por apoptose observado em modelos *in vitro*, no qual, pela ausência das células fagocíticas no modelo, ocorre a perda da integridade da membrana plasmática.

Os diferentes mecanismos que resultam em morte celular podem influenciar a sensibilidade do ensaio de citotoxicidade utilizado. A fim de evitar subestimar ou superestimar a citotoxicidade de uma substância, incubações com várias concentrações por diferentes períodos de tempos são necessárias além da utilização de mais do que um tipo de ensaio. O ensaio de LDH, por exemplo, fornece respostas satisfatórias quando são utilizados agentes que danificam a membrana celular, no entanto podem não detectar o efeito citotóxico quando o agente tóxico influencia apenas as atividades intracelulares. Portanto, os ensaios do MTT e do VN podem ser úteis para indicar alguns desses danos internos (WEYERMANN; LOCHMANN; ZIMMER, 2005). Também é relatado que as células danificadas, principalmente nas fases iniciais da sinalização de morte por apoptose, são geralmente capazes de manter a sua capacidade de excluir o corante vital azul de Tripán e sendo assim marcadas muitas vezes como células viáveis (MORITA; ARIMOCHI; OHNISHI, 2003).

Foi possível observar ainda que, apesar das alterações nas funções celulares citadas anteriormente, a célula preservou a capacidade de se manter aderida à placa de cultura, efeito avaliado pela dosagem do conteúdo protéico por meio da SRB, em que se observou uma IC_{50} semelhante à obtida pelo teste do MTT. Além disso, a comparação entre o conteúdo protéico e de DNA nos permite sugerir que o G8 e o G12 não influenciaram na síntese de proteínas, tendo em vista que a diminuição de ambos, proteína e DNA, em resposta aos tratamentos foi equivalente, ou seja, a diminuição da quantidade de proteínas em resposta aos tratamentos ocorreu devido à diminuição da densidade celular em virtude do efeito citotóxico do G8 e do G12.

Outra questão diz respeito à forma como os galatos interagem com as células. Alguns autores investigaram se os galatos têm a capacidade de entrar nas células ou são capazes de interagir com as membranas lipídicas. Em um estudo comparando a atividade do G12 com seu precursor, o AG, que não apresenta a cadeia alquila hidrofóbica, foi sugerido que o grupo dodecil permitiu a partição do G12 nas membranas lipofílicas das células e organelas (KUBO et al., 2002). Os autores propuseram que os efeitos dos derivados n-alquil ésteres dos galatos como o G8 e o G12 seriam decorrentes da ligação do grupo pirogalol a porção hidrofílica da superfície da membrana e da interferência da porção alquila nas superfícies hidrofóbicas interiores da membrana (HSU; CHANG; CHANG, 2007). Conseqüentemente, o aumento do comprimento da cadeia alquila poderia aumentar a lipofilicidade e a mobilidade na bicamada lipídica perturbando a fluidez da membrana (FUJITA; KUBO, 2002; KUBO; XIAO; FUJITA, 2001). Além disso, o Log P, do G8 e DO G12 são 3,32 e 5,3, respectivamente (LEAL et al., 2009; ROSSO et al., 2006). Assim, ambos apresentam certo grau de hidrofobicidade, sendo teoricamente capazes de interagir com a membrana lipídica, embora nosso estudo não tenha abordado diretamente este aspecto.

Em relação ao tratamento quimioterápico, um fator importante é a elevada toxicidade dos fármacos disponíveis no mercado os quais interferem no processo de crescimento e divisão celular, destruindo as células tumorais, mas também agredindo as células normais que possuem características semelhantes. Desta forma, a quimioterapia está associada a efeitos colaterais que de maneira geral se caracterizam pelo desenvolvimento de mielossupressão, dano renal e hepático, além de náuseas e perda de peso, o que pode limitar a

aplicação clínica de alguns compostos com ação antitumoral (BAI et al., 2009).

Assim, investigação a respeito da eventual toxicidade assume muita importância principalmente quando se trabalha na investigação de potenciais novos fármacos. Como abordado anteriormente, durante a P&D de novos medicamentos os testes de eficácia e segurança em modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* são etapas fundamentais.

Neste aspecto, o estudo dos efeitos citotóxicos do G8 e do G12 nas linhagens celulares não tumorais renais em comparação à linhagem tumoral B16F10 realizados neste trabalho, revelaram uma menor citotoxicidade de ambos para as linhagens não tumorais. As células VERO são utilizadas em estudos de citotoxicidade com alguma frequência com as justificativas de fácil acesso e crescimento rápido (BOUAZIZ et al., 2006; VAUCHER; TEIXEIRA; BRANDELLI, 2010). No entanto, a linhagem VERO também já foi sugerida como um modelo adequado para estudo de nefrotoxicidade (DIAS et al., 2009) assim como a linhagem de epitélio renal canino MDCK (REZZANI et al., 2002).

Os aspectos relacionados à hepatotoxicidade *in vitro* não foram estudados neste trabalho em virtude de estudos anteriores em fatias de fígado de ratos não terem revelado efeitos citotóxicos do AG e dos derivados n-alkil-ésteres G8 e G12 em concentrações não superiores a 200 μM em teste de viabilidade celular pelo método do MTT (ROSSO et al., 2006).

Ainda em relação aos estudos de toxicidade *in vitro*, a encapsulação do G8 e do G12 no sistema nanoestruturado em questão não modificou o perfil da citotoxicidade de ambos descrito anteriormente para os galatos livres.

Alguns estudos toxicológicos mostram que o AG, bem como alguns de seus derivados não apresenta efeito tóxico quando administrado em roedores em doses que variam de 120 a 1000 mg/kg diariamente (VAN DER HEIJDEN; JANSSEN; STRIK, 1986; LU et al., 2006). No entanto, a avaliação da toxicidade do G8 *in vivo* em camundongos realizada neste trabalho, revelou uma ação tóxica do mesmo. Neste estudo *in vivo*, ao contrário do que foi observado *in vitro*, a encapsulação do G8 no sistema nanoestruturado resultou numa redução do efeito tóxico do G8 livre. Estes resultados são interessantes uma vez que os estudos sobre a utilização de nanopartículas na vetorização de fármacos apontam para uma ação mais seletiva, com um maior índice terapêutico e com menor

toxicidade (PINTO ALPHANDARY; ANDREMONT; COUVREUR, 2000).

A base dos estudos com substâncias antitumorais está direcionada a compostos capazes de promover a apoptose (ISUZUGAWA; INOUE; OGIHARA, 2001). Assim, a compreensão dos mecanismos responsáveis pela oncogênese do melanoma é crítica para o desenvolvimento de terapias bem-sucedidas. Um dos fatores que contribuem para a transformação das células tumorais é a desregulação das vias de apoptose. Segundo Russo et al. (2009), a desregulação da via intrínseca (dependente de mitocôndria) da apoptose consiste na base para a resistência do melanoma à quimioterapia e à morte por apoptose.

Embora alguns trabalhos mostrem que o AG e seus derivados n-alquil ésteres G8 e G12 possuem efeito citotóxico sobre várias linhagens tumorais, o mecanismo de ação dos mesmos ainda não foi esclarecido. Estudos anteriores do nosso grupo mostraram que as características do dano celular por apoptose, tais como a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA foram observadas em células de melanoma B16F10 tratadas com o G8 e G12 (LOCATELLI et al., 2009).

Neste trabalho nós investigamos adicionalmente, o efeito destes sobre a atividade da caspase-3 e foi demonstrado que ambos apresentam efeito indutor da atividade desta protease. A medida da atividade das caspases efetoras pode ser utilizada como ensaio auxiliar a análise da fragmentação do DNA com o objetivo de obter informações mais específicas sobre o mecanismo de morte celular por apoptose. Embora existam exceções em que a morte celular por apoptose pode ocorrer de forma independente da ativação de caspases (CARMODY; COTTER, 2000; KROEMER; MARTIN, 2005), a presença de atividade da caspase-3 pode ser utilizada como um marcador de apoptose (PORTER; JÄNICKE, 1999; GHAVAMI et al., 2009).

Além da fragmentação de DNA e da ativação de caspase a morte celular induzida pelos dois galatos, G8 e G12, envolveu a perda do potencial mitocondrial, o aumento da expressão da Bax e a diminuição da expressão da Bcl-2 e pareceu não envolver a ativação do receptor Fas.

O efeito inibitório sobre a Bcl-2 é particularmente importante, pois a alta resistência a apoptose mencionada na literatura para as células deste tipo tumoral parece envolver esta via. A superexpressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 foi observada em pacientes com

melanoma e em melanócitos, assim como foi demonstrado o envolvimento dessa alteração na progressão do melanoma e na quimiorresistência destas células (JI; FLAHERTY; TSAO, 2010).

O colapso da membrana mitocondrial em resposta a sinais de morte pode resultar na formação de um poro através do qual ocorreria a liberação de citocromo C para o citoplasma onde participaria do mecanismo da apoptose (BOSSY-WETZEL; GREEN, 1999).

Este processo pode ser regulado por membros da família Bcl-2. A Bcl-2 e a Bcl-XL são chamadas de reguladores anti-apoptóticos, pois inibem a apoptose prevenindo a liberação de citocromo C. Ao contrário, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas. A expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de EROS e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria (VANDER HEIDEN; THOMPSON, 1999). As proteínas Bax e Bcl-2 são capazes de formar homodímeros (Bax-Bax e Bcl-2-Bcl-2) e heterodímeros (Bax-Bcl-2), definindo o balanço pró-apoptótico ou anti-apoptótico na célula, no entanto, a Bax pode promover a apoptose pela interação com a mitocôndria, de forma independente da interação com proteínas anti-apoptóticas (PETROS; OLEJNICZAK; FESIK, 2004).

Juntas, estas observações indicam claramente que os dois galatos, G8 e G12, induzem danos apoptóticos às células de linhagem de melanoma murino B16F10 em cultura possivelmente pela via intrínseca ou mitocondrial, resultando na redução da viabilidade *in vitro* sob condições experimentais.

Em geral, a ocorrência da morte celular por apoptose é descrita principalmente como uma consequência dos insultos oxidativos e, portanto, parece razoável inferir que os efeitos citotóxicos do G8 e do G12 observados neste trabalho podem ser o resultado do dano oxidativo às células tendo em vista que tanto o G8 quanto o G12 foram capazes de promover a geração de espécies reativas e a inibição da atividade da CAT nas culturas de células B16F10. O G8 ainda promoveu indução de lipoperoxidação. Também já foi demonstrado que o efeito citotóxico do G8 e do G12 sobre a linhagem celular de melanoma murino B16F10 avaliado na presença de oxidantes e antioxidantes foi prevenido na presença dos antioxidantes (LOCATELLI et al., 2009).

Os estudos prévios do nosso laboratório demonstraram a atividade antioxidante (ROSSO et al., 2006) e citotoxicidade em células B16F10 (LOCATELLI et al., 2009) do AG e de quatorze

derivados n-alquil ésteres, com o mesmo número de substituintes hidroxila, variando apenas no comprimento da cadeia carbônica lateral. Todos os galatos testados, independentemente do comprimento de cadeia alquila, mostraram uma potente atividade antioxidante. No entanto, apenas quatro galatos mostraram efeito citotóxico nas células B16F10, indicando que o comprimento da cadeia alquila não estava diretamente relacionada à sua atividade antioxidante, mas que a atividade citotóxica estava relacionada ao comprimento da mesma.

A transferência de elétrons ou de átomos hidrogênio e a propriedade quelante de metais são os principais mecanismos propostos em estudos relacionados à ação antioxidante dos polifenóis. Especificamente em relação ao AG, alguns estudos relatam que sua excelente ação seqüestradora é consequência da doação do átomo hidrogênio (LEOPOLDINI; RUSSO; TOSCANO, 2011). No entanto, propriedades pró-oxidantes já foram relatadas para compostos fenólicos como o galato de propila, com comprovada ação antioxidante. Foi sugerido que esta propriedade pró-oxidante seria devido a reações de redução-oxidação entre os íons metálicos e os compostos fenólicos (ARUOMA et al., 1993;. JACOBI et al. , 1999; KOBAYASHI et al., 2004;. RODTJER; SKIBSTED; ANDERSEN, 2006).

Para o G8 já foram demonstradas na literatura tanto a atividade antioxidante (NAKAYAMA et al., 1993) como propriedades pró-oxidantes (ROY et al., 2000). Esta variação na ação ocorre dependendo de sua concentração e das condições celulares, considerando que o efeito antioxidante estaria relacionado com concentrações mais elevadas do G8, provavelmente devido à alta relação entre este e os íons metálicos intracelulares, como cobre e ferro. Este efeito foi demonstrado em um experimento em que baixas concentrações de galato de propila, em combinação com o cobre, induziram a peroxidação lipídica em fibroblastos humanos (JACOBI et al., 1999). Além disso, em outro estudo, baixas concentrações de aloína, um dos dois principais componentes da Aloe, exibiram efeito pró-oxidante devido ao aumento da geração de radicais hidroxilas por meio da reação de Fenton, em virtude da ação redutora do composto sobre os íons ferro. Ao contrário, em altas concentrações, a atividade antioxidante da aloína predominou sobre o seu poder redutor sobre os íons ferro, resultando na proteção do DNA (TIAN; HUA, 2005).

A produção de EROS e a elevação da concentração de cálcio intracelular foram demonstradas como sinais comuns no mecanismo de morte celular induzida pelo AG em diversas linhagens celulares (SAKAGUCHI; INOUE; OGIHARA, 1998). Também foi demonstrado que células que produziam menores quantidades de CAT eram mais sensíveis aos efeitos citotóxicos do AG o que poderia ser explicado pelo fato de o mecanismo de morte celular induzida pelo AG envolver a geração de H₂O₂ (ISUZUGAWA; INOUE; OGIHARA, 2001).

É descrito que concentrações elevadas ou moderadas de EROS são potencialmente citotóxicas bloqueando a proliferação celular por induzirem a morte celular por apoptose ou mesmo por necrose (DREHER; JUNOD, 1996). Esta indução de morte celular por apoptose em resposta ao aumento da produção de espécies reativas intramitocondriais, seguida pela formação de poros na mitocôndria, e pela conseqüente liberação de citocromo C foi descrita para diversos compostos naturais (LEE et al., 2001).

Outro fator que contribui para reforçar a hipótese de morte celular por apoptose induzida por ambos, G8 e G12, nas células de linhagem de melanoma foi a ocorrência nesta linhagem de aumento inicial nas concentrações de ATP seguida pela depleção em resposta ao tratamento com os galatos citados (LOCATELLI et al., 2009). Foi descrito anteriormente que durante o processo de apoptose é necessário um aumento inicial nas concentrações de ATP para formação do apoptossoma seguida por uma depleção destas concentrações após o rompimento da mitocôndria resultando na morte celular (SKULACHEV, 2006).

A hipótese de que o G8 e o G12 promovem a morte celular por apoptose em linhagem celular de melanoma murino por um efeito pró-oxidativo pode ser explicada pela capacidade de indução do fator NF- κ B demonstrada para estes galatos em estudos anteriores (LOCATELLI et al., 2009). A ativação do NF- κ B apresenta uma relação com o aumento da morte celular induzida por alguns fármacos, a qual poderia estar relacionada à ativação do receptor de morte celular Fas, bem como ao aumento de espécies reativas induzido por estes agentes (WANG; BALLATORI, 1998; BIAN et al., 2001). Também foi relatado que a ativação do NF- κ B pode causar a indução de apoptose mediada por p53 (RYAN et al., 2000). Apesar do fator de transcrição nuclear NF- κ B ativado poder promover a transcrição tanto de proteínas anti quanto pró-apoptóticas

foi descrito que o mesmo é ativado em condições pró-oxidantes (MEYSKENS JR et al., 1999). Sendo assim, seria possível inferir que a indução do NF- κ B promovida pelos ésteres do AG estaria diretamente relacionada à indução da geração de espécies reativas por estes compostos.

As mitocôndrias possuem um duplo papel, atuando tanto no metabolismo energético quanto na morte celular (REGULA; ENS; KIRSHENBAUM, 2003). A relação entre estresse oxidativo e apoptose por via mitocondrial tem sido investigada por muitos anos. Está bem descrito na literatura que as mitocôndrias são a principal fonte de EROS nas células (CHEN et al., 2003). Concomitantemente com a perda do potencial de membrana mitocondrial, observada em nosso trabalho, a indução da transição de permeabilidade mitocondrial por EROS libera vários fatores relevantes para a apoptose, tais como citocromo C, fator indutor de apoptose (AIF) e endonuclease G (EndoG) (CAI; JONES, 1998; VAN GURP et al., 2003).

Em estudos anteriores, os galatos testados, G8 e G12, promoveram diminuição na relação entre GSH e GSSG sendo possível supor que galatos seriam capazes de induzir um estresse oxidativo (LOCATELLI et al., 2008 e 2009). Alterações nas concentrações de GSH e no estado redox da mitocôndria associam-se com o estresse oxidativo induzido por vários agentes oxidantes (MCKERNAN; WOODS; LASH, 1991; BRODIE; REED, 1992).

Além da relação com o estresse oxidativo a depleção de glutatona pode ser relacionada ao fenômeno da resistência a múltiplos fármacos. Existe uma tendência à ocorrência de altas concentrações de glutatona intracelular nas células tumorais, possivelmente como uma resposta adaptativa ao metabolismo aumentado e às elevadas concentrações de espécies reativas de oxigênio. Nas células de melanoma B16F10 esta alta concentração de glutatona intracelular estaria relacionada à resistência dessas células à quimioterapia e à radioterapia sendo a depleção de glutatona descrita como uma alternativa para a sensibilização das células tumorais (BENLLOCH et al., 2005).

Outro mecanismo sugerido na literatura para indução de apoptose dependente de caspase seria a inibição da adenosina trifosfatase ativada por cálcio (Ca²⁺ATPase) em resposta ao aumento das espécies reativas resultando na liberação dos estoques de Ca²⁺ via mensageiros intracelulares como o trifosfato de inositol (IP3)

com o aumento do Ca^{2+} promovendo a ativação das caspases, induzindo a apoptose (ISUZUGAWA; INOUE; OGIHARA, 2001).

Foi demonstrado recentemente que mutações nos genes BRAF e NRAS, levando a uma via constitutiva das MAPKs assim como a atividade constitutiva na via da PI3K/AKT, são eventos críticos no crescimento e na progressão do melanoma (SMALLEY, 2010).

Nas células do melanoma as vias de sinalização celular Ras/Raf/MEK/ERK (MAPKs) e PI3K/AKT (AKT) são ativadas constitutivamente por diversos mecanismos. A atividade aumentada das vias das MAPKs previne a ocorrência da apoptose e induz a célula à progressão no ciclo celular. Da mesma forma, a ativação da AKT, pela deleção da PTEN, pode resultar na fosforilação e inativação da Raf levando a um decréscimo na ativação da MEK e da ERK a conseqüente perda de diferenciação ou senescência (RUSSO et al., 2009). Estudos adicionais ainda precisam ser realizados, mas o efeito citotóxico do G12 na linhagem de melanoma murino B16F10 foi diminuído na presença de inibidor específico da PI3K indicando um envolvimento da via de sinalização celular da AKT no mecanismo para indução deste efeito citotóxico.

Como mencionado anteriormente, estudos com o AG e derivados n-alquil ésteres realizados anteriormente no laboratório (LOCATELLI et al., 2008 e 2009) mostraram que os ésteres do AG que apresentam maior efeito antitumoral tanto em leucemia aguda quanto em melanoma são os derivados que contém entre oito e 14 carbonos na cadeia lateral. Verifica-se assim, que existe uma faixa de hidrofobicidade ideal para esta atividade, a qual está diretamente relacionada com as modificações químicas proporcionadas na molécula de AG, o que modifica suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, alterando sua afinidade por alvos celulares e a difusão através das membranas lipídicas. A hidrofobicidade das moléculas estudadas foi avaliada pelo valor de Log P (LEAL et al., 2009). O Log P é uma das principais propriedades físico-químicas de uma determinada molécula com potencial atividade medicinal, pois expressa sua lipossolubilidade relativa e, portanto auxilia na elucidação do mecanismo de ação. Estas características físico-químicas poderiam explicar o efeito citotóxico distinto dos derivados do AG aqui analisados em relação ao seu precursor, menos citotóxico para a linhagem tumoral estudada.

Em um estudo que comparou a atividade antioxidante do AG com o G12 foi demonstrado que esta poderia ocorrer por eliminação do radical ou pela prevenção, sendo que a atividade antioxidante

seria devida principalmente ao grupo pirogalol e que a adição da cadeia de carbono na molécula, independentemente do seu comprimento resultava no efeito preventivo (KUBO et al., 2002). Ainda neste estudo foi sugerido que a adição do grupo lipofílico dodecila ao AG pode permitir a partição do derivado formado em membranas lipofílicas de células e organelas, onde este éster presumivelmente exerce sua atividade antioxidante na proteção contra danos oxidativos.

Em outro estudo em que foi avaliada a ação antifúngica do G8 foi sugerido que este efeito seria decorrente da ligação do grupo pirogalol à porção hidrófila da superfície da membrana e da interferência da porção octila as superfícies hidrofóbicas interiores da membrana (HSU; CHANG; CHANG, 2007). Ainda em estudos de atividade antifúngica, foi demonstrado que a citotoxicidade de ésteres do AG foi reforçada pelo aumento do número de carbonos no radical alquila dos compostos (UOZAKI et al., 2007).

No entanto, alguns pesquisadores propõem que os derivados do AG com mais de 8 carbonos não conseguem entrar na célula, mas sim exercem sua atividade via receptores presentes na membrana celular (TAMMELA et al., 2004).

Demonstramos também, neste trabalho, por meio de um estudo *in vivo* com modelos de metástase pulmonar e de tumor subcutâneo de melanoma B16F10 em camundongos que o G8, além do efeito citotóxico *in vitro* nestas células, apresenta ação antitumoral *in vivo*.

No modelo de metástase, o tratamento com G8 apesar de não inibir completamente o aparecimento das metástases resultou em menor número e menor pigmentação das mesmas. Convém salientar que o estudo foi realizado com o objetivo de comparar o efeito do G8 administrado na forma livre ou encapsulado em uma nanopartícula lipídica. Apesar do efeito antitumoral parecer não ter sido alterado pela administração do G8 em uma nanoformulação, como discutido anteriormente, a encapsulação do galato na nanopartícula foi capaz de reduzir os efeitos tóxico gerais, renais e hepáticos do mesmo. Em relação ao possível mecanismo *in vivo* deste composto foi observado que a administração do G8 aos camundongos que desenvolveram o modelo de metástase de melanoma murino resultou em ativação da caspase-3 e indução de estresse oxidativo no pulmão, resultados que estão de acordo com os encontrados nos estudos *in vitro* com a linhagem B16F10. Estes resultados são interessantes uma vez que a principal causa de morte por melanoma é sua capacidade metastática

o que dificulta o tratamento quimioterápico (STANFORD et al., 2008).

No modelo de tumor subcutâneo o tratamento com G8 também demonstrou atividade antitumoral evidenciada pela capacidade de redução da massa tumoral em decorrência do tratamento. No entanto, este efeito foi evidenciado apenas para o G8 na forma livre. Em contrapartida, no estudo dos mecanismos de ação foi observado que ambas as formulações contendo G8 livre ou encapsulado promoveram aumento da lipoperoxidação e inibiram o teor de melanina nos tumores o que pode ser benéfico, pois, como comentado anteriormente, o acúmulo excessivo de melanina pode também causar melanoma (KAWANO et al., 2007).

Assim, para aumentar a confiabilidade de nossos resultados, usamos mais de um ensaio para determinar os efeitos do G8 e G12 sobre a viabilidade de células B16F10. Ambos, G8 e G12 promoveram alterações lisossomais e na permeabilidade da membrana plasmática em concentrações inferiores às necessárias para obter o mesmo efeito sobre as mitocôndrias, sendo a interação dos compostos com a membrana plasmática, provavelmente, responsável pelo desencadeamento da cascata de eventos que resultam na morte celular. Além disso, há evidências de que, pelo menos em condições particulares, a liberação de constituintes lisossomais para o citosol pode iniciar os eventos relacionados à apoptose. A liberação de constituintes lisossomais levaria a um aumento na produção de oxidantes mitocondriais seguida da ruptura lisossomal e liberação do citocromo C mitocondrial (ZHAO et al., 2003).

A morte celular por apoptose induzida por ambos, G8 e G12, nas células B16F10, que foi demonstrada em trabalhos anteriores, foi confirmada neste estudo por meio do efeito indutor do aumento da atividade da caspase-3 e da fragmentação do DNA observada na coloração com brometo de etídio e laranja de acridina. A perda do potencial de membrana mitocondrial, observada neste estudo, reflete uma disfunção mitocondrial, que foi acompanhado por uma elevação da expressão da proteína pró-apoptótica Bax e por uma inibição da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e parece ser devido a um efeito pró-oxidante do G8 e do G12 nas células de melanoma B16F10.

No estudo *in vivo* a encapsulação do G8 na nanopartícula lipídica resultou em uma diminuição da toxicidade geral, renal e hepática do mesmo, sem resultar, ao menos no modelo de metástase, em alteração na sua ação antitumoral. Assim, como nos estudos *in*

vitro, o G8 promoveu, *in vivo*, indução de estresse oxidativo pulmonar e ativação de caspase-3, além da inibição da concentração de melanina e indução de lipoperoxidação no tumor subcutâneo.

Alguns estudos sugerem que alteração no estado redox intracelular pode interferir com a atividade proliferativa das células tumorais e, assim, fornecer um alvo para fins terapêuticos (ATTENE-RAMOS et al., 2005; ABDAL DAYEM et al., 2010; VIEIRA; ALVE; VERCELLI, 2011). Neste sentido, a associação dos galatos, particularmente do G8 encapsulado na nanopartícula M, poderia ser uma alternativa a ser estudada para uma melhor atividade dos quimioterápicos em uso clínico no tratamento do melanoma.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos podemos inferir o que segue:

- Os dois galatos, G8 e G12, promoveram fragmentação do DNA e apresentaram efeito citotóxico, com IC_{50} inferior a $50 \mu M$ após 24 horas de incubação e menor que $20 \mu M$ após 48 horas, nas células B16F10.

- Os dois galatos, G8 e G12, apresentaram uma menor citotoxicidade para as linhagens não tumorais VERO e MDCK em comparação ao efeito citotóxico nas células B16F10.

- O efeito citotóxico dos dois galatos, G8 e G12, no teste do MTT ocorreu a partir de 24 horas de incubação com a IC_{50} nas células B16F10.

- Os dois galatos, G8 e G12, promoveram alterações na atividade lisossomal e na permeabilidade da membrana plasmática das células B16F10 de forma mais significativa do que a interferência na atividade mitocondrial.

- Os mecanismos de citotoxicidade do G8 e do G12 nas células B16F10, relacionados às vias de apoptose, envolveram ativação da caspase-3, indução de perda do potencial mitocondrial, aumento da expressão da Bax e inibição da expressão da Bcl-2 e não alteraram a expressão do receptor Fas.

- O G8 promoveu estresse oxidativo nas células B16F10 aumentando a lipoperoxidação, gerando espécies reativas e inibindo a atividade da CAT.

- O G12 promoveu geração de espécies reativas e inibição da atividade da CAT nas células B16F10.

- O efeito citotóxico do G12 nas células B16F10 foi menor após a inibição da via da AKT.

- Durante o processo de seleção da nanoformulação para a encapsulação dos galatos os principais motivos de exclusão foram a presença de efeito citotóxico, a falta de estabilidade e a tendência à contaminação por agentes microbianos.

- Os ensaios de encapsulação dos galatos na nanoformulação M resultaram em uma eficiência de encapsulação próxima a 100 %.

- O efeito citotóxico do G8 e do G12 nas células de melanoma B16F10 e nas células não tumorais renais VERO são semelhantes, independente de estarem livres ou encapsulados na nanopartícula, sendo as células VERO menos sensíveis.

- O G8 apresentou toxicidade renal e hepática, induziu estresse oxidativo no fígado e promoveu perda de peso quando administrado a camundongos, sendo estes efeitos reduzidos pela encapsulação do mesmo na nanopartícula.

- No modelo de metástase pulmonar em camundongos, o tratamento com o G8 promoveu uma diminuição na ocorrência de metástases e uma menor pigmentação das mesmas.

- A administração do G8, tanto na forma livre quando encapsulada em nanopartícula sólida, aos camundongos que desenvolveram o modelo de metástase de melanoma murino resultou em ativação da caspase-3 e indução de estresse oxidativo no pulmão.

- A administração do G8 aos camundongos que desenvolveram o modelo subcutâneo de melanoma murino resultou em diminuição da concentração de melanina e na indução de lipoperoxidação no tumor.

7 PERSPECTIVAS

Até o momento este trabalho proporcionou algumas conclusões pertinentes, no entanto alguns estudos ainda podem ser realizados para elucidar os mecanismos intracelulares envolvidos nos efeitos dos derivados do AG assim como a forma de interação entre os galatos e as células.

Nos estudos *in vivo* a avaliação dos aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos do G8 também é de extrema importância.

Outro aspecto que precisa ser avaliado diz respeito ao perfil de liberação dos galatos a partir da nanopartículas lipídicas e os mecanismos envolvidos na diminuição da toxicidade do galato *in vivo* quando associado ao sistema nanoestruturado.

REFERÊNCIAS

ABDAL DAYEM, A. et al. Role of oxidative stress in stem, cancer, and cancer stem cells. **Cancers**, v. 2, n. 2, p. 859-84, 2010.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-6, 1984.

ANCEREWICZ, J., et al. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 25, n. 1, p. 113-20, 1998.

ANGELI, C.A.B., et al. Comparative study of the behavior and awareness of adolescents and adults about sun exposure [Estudo comparativo sobre o conhecimento e comportamento de adolescentes e adultos frente a exposição solar]. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 72, n. 3, p. 241-5, 1997.

AOKI, Y. et al. Melanogenesis inhibition by an oolong tea extract in B16 mouse melanoma cells and UV-induced skin pigmentation in brownish guinea pigs. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n. 8, p. 1879-85, 2007.

ARMSTRONG, B.K.; KRICKER, A. How much melanoma is caused by sun exposure. **Melanoma Research**, v. 3, n. 6, p. 395-401, 1993.

ARTS, I.C.W.; HOLLMAN, P.C.H.; KROMHOUT, D. Chocolate as a source of tea flavonoids. **Lancet**, v. 354, n. 9177, p. 488, 1999.

ARUOMA, O. et al. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1880-5, 1993.

ASHTON-PROLLA, P., et al. Clinical and molecular characterization of patients at risk for hereditary melanoma in Southern Brazil. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 2, p. 421-5, 2008.

ATTENE-RAMOS, M. S. et al. Temporal changes of multiple redox couples from proliferation to growth arrest in IEC-6 intestinal epithelial cells. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 289, n. 5, p. C1220-C1228, 2005.

- BAI, R.Z., et al. Suppression of lung cancer in murine model: Treated by combination of recombinant human endostatin adenovirus with low-dose cisplatin. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2009.
- BENLLOCH, M., et al. Acceleration of glutathione efflux and inhibition of γ - glutamyltranspeptidase sensitize metastatic B16 melanoma cells to endothelium-induced cytotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 8, p. 6950-9, 2005.
- BENNETT, B. L. et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 24, p. 13681-6, 2001.
- BEUTLER, E.; KELLY, B.; DURON, O. Improved method for determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-8, 1963.
- BHATIA, S.; TYKODI, S.S.; THOMPSON, J.A. Treatment of metastatic melanoma: An overview. **Oncology**, v. 23, n. 6, p. 488-96, 2009.
- BIAN, X., et al. NF- κ B activation mediates doxorubicin-induced cell death in n-type neuroblastoma cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 52, p. 48921-9, 2001.
- BIRD, R.P.; DRAPER, H.H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 299-305, 1984.
- BOATRIGT, K.M.; SALVESEN, G.S. Mechanisms of caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 725-31, 2003.
- BOO, J.H., et al. Accumulation of phosphorylated β -catenin enhances ROS-induced cell death in presenilin-deficient cells. **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, art. n. e4172, 2009.
- BOSSY-WETZEL, E.; GREEN, D.R. Apoptosis: Checkpoint at the mitochondrial frontier. **Mutation Research - DNA Repair**, v. 434, n. 3, p. 243-51, 1999.
- BOUAZIZ, C., et al. Cytotoxicity and related effects of T-2 toxin on cultured Vero cells. **Toxicon**, v. 48, n. 3, p. 343-52, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Inca, 2009

BREMER, E., et al. Targeted induction of apoptosis for cancer therapy: current progress and prospects. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 8, p. 382-93, 2006.

BRESSAC-DE-PAILLERETS, B., et al. Genetic and environmental factors in cutaneous malignant melanoma. **Biochimie**, v. 84, n. 1, p. 67-74, 2002.

BRODIE, A.E.; REED, D.J. Glutathione disulfide reduction in tumor mitochondria after t-butyl hydroperoxide treatment. **Chemico-Biological Interactions**, v. 84, n. 2, p. 125-32, 1992.

CAI, J.; JONES, D.P. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome C loss. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 19, p. 11401-4, 1998.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 14, p. 5475-80, 1975.

CARMODY, R.J.; COTTER, T.G. Oxidative stress induces caspase-independent retinal apoptosis *in vitro*. **Cell Death and Differentiation**, v. 7, n. 3, p. 282-291, 2000.

CAVALUZZI, M.J.; BORER, P.N. Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 1, p. e13, 2004.

CHAN, J.M., et al. Polymeric nanoparticles for drug delivery. **Methods in molecular biology**, v. 624, pp. 163-175, 2010.

CHEN, H.-M., et al. Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells. **Cancer Letters**, v. 286, n. 2, p. 161-71, 2009

CHEN, Q., et al. Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 38, p. 36027-31, 2003.

COSSARIZZA, A., et al. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate

- forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 197, n. 1, p. 40-5, 1993.
- CURTIN, J.F.; DONOVAN, M.; COTTER, T.G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal of Immunological Methods**, v. 265, n. 1-2, p. 49-72, 2002.
- DANIAL, N.N.; KORSMEYER, S.J. Cell Death: Critical Control Points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205-19, 2004.
- DE GAULEJAC, N.S.-C.; PROVOST, C.; VIVAS, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 425-31, 1999.
- DIAS, E., et al. Comparative study of the cytotoxic effect of microcistin-LR and purified extracts from *Microcystis aeruginosa* on a kidney cell line. **Toxicon**, v. 53, n. 5, p. 487-95, 2009.
- DIAS, N.; BAILLY, C. Drugs targeting mitochondrial functions to control tumor cell growth. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 1-12, 2005.
- DORA, C.L., et al. Evaluation of antimetastatic activity and systemic toxicity of camptothecin-loaded microspheres in mice injected with B16-F10 melanoma cells. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 22-31, 2005.
- DREHER, D.; JUNOD, A.F. Role of Oxygen Free Radicals in Cancer Development. **European Journal of Cancer**, v. 32, p. 1, p. 30-8, 1996.
- FERRARI JR., et al. Cutaneous melanoma: Descriptive epidemiological study. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 126, n. 1, p. 41-7, 2008.
- FINK, S.L.; COOKSON, B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 1907-16, 2005.
- FLOHE, L.; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 114-21, 1984.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in

hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171-7, 2006.

FUJITA, K. I.; KUBO, I. Antifungal activity of octyl gallate. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 193-201, 2002.

GALATI, G.; O'BRIEN, P.J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 287-303, 2004.

GARLAND, J.M.; HALESTRAP, A. Energy metabolism during apoptosis: Bcl-2 promotes survival in hematopoietic cells induced to apoptose by growth factor withdrawal by stabilizing a form of metabolic arrest. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 8, p. 4680-8, 1997.

GHAVAMI, S., et al. Apoptosis and cancer: Mutations within caspase genes. **Journal of Medical Genetics**, v. 46, n. 8, p. 497-510, 2009.

GIFTSON, J.S.; JAYANTHI, S.; NALINI, N. Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. **Investigational New Drugs**, v. 28, n. 3, p. 251-9, 2010.

GRANGE, F., et al. Comparison between familial and nonfamilial melanoma in France. **Archives of Dermatology**, v. 131, n. 10, p. 1154-9, 1995.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851-7. 2007.

GREENE, M.H. The genetics of hereditary melanoma and nevi: 1998 Update. **Cancer**, v. 86, supl. 8, p. 1644-57, 1999.

GU, F.X., et al. Targeted nanoparticles for cancer therapy. **Nano Today**, v. 2, n. 3, p. 14-21, 2007.

HAMM, C., et al. Biochemotherapy for the treatment of metastatic malignant melanoma: A systematic review. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, n. 2, p. 145-56, 2008.

HAN, R. Research and Development of Anticancer Drugs and Experimental Techniques, Peking Medical University Peking Union Medical College joint Publishing House, Beijing, 1997, pp. 395-9. In: CAO, D.-X., et al. Comparison of burst of reactive oxygen species and activation of caspase-3 in apoptosis of K562 and HL-60 cells induced by docetaxel. **Cancer Letters**, v. 214, n. 1, p. 103-13, 2004.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANS, M.L.; LOWMAN, A.M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, n. 4, p. 319-27, 2002.

HASLAM, E.; CAI, Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): Gallic acid metabolism. **Natural Product Reports**, v. 11, n. 1, p. 41-66, 1994.

HASLAM, G.; WYATT, D.; KITOS, P.A. Estimating the number of viable animal cells in multi-well cultures based on their lactate dehydrogenase activities. **Cytotechnology**, v. 32, n. 1, p. 63-75, 2000.

HILEMAN, E.O., et al. Intrinsic oxidative stress in cancer cells: A biochemical basis for therapeutic selectivity. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 53, n. 3, p. 209-19, 2004.

HODGSON, J. M. et al. Phenolic acid metabolites as biomarkers for tea- and coffee-derived polyphenol exposure in human subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 91, n. 2, p. 301-5, 2004.

HOGAN, S. et al. Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) wine grapes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 7, p. 1269-74, 2009.

HSU, F.-L.; CHANG, H.-T.; CHANG, S.-T. Evaluation of antifungal properties of octyl gallate and its synergy with cinnamaldehyde. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 4, p. 734-8, 2007.

HUNCHAREK, M.; CAUBET, J.F.; MCGARRY, R. Single-agent DTIC versus combination chemotherapy with or without immunotherapy in metastatic melanoma: A meta-analysis of 3273

patients from 20 randomized trials. **Melanoma Research**, v. 11, n. 1, p. 75-81, 2001.

HYOUDOU, K., et al. Inhibition of metastatic tumor growth in mouse lung by repeated administration of polyethylene glycol-conjugated catalase: Quantitative analysis with firefly luciferase-expressing melanoma cells. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 22, p. 7685-91, 2004.

INOUE, M., et al. Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 204, n. 2, p. 898-904, 1994.

INOUE, M., et al. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, n. 11, p. 1526-30, 1995.

ISUZUGAWA, K.; INOUE, M.; OGIHARA, Y. Ca²⁺ -dependent caspase activation by gallic acid derivatives. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 7, p. 844-7, 2001.

JACOBI, H. et al. Induction of lipid peroxidation in human fibroblasts by the antioxidant propyl gallate in combination with copper(II). **Toxicology Letters**, v. 110, n. 3, p. 183-90, 1999.

JAGAN, S., et al. Antiproliferative potential of gallic acid against diethylnitrosamine-induced rat hepatocellular carcinoma. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 319, n. 1-2, p. 51-9, 2008.

JEMAL, A., et al. Cancer statistics, 2009. **CA Cancer Journal for Clinicians**, v. 59, n. 4, p. 225-49, 2009.

JI, Z.; FLAHERTY, K.T.; TSAO, H. Molecular therapeutic approaches to melanoma. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, n. 2, p. 194-204, 2010.

KAWADA, M., et al. Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. **Anti-Cancer Drugs**, v. 12, n. 10, p. 847-52, 2001.

KAWANO, M. et al. Antimelanogenesis effect of Tunisian herb *Thymelaea hirsuta* extract on B16 murine melanoma cells. **Experimental Dermatology**, v. 16, n. 12, p. 977-84, 2007.

- KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183-8, 1976.
- KHAN, A.A. Intracellular mechanisms of apoptosis. **Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 4, p. 291-305, 2010.
- KOBAYASHI, H. et al. Metal-mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by gallic acid, a metabolite of antioxidant propyl gallate. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 558, n. 1-2, p. 111-20, 2004.
- KROEMER, G.; MARTIN, S.J. Caspase-independent cell death. **Nature Medicine**, v. 11, n. 7, p. 725-30, 2005.
- KUBO, I., et al. Antioxidant activity of dodecyl gallate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3533-9, 2002.
- KUBO, I.; CHEN, Q. X.; NIHEI, K. I. Molecular design of antibrowning agents: Antioxidative tyrosinase inhibitors. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 241-7, 2003.
- KUBO, I.; XIAO, P.; FUJITA, K. Antifungal activity of octyl gallate: Structural criteria and mode of action. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 3, p. 347-50, 2001.
- KUMAR, S. Caspase function in programmed cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 1, p. 32-43, 2007.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.
- LEAL, P.C., et al. Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 6, p. 1793-6, 2009.
- LEE, M.-G., et al. Costunolide induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition and cytochrome C release. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 3, p. 303-6, 2001.
- LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 288-306, 2011.

LI, L., et al. Antioxidant activity of gallic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. **Life Sciences**, v. 77, n. 2, p. 230-40, 2005.

LIN, Y. P. et al. Constituents from the Formosan apple reduce tyrosinase activity in human epidermal melanocytes. **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1189-99, 2007.

LOCATELLI, C. et al. Antimetastatic activity and low systemic toxicity of tetradecyl gallate in a preclinical melanoma mouse model. **Investigational New Drugs**, p. 1-10, 2011.

LOCATELLI, C., et al. Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 3791-9, 2008.

LOCATELLI, C., et al. Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. **Chemico-Biological Interactions**, v. 181, n. 2, p. 175-84, 2009.

LOWRY, O.H., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LU, Z., et al. Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. **Neurochemistry International**, v. 48, n. 4, p. 263-74, 2006.

LV, H.-F., et al. Inhibition of lung metastasis in mice by intravascular injection of dendritic cells and natural killer cells. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1709-15, 2009.

LV, N. et al. Effect of Angelica gigas extract on melanogenesis in B16 melanoma cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 20, n. 5, p. 763-7, 2007.

MACFARLANE, M., WILLIAMS, A.C. Apoptosis and disease: a life or death decision. **EMBO Reports**, v. 5, n. 7, p. 674-8, 2004.

MAMEDE, M.E.O.; CARDELLO, H.M.A.B.; PASTORE, G.M. Evaluation of an aroma similar to that of sparkling wine: Sensory and gas chromatography analyses of fermented grape musts. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 63-8, 2005.

- MCKERNAN, T.B.; WOODS, E.B.; LASH, L.H. Uptake of glutathione by renal cortical mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 288, n. 2, p. 653-63, 1991.
- MEKAPATI, S.B., et al. The role of hydrophobic properties of chemicals in promoting allosteric reactions. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 11, p. 3737-62, 2005.
- MEYSKENS JR., F.L., et al. Activation of nuclear factor- κ B in human metastatic melanoma cells and the effect of oxidative stress. **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 5, p. 1197-1202, 1999.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Indicadores e Dados Básicos - Brasil – 2009**. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br/idb>>. Acesso em: 30 outubro 2010.
- MITA, M.M.; MITA, A.C.; TOLCHER, A.W. Apoptosis: Mechanisms and implications for cancer therapeutics. **Targeted Oncology**, v. 1, n. 4, p. 197-214, 2006.
- MORITA, K.; ARIMUCHI, H.; OHNISHI, Y. *In vitro* cytotoxicity of 4-methylcatechol in murine tumor cells: Induction of apoptotic cell death by extracellular pro-oxidant action. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 1, p. 317-23, 2003.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MOUAWAD, R., et al. Treatment for metastatic malignant melanoma: Old drugs and new strategies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 74, n. 1, p. 27-39, 2010.
- MOUAWAD, R.; SPANO, J.-P.; KHAYAT, D. Old and new serological biomarkers in melanoma: Where we are in 2009. **Melanoma Research**, v. 20, n. 2, p. 67-76, 2010.
- NAKAGAWA, Y.; MOLDEÚS, P.; MOORE, G. Propyl gallate-induced DNA fragmentation in isolated rat hepatocytes. **Archives of Toxicology**, v. 72, n. 1, p. 33-7, 1997.
- NAKAYAMA, T. et al. The protective role of gallic acid-esters in bacterial cytotoxicity and sos responses induced by hydrogen-peroxide. **Mutation Research**, v. 303, n. 1, p. 29-34, 1993.

NASHAN, D., et al. Systemic therapy of disseminated malignant melanoma: An evidence-based overview of the state-of-the-art in daily routine. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 21, n. 10, p. 1305-18, 2007.

NETLAND, P.A.; ZETTER, B.R. Organ-specific adhesion of metastatic tumor cells *in vitro*. **Science**, v. 224, n. 4653, p. 1113-5, 1984.

NGUYEN, D. H. et al. Depigmenting effect of Cinnamomum cassia Presl in B16F10 melanoma cells. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 24, n. 5, p. 827-30, 2007. NGUYEN, D.X.; BOS, P.D.; MASSAGUÉ, J. Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 4, p. 274-84, 2009.

NICHOLSON, D.W.; THORNBERRY, N.A. Caspases: Killer proteases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 8, p. 299-306, 1997.

ORDAN, O. et al. Stress-responsive JNK mitogen-activated protein kinase mediates aspirin-induced suppression of B16 melanoma cellular proliferation. **British Journal of Pharmacology**, v. 138, n. 6, p. 1156-62, 2003.

ORTEGA, E., et al. Tumoricidal activity of lauryl gallate towards chemically induced skin tumours in mice. **British Journal of Cancer**, v. 88, n. 6, p. 940-943, 2003.

OSANAI, M. et al. Epigenetic silencing of occludin promotes tumorigenic and metastatic properties of cancer cells via modulations of unique sets of apoptosis-associated genes. **Cancer Research**, v. 66, n. 18, p. 9125-33, 2006.

PATRAVALE, V.B.; DATE, A.A.; KULKARNI, R.M. Nanosuspensions: A promising drug delivery strategy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 7, p. 827-40, 2004.

PELICANO, H.; CARNEY, D.; HUANG, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 2, p. 97-110, 2004.

PÉREZ, E. C. et al. B-1 lymphocytes increase metastatic behavior of melanoma cells through the extracellular signal-regulated kinase pathway. **Cancer Science**, v. 99, n. 5, p. 920-8, 2008.

- PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346-56, 1977.
- PETROS, A.M.; OLEJNICZAK, E.T.; FESIK, S.W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1644, n. 2-3, p. 83-94, 2004.
- PHILCHENKOV, A. Caspases: Potential targets for regulating cell death. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 8, n. 4, p. 432-44, 2004.
- PINTO-ALPHANDARY, H.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: Research and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, n. 3, p. 155-68, 2000.
- PORTER, A.G.; JÄNICKE, R.U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 6, n. 2, p. 99-104, 1999.
- POSTE, G., et al. *In vitro* selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. **Cancer Research**, v. 40, n. 5, p. 1636-44, 1980.
- RABINOW, B.E. Nanosuspensions in drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 9, p. 785-96, 2004.
- REGULA, K.M.; ENS, K.; KIRSHENBAUM, L.A. Mitochondria-assisted cell suicide: A license to kill. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 35, n. 6, p. 559-67, 2003.
- REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125-31, 2008.
- REZZANI, R., et al. Cyclosporine A-induced toxicity in two renal cell culture models (LLC-PK1 and MDCK). **Histochemical Journal**, v. 34, n. 1-2, p. 27-33, 2002.
- RODTJER, A.; SKIBSTED, L.; ANDERSEN, M. Antioxidative and prooxidative effects of extracts made from cherry liqueur pomace. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 6-14, 2006.
- ROSSO, R., et al. Relationship between the lipophilicity of gallic acid n-alkyl esters' derivatives and both myeloperoxidase activity

and HOCl scavenging. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 18, p. 6409-13, 2006.

ROY, G., et al. Mechanistic aspects of the induction of apoptosis by Lauryl Gallate in the murine B-cell lymphoma line Wehi 231. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 383, n. 2, p. 206-14, 2000.

RUSSO, A.E., et al. Melanoma: Molecular pathogenesis and emerging target therapies (review). **International Journal of Oncology**, v. 34, n. 6, p. 1481-9, 2009.

RYAN, K.M., et al. Role of NF- κ B in p53-mediated programmed cell death. **Nature**, v. 404, n. 6780, p. 892-7, 2000.

RYTER, S.W., et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 9, n. 1, p. 49-89, 2007.

SAKAGUCHI, N.; INOUE, M.; OGIHARA, Y. Reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺, common signals for apoptosis induced by gallic acid. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 12, p. 1973-81, 1998.

SALINAS-JAZMÍN, N., et al. Antimetastatic, antineoplastic, and toxic effects of 4-hydroxycoumarin in a preclinical mouse melanoma model. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 931-40, 2009.

SALVIOLI, S., et al. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\Psi$ changes in intact cells: Implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. **FEBS Letters**, v. 411, n. 1, p. 77-82, 1997.

SAUER, H., et al. Regulation of intrinsic prion protein by growth factors and TNF- α : The role of intracellular reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 6, p. 586-94, 2003.

SERRANO, A., et al. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 350, n. 1, p. 49-54, 1998.

SHIN, D. H. et al. Inhibitory effect of capsaicin on B16-F10 melanoma cell migration via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/Rac1 signal pathway. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 40, n. 5, p. 486-94, 2008.

- SIERRA-CAMPOS, E., et al. Induction of morphological changes in *Ustilago maydis* cells by octyl gallate. **Microbiology**, v. 155, n. 2, p. 604-11, 2009.
- SKULACHEV, V.P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. **Apoptosis**, v. 11, n. 4, p. 473-85, 2006.
- SMALLEY, K.S.M. Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 1, p. 28-37, 2010.
- SOENGAS, M.S.; LOWE, S.W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3138-51, 2003.
- SONG, H., et al. Vitamin D3 up-regulating protein 1 (VDUP1) antisense DNA regulates tumorigenicity and melanogenesis of murine melanoma cells via regulating the expression of fas ligand and reactive oxygen species. **Immunology Letters**, v. 86, n. 3, p. 235-47, 2003.
- SONG, S.-Y., et al. Liver metastasis formation by laminin-1 peptide (LQVQLSIR)-adhesion selected B16-F10 melanoma cells. **International Journal of Cancer**, v. 71, n. 3, p. 436-41, 1997.
- SPATZ, A.; BATIST, G.; EGGERMONT, A.M. The biology behind prognostic factors of cutaneous melanoma. **Current Opinion in Oncology**, v. 22, n. 3, p. 163-8, 2010.
- STANFORD, M.M., et al. Myxoma virus oncolysis of primary and metastatic B16F10 mouse tumors *in vivo*. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 1, p. 52-9, 2008.
- STEEG, P.S. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 1, p. 55-63, 2003.
- STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, A.3B.1-A.3B.2, 2001.
- TAKATA, M.; MURATA, H.; SAIDA, T. Molecular pathogenesis of malignant melanoma: A different perspective from the studies of melanocytic nevus and acral melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 23, n. 1, p. 64-71, 2010.
- TALMADGE, J.E., et al. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. **American Journal of Pathology**, v. 170, n. 3, p. 793-804, 2007.

TAMMELA, P., et al. Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in Caco-2 cells and in phospholipid vesicles. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 425, n. 2, p. 193-9, 2004.

TAMURA, K., et al. Mechanism of carcinogenesis in familial tumors. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 9, n. 4, p. 232-45, 2004.

TIAN, B.; HUA, Y. Concentration-dependence of prooxidant and antioxidant effects of aloin and aloe-emodin on DNA. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 413-8, 2005.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350-54, 1979.

UOZAKI, M., et al. Antiviral effect of octyl gallate against DNA and RNA viruses. **Antiviral Research**, v.73, n. 2, p. 85-91, 2007.

VALKO, M., et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VALKO, M., et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VAN DER HEIJDEN, C.A.; JANSSEN, P.J.C.M.; STRIK, J.J.T.W.A. Toxicology of gallates: A review and evaluation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 10-11, p. 1067-70, 1986.

VAN GURP, M., et al. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, n. 3, p. 487-97, 2003.

VANDER HEIDEN, M.G.; THOMPSON, C.B. Bcl-2 proteins: Regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? **Nature Cell Biology**, v. 1, n. 8, p. E209-E216, 1999.

VAUCHER, R.A.; TEIXEIRA, M.L.; BRANDELLI, A. Investigation of the cytotoxicity of antimicrobial peptide P40 on eukaryotic cells. **Current Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 1-5, 2010.

- VENKATESWARLU, V.; MANJUNATH, K. Preparation, characterization and *in vitro* release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 95, n. 3, p. 627-38, 2004.
- VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z.N. Apoptosis: Mechanisms and relevance in cancer. **Annals of Hematology**, v. 84, n. 10, p. 627-39, 2005.
- VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112-6, 2006.
- VIEIRA, H. L. A.; ALVES, P. M.; VERCELLI, A. Modulation of neuronal stem cell differentiation by hypoxia and reactive oxygen species. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 444-55, 2011.
- VIEIRA, V.M.M.; OHAYON, P. Inovação em fármacos e medicamentos: estado-da-arte no Brasil e políticas de P&D. **Revista Economia & Gestão**, v. 6, n. 13, p.60-82, 2006.
- WANG, W.; BALLATORI, N. Endogenous glutathione conjugates: Occurrence and biological functions. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 3, p. 335-55, 1998.
- WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, n. 2, p. 369-76, 2005.
- WHITEMAN, D.C.; WHITEMAN, C.A.; GREEN, A.C. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: A systematic review of epidemiologic studies. **Cancer Causes and Control**, v. 12, n. 1, p. 69-82, 2001.
- WHO - World Health Organization. **Global status report on noncommunicable diseases 2010**. Italy, 2001. 176 p.
- WISSING, S.A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1257-72, 2004.
- XIA, Y., et al. Distinct KATP channels mediate the antihypertrophic effects of adenosine receptor activation in neonatal rat ventricular myocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 320, n. 1, p. 14-21, 2007.

XIAOHUI, P., et al. Formulation of nanosuspensions as a new approach for the delivery of poorly soluble drugs. **Current Nanoscience**, v. 5, n. 4, p. 417-27, 2009.

YANG, X.-C., et al. Antimetastatic activity of MONCPT in preclinical melanoma mice model. **Investigational New Drugs**, Online First™, p. 1-12, set. 2009.

YEZHELIEV, M.V., et al. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. **Lancet Oncology**, v.7, n. 8, p. 657-67, 2006.

ZANETTI-RAMOS, B. G. **Desenvolvimento e Caracterização de Nanoparticulas Biodegradáveis para aplicação como carreadores de fármacos antitumorais: utilizando o câncer de mama como doença modelo**. 2010. 38 f. Relatório (Edital CNPq/MCT 09/2007, Processo: 550398/07-4), Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

ZANETTI-RAMOS, B.G., et al. Polyurethane nanoparticles from a natural polyol via miniemulsion technique. **Polymer**, v. 47, n. 24, p. 8080-7, 2006.

ZHAO, M. et al. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 18, p. 3778-86, 2003.

ZHIVOTOVSKY, B., ORRENIUS, S. Cell death mechanisms: Cross-talk and role in disease. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 8, p. 1374-83, 2010.

ZUSE, A., et al. 9-Benzylidene-naphtho[2,3-b]thiophen-4-ones and benzylidene-9(10H)-anthracenones as novel tubulin interacting agents with high apoptosis-inducing activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 575, n. 1-3, p. 34-45, 2007.

APÊNDICE A - Lista de equipamentos

Equipamento	Modelo	Marca ou Fabricante
Agitador magnético com aquecimento	-	Microquímica
Agitador tipo Vortex	AP-56	Phoenix
Agitador VDRL Kline	TS-2000A	Biomixer
Autoclave	AV 30	Phoenix
Balança	-	-
Balança analítica	Basic	Sartorius
Banho Maria	-	Tecnal
Bomba de Vácuo	TE-058	Tecnal
Botijão de nitrogênio líquido	-	Agrozototec
Capela de Fluxo Laminar vertical	CL-II	Valiclean
Centrífuga Refrigerada	350 R	MPW
Cuba de Transferência	Dry20	Omniphor
Cuba eletroforese horizontal	HMIDI10	Omniphor
Cuba eletroforese vertical	E5889	Sigma
Dispensor	-	Ultra-Turrax®
Espectrofluorímetro	LS55	PerkinElmer
Espectrofotômetro	T6 UV-Vis	Beijing Purkinje
Espectrofotômetro	LKB-Ultospec III	Pharmacia
Fonte eletroforese DNA	PW1000	PWSYS
Fonte eletroforese PTN	PW300	PWSYS
Freezer vertical	-	Prosdócimo
Geladeira	-	Brastemp
Incubadora de CO2	HF212 UV	Ultrasafe
Homogeneizador de tecidos	-	-
Leitora de placas	ELx800	Biotek
Microscópio de fluorescência	TS100	Nikon
Microscópio de força atômica	PicoSPM	Molecular Imaging
Microscópio eletrônico de transmissão	JEM- 2000FX	JEOL
Microscópio ótico	XDS-1B	Bioval
Paquímetro digital	-	-
pH metro	8010	Qualxtron
Refrigerador	-	Brastemp
Sistema de fotodocumentação de géis	-	Doc-Print
Sistema de Purificação de Água	MiliQ	Millipore
Transiluminador	MacroVue UV-20	Hoefler
Ultrassonicador	VC130	Sonic
Zetasizer	Nano ZS	Malvern Instruments

APÊNDICE B - Lista de reagentes

		Parte I			
Reagente	Sigla	Código	Registro CAS	Marca	
1 Acetil-asp-glu-val-asp-amino metil cumarina	DEVD-AMC	P-411	-	Biomol ^a	
2 Ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico	DTNB	D8130	69-78-3	Sigma ^b	
3 Ácido acético	-	-	-	Reagen ^c	
4 Ácido clorídrico	HCl	-	-	Reagen ^c	
5 Ácido dietilenotriaminopentacético	DPTA	D1133	67-43-6	Aldrich ^b	
6 Ácido etanossulfônico de hidroxietil-piperazina	HEPES	H3375	7365-45-9	Sigma ^b	
7 Ácido etilenodiaminotetraacético	EDTA	-	-	Reagen ^c	
8 Ácido etilenoglicoltetraacético	EGTA	-	-	Calbiochem ^d	
9 Ácido gálico	AG	G7384	149-91-7	Sigma ^b	
10 Ácido tiobarbitúrico	TBA	T5500	504-17-6	Sigma-Aldrich ^b	
11 Ácido tricloroacético	TCA	-	76-03-9	Synth ^e	
12 Acrilamida	-	A3553	79-06-1	Sigma ^b	
13 Agarose	-	-	-	Ludwig Biotec ^f	
14 Albumina sérica bovina	BSA	A2153	9048-46-8	Sigma ^b	
15 Alcool etílico	-	-	-	Nuclear ^g	
16 Alcool isopropílico	-	-	-	Nuclear ^g	
17 Alcool metílico	-	-	-	Nuclear ^g	
18 Aprotina	-	10820	9087-70-1	Sigma ^b	
19 Azida de Sódio	-	S8032	26628-22-8	Sigma-Aldrich ^b	
20 Azul de Bromofenol	-	114391	115-39-9	Sigma-Aldrich ^b	
21 Azul de Trypan	-	T6146	72-57-1	Sigma ^b	
22 Bicarbonato de sódio	NaHCO3	-	-	Reagen ^c	
23 Bis-acrilamida	-	-	110-26-9	Ludwig Biotec ^f	
24 Brometo de etídio	BE	46067	1239-45-8	Sigma ^b	

Parte II

Reagente	Sigla	Código	Registro CAS	Marca
25 Carbonato de sódio	Na2CO3	-	-	Reagen® ^c
26 Cloreto de magnésio	MgCl2	-	-	Reagen® ^c
27 Cloreto de potássio	KCl	-	-	Reagen® ^c
28 Cloreto de sódio	-	-	-	Reagen® ^c
29 Cloreto de sódio	NaCl	-	-	Reagen® ^c
30 1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno	CDNB	C3762	97-00-7	Sigma® ^b
31 Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína	DCF	D6883	4091-99-0	Sigma® ^b
32 3,3'-Diaminobenzidina	DAB	D8001	91-95-2	Sigma-Aldrich® ^b
33 Dicloro-dihidrofluoresceína	DCFH2-DA	D399	4091-99-0	Invitrogen® ^h
34 Dimetilsulfóxido	DMSO	-	-	Nuclear® ^g
35 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio	MTT	M2128	298-93-1	Sigma® ^b
36 Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfato reduzido	NADPH	N1630	220-163-3 (EC)	Sigma® ^b
37 Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfato reduzido	NADH	N4505	104809-32-7	Sigma® ^b
38 Ditioneitol	DTT	43819	03/12/3483	Fluka® ^b
39 Dodecil sulfato de sódio	SDS	L6026	151-21-3	Sigma-Aldrich® ^b
40 Éter etílico	-	-	-	Reagen® ^c
41 Fluoreto de femilmetil sulfonil	PMSF	P7626	329-98-6	Sigma® ^b
42 Formaldeído	-	-	-	Reagen® ^c
43 Fosfato de sódio dibásico	NaH2PO4	-	-	Reagen® ^c
44 Fosfato de sódio monobásico	Na2HPO4	-	-	Reagen® ^c
45 Galato de dodecila	G12	48660	1166-52-5	Aldrich® ^b
46 Galato de octila	G8	48700	1034-01-1	Aldrich® ^b
47 Glicerol	-	G2289	56-81-5	Sigma-Aldrich® ^b
48 Glicina	-	G8898	56-40-6	Sigma® ^b
49 Glutatonina oxidada	GSSG	G4376	27025-41-8	Sigma® ^b

Parte III

Reagente	Sigla	Código	Registro CAS	Marca
50 Glutona redutase	GR	G3664	9001-48-3	Sigma® ^b
51 Glutona redutase	GSH	G4251	70-18-8	Sigma® ^b
52 Hidróxido de potássio	KOH	-	-	Reagen® ^c
53 Hidróxido de sódio	NaOH	-	-	Reagen® ^c
54 Hidróxido de sódio	NaOH	-	95077-05-7	Vetec® ⁱ
55 5,58,6,68-Iodeto de tetraetilbenzimidazolcarbocianina	JC-1	T3168	47729-63-5	Invitrogen® ^h
56 Laranja de acridina	LA	A9231	65-61-2	Sigma® ^b
57 Leupeptina	-	L2884	103476-89-7	Sigma® ^b
58 L-tirosina	-	T3754	60-18-4	Sigma-Aldrich® ^b
59 LY-294,002	-	L9908	9016-45-9	Sigma® ^b
60 Malondialdeído (padrão)	MDA	T9889	122-31-6	Aldrich® ^b
61 Marcador de peso molecular de proteínas	-	RPN800	-	Amersham® ^j
62 Meio de cultivo celular (dulbelco's modified eagle medium)	D-MEM	17	-	Cultilab® ^k
63 β-Mercaptoetanol	-	M7154	60-24-2	Sigma® ^b
64 NP-40	NP-40	N6507	9016-45-9	Sigma® ^b
65 PD098,059	-	P215	167869-21-8	Sigma® ^b
66 Penicilina/estreptomicina	-	15140-122	-	Gibco® ^l
67 Pepstatina a	-	P5318	26305-03-3	Sigma® ^b
68 Peróxido de hidrogênio	H2O2	-	7722-84-1	Vetec® ⁱ
69 Persulfato de Amônia	APS	A3678	7727-54-0	Sigma® ^b
70 Piruvato de sódio	-	P2256	113-24-6	Sigma-Aldrich® ^b
71 Ponceau S	-	P3504	6226-79-5	Sigma-Aldrich® ^b
72 Proteinase k	-	V3021	-	Promega® ^m
73 P-trifluoro-metoxicarbonil ciano fenil hidrazina	FCCP	C2920	370-86-5	Sigma® ^b
74 Reagente de Folin-Ciocalteu	-	F9252	-	Sigma-Aldrich® ^b

Parte IV

Reagente	Sigla	Código	Registro CAS	Marca
75 Rnase a	-	A7973	-	Promega® ^m
76 Sacarose	-	S0389	57-50-1	Sigma® ^b
77 SB203580	-	S8307	152121-47-6	Sigma® ^b
78 SBTI - Trypsin inhibitor from Glycine max (soybean)	SBTI	T9128	9035-81-8	Sigma® ^b
79 Soro fetal bovino	SFB	63	-	Cultilab® ^k
80 SP600125	-	S5567	204-955-6 (EC)	Sigma® ^b
81 Sulfato de cobre	CuSO4	-	-	Reagen® ^c
82 Sulfonato de 3-[(3-cloroamidopropil)-dimetilamônio]-1- propano	CHAPS	C9426	75621-03-3	Sigma® ^b
83 Sulforodamina b	SRB	S1402	3520-42-1	Sigma® ^b
84 Tartarato de sódio e potássio	C4H4KNaO6	-	-	Reagen® ^c
85 Temed	-	T9281	110-18-9	Sigma® ^b
86 Ter-butilhidroperóxido	t-BUOOH	B2633	75-91-2	Sigma® ^b
87 Tripsina	-	T4799	07/07/9002	Sigma® ^b
88 Tris(hidroxi metil)-aminometano	TRIS	T87602	77-86-1	Sigma-Aldrich® ^b
89 Triton	-	T9284	9002-93-1	Sigma-Aldrich® ^b
90 Tween	-	P5927	9005-64-5	Sigma® ^b
91 Vermelho neutro	VN	N4638	553-24-2	Sigma-Aldrich® ^b

*identificação numérica no "Chemical Abstracts Service"

^a Biomol International, Plymouth Meeting, PA, USA

^b Sigma-Aldrich Corporate, St. Louis, MO, EUA

^c Quimibras Indústrias Químicas S/A, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^d Merck, Darmstadt, Germany

^e Labsynth, Diadema, SP, Brasil

^f Ludwig Biotecnologia Ltda., Alvorada, RS, Brasil

^g CAQ-Casa da Química Ind. e Com. Ltda, Diadema, SP, Brasil

^h Invitrogen Corporation, Carlsbad, Ca, USA

ⁱ Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil

^j GE Healthcare Bio-Sciences Corp. Piscataway, NJ, USA

^k Cultilab, Campinas, SP, Brasil

^l Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA

^m Promega Corporation, Madison, WI, USA

APÊNDICE C - Lista de materiais

Material	Observações	Modelo	Marca
Câmara de Neubauer	Espelhada	-	L.O.
Contentor criogênico	1° C/minuto	Mr. Frosty	Nalgene
Criotubos	Capacidade 2 ml	-	Axygen
Cubetas fluorímetro	3 ml	-	Sigma
Cubetas quartzo	100 µl e 1 ml	-	Sigma
Dispensador manual	-	Minilab 201	HTL
Espaçadores eletroforese	(1,5 mm x 8 mm)	S4150	Sigma
Espalhador Scraper	240 x 130mm	-	TPP
Garrafa de cultura	60 e 270 ml	-	TPP
Grampos metálicos	Tipo grampomol	-	Tris
Luvas de procedimento	Tamanho P	-	Supermax
Membrana GV para filtração	PVDF/0,22µm/47 mm	Durapore	Millipore
Membrana nitrocelulose	Hybond-C Extra 45µm	RPN203E	Amersham
Micropipetas	-	-	Labmate
Microtubos polipropileno	0,6 e 1,5 ml	-	Axygen
Pentes para eletroforese	1.5 mm x 10 wells	C4701	Sigma
Pipetador motorizado	-	SWIFTPET	HTL
Placas de cultura	6, 12, 24 e 96 poços	-	TPP
Placas eletroforese	8 x 10 cm	G3150	Sigma
Placas fluorímetro	-	-	-
Ponteiras	-	-	Axygen
Seringa Hamilton	25 µl	S0392	Sigma
Seringa para dispensador	-	-	Kartell
Sistema de filtração a vácuo	-	Sterifill	Millipore
Tubos capilares	Microhematócrito	-	Perfecta
Tubos falcon	15 e 50 ml	-	TPP
Vidraria	-	-	Vidrolabor

APÊNDICE D - Relação dos anticorpos utilizados nos estudos de imunodeteccção de proteínas.

Tipo de Anticorpo	Proteína	Peso	Código/Fornecedor	Diluição
Primário/ policlonal ^{a,b}	Bax	23 kDa	$\Delta 21(sc-6236)$ ^d	1:200
Primário/ policlonal ^{a,b}	Bcl-2	28 kDa	#2876 ^e	1:1000
Primário/ policlonal ^{a,b}	β -actina	45 kDa	#4967 ^e	1:1000
Primário/ policlonal ^{a,b}	Fas	48 kDa	FL-335(sc-7886) ^d	1:200
Secundário ^c	-	-	#7074 ^e	1:1000

^a Reatividade em camundongo

^b Produzidos em coelhos (rabbit)

^c Ligado à peroxidase, reatividade a IgG de coelhos (anti-rabbit)

^d Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)

^e Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA)

APÊNDICE E - Produção científica do período de realização do doutorado.

1) Artigos completos publicados em periódicos de circulação internacional:

CORDOVA, C. A. S., LOCATELLI, C., ASSUNÇÃO, L. S., MATTEI, B., MASCARELLO, A., WINTER, E. W., NUNES, R. J., YUNES, R. A., CRECZYNSKI-PASA, T. B. Octyl and dodecyl gallates induce oxidative stress and apoptosis in a melanoma cell line. **Toxicology *in vitro***. doi:10.1016/j.tiv.2011.08.003

LOCATELLI, C., CARVALHO, D. R., MASCARELLO, A., CORDOVA, C. A. S., YUNES, R. A., NUNES, R. J., PILATI, C., CRECZYNSKI-PASA, T. B. Antimetastatic activity and low systemic toxicity of tetradecyl gallate in a preclinical melanoma mouse model. **Investigational New Drugs**. p.1 - 10, 2011.

SILVA, E. W., CHIARADIA, L. D., CORDOVA, C. A. S., NUNES, R. J., YUNES, R. A., CRECZYNSKI-PASA, T. B. Naphthylchalcones induce apoptosis and caspase activation in a leukemia cell line: The relationship between mitochondrial damage, oxidative stress, and cell death. **Bioorganic & Medicinal Chemistry (Print)**. v.18, p.8026-34, 2010.

2) Trabalhos resumidos apresentados em congresso:

CORDOVA, C. A. S., LOCATELLI, C., ZANETTI-RAMOS, B. G., JASPER, R., MASCARELLO, A., WILHELM-FILHO, D., YUNES, R. A., NUNES, R. J., CRECZYNSKI-PASAA, T. B. Octyl gallate encapsulation in lipid nanoparticles improves its anti-tumor activity and ameliorates its renal and hepatic toxic effects. In: MASCC/ISOO 2011 International Symposium (Multinational Association of Supportive Care In Cancer), 2011, Atenas, Grécia.

CORDOVA, C. A. S., LOCATELLI, C., ASSUNÇÃO, L. S., MASCARELLO, A., SILVA, E. W., NUNES, R. J., YUNES, R. A., CRECZYNSKI-PASA, T. B. Cytotoxicity of octyl and dodecyl gallate to melanoma cells In: XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2011, Foz do Iguaçu - PR.

SILVA, E. W., CORDOVA, C. A. S., MASCARELLO, A., NUNES, R. J., YUNES, R. A., CRECZYNSKI-PASA, T. B. Mechanism of a leukemia cell death induced by gallic acid derivative In: XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2011, Foz do Iguaçu - PR.

CORDOVA, C. A. S., LOCATELLI, C., ASSUNÇÃO, L. S., LEAL, P. C., NUNES, R. J., YUNES, R. A., CRECZYNSKI-PASA, T. B. In vitro evaluation of cytotoxicity mechanisms of octyl and dodecyl gallate in a mouse melanoma cell In: XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBe, 2010, Águas de Lindóia - SP.

CORDOVA, C. A. S., LOCATELLI, C., LEAL, P. C., NUNES, R. J., YUNES, R. A., CRECZYNSKI-PASA, T. B. Indução de estresse oxidativo em linhagem celular de melanoma por derivados sintéticos do ácido gálico In: XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBe, 2009, Águas de Lindóia - SP.

3) Outras produções científicas:

Participação da Escola de Verão em Farmacognosia 2010, realizada de 7 a 12 de fevereiro de 2010 em Florianópolis, SC, como palestrante no curso intitulado “Avaliação da bioatividade de produtos naturais utilizando técnicas in vitro”.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UnC.



Universidade do Contestado – UnC
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO – 137/08

O Comitê de Ética em pesquisa da Universidade do Contestado, reunido no dia 25 de abril de 2008, no uso de suas atribuições legais, emite parecer consubstanciado **APROVADO** ao projeto intitulado “**Avaliação da Atividade Antitumoral in vivo de derivados sintéticos do ácido gálico**”, da pesquisadora Claudriana Locatelli. O qual tem como objetivo avaliar o efeito antitumoral e o potencial antimetastático de derivados sintéticos do ácido gálico em camundongos. O potencial antimetastático será avaliado através da indução de metástase tumoral em camundongos pela administração da linhagem de melanoma B16F10, também serão observadas alterações no tamanho do tumor cutâneo após a administração das células B16F10. Após o término do tratamento os animais serão sacrificados e serão realizadas avaliações bioquímicas, hematológicas e histológicas para comprovar o efeito antimetastático, antitumoral e avaliar a toxicidade sistêmica dos derivados sintéticos do ácido gálico.

Com base na avaliação do projeto considera-se o mesmo **APROVADO e ENCAMINHADO para REALIZAÇÃO**, uma vez que respeita os princípios éticos da experimentação animal.

Certo de sua colaboração subscrevemo-nos reiterando nossos votos de estima, consideração e colocando-nos a sua inteira disposição para os esclarecimentos e orientações que se fizerem necessária.

Caçador (SC), 25 de abril de 2008.

Darci Martinello

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

