



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

TARSIA GIABARDO ALVES SILVA

EFEITO QUIMIOPREVENTIVO E MODULADOR DE HLA-G (*Human*

***Leukocyte Antigen – G*) DE MORELLOFLAVONA**

ARARAQUARA

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

TARSIA GIABARDO ALVES SILVA

**EFEITO QUIMIOPREVENTIVO E MODULADOR DE HLA-G (*Human
Leukocyte Antigen – G*) DE MORELLOFLAVONA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, área de concentração: Biologia Celular, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Christiane Pienna Soares

ARARAQUARA

2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S586e Silva, Tarsia Giabardo Alves
Efeito quimiopreventivo e modulador de HLA-G (Human Leukocyte Antigen – G) de morelloflavona / Tarsia Giabardo Alves Silva. – Araraquara, 2012
130 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Orientador: Christiane Pienna Soares

1. Morelloflavona. 2. HLA-G. 3. Quimioprevenção. 4. Ensaio de quinona redutase. 5. Ensaio do cometa. 6. Biflavonoide I. Soares, Christiane Pienna, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citologia e Biologia Celular/ Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia e no Laboratório de Immunogenética e de Expressão de Genes/ Serviço de pesquisas em Hemato-Imunologia com suporte financeiro fornecido pela FAPESP (09/52716-4), com concessão de bolsa de doutorado regular CNPq- 140022/2010-4 e bolsa de doutorado-sanduíche CAPES-BEX 0103-110.

*"De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto, devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro..."*

Fernando Pessoa

Dedicatória

*Ao meu marido **Vagner José**, que durante todo o tempo tem me
dado muito amor e carinho, sendo meu companheiro de todas as
horas.*

Agradecimientos

À Prof^ª. Dr^a. Christiane Pienna Soares pela orientação, ensinamentos, apoio e principalmente amizade.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR/UNESP) e aos professores do curso de pós-graduação, pelo aperfeiçoamento profissional.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do auxílio financeiro para execução do trabalho.

Ao meu co-orientador Philippe Moreau por me conceder a oportunidade de vivenciar a rotina de um grande grupo de pesquisa no exterior.

À Prof^ª. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva do NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese, e Ecofisiologia de Produtos Naturais), Instituto de Química, UNESP-Araraquara e seus alunos pelo material e conhecimentos cedidos.

À grande amiga e companheira de laboratório Daniele Agustoni, pessoa maravilhosa e competente, que esteve sempre presente e auxiliando-me em todos os momentos.

À doce Letícia Min Wen Tirtaprawita pela ajuda nos ensaios.

À Ms Daniara Fernandes pela prontidão nos momentos de dúvidas.

À Seção Técnica de Pós Graduação.

Ao Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi pela atenção dispensada e principalmente pelos conselhos de amizade.

A minha mãe Marlei Emília pelo apoio emocional constante.

Ao meu irmão Raphael pela presença amiga e pelas visitas ao velho continente.

A todos os colegas do Laboratório de Citologia e Biologia Celular da FCFAR que tornaram o convívio no laboratório sempre muito agradável.

A todos os alunos, técnicos e pesquisadores do Commissariat à l'Energie Atomique / Paris VII Université, Service de Recherches en Hémato-Immunologie, Hôpital Saint-Louis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -MEM: *Alfa modified of Eagle Medium*

AcOEt: Acetato de etila

AhR: Receptor de hidrocarboneto arila

APC: Célula apresentadora de antígeno

ARE: Resposta ao elemento antioxidante

ARNT: Proteína nuclear translocadora de AhR

CCDC: Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-prep: Cromatografia líquida de alta eficiência preparativa

CPG: Cromatografia de Permeação em Gel

CPH: Complexo Principal de Histocompatibilidade

DAD: Detector com Arranjo de Diodos

DEPC: Dietilpirocarbonato

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELL: Extração líquido- líquido

EM: Espectrometria de Massas

EtOH: Etanólico

FAD: Flavina-adenina-dinucleotídeo

FCS: Soro fetal bovino inativado

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FOL: Folha

GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato dehidrogenase

GM-CSF: Fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos

GST: Glutathione-S-transferase

Hepa 1c1c7: Hepatocarcinoma murino

HepG2: Hepatocarcinoma celular humano

Hex: Hexânico

HLA: Antígeno leucocitário humano

HLA-Gs: Antígeno leucocitário humano- G solúvel

IC₅₀: Concentração inibitória de 50% do crescimento celular
IFN- γ : Interferon- gama
IL: Interleucina
ILT: *Immunoglobulin-Like Transcrip*
IV: Infravermelho
Keap 1: Kelch-like ECH-associated protein 1
LH-20: Coluna de permeação em gel
LMP: *Low Melting point*; Baixo ponto de fusão
MFI: Média de intensidade da fluorescência
MHC: *Major Histocompatibility Complex*
M-MLV-RT: *Transcriptase reversa Moloney Murine Leukemia Virus*
MTT: 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium brometo
NAD(P)H: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
n-BuOH: *n*-butanol
NK: *Natural killer*
NQ1: Quinona redutase
Nrf2: *Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2*
PBMC: *Peripheral blood mononuclear cells*
PBS: Solução salina tamponada
pH: Potencial hidrogeniônico
PMA: Acetado de forbolmiristato
RNA: Ácido ribonucleico
rpm: Rotação por minuto
RPMI 1640: *Roswell Park Memorial Institute medium*
SDS: Dodecil sulfato de sódio
TNF- α : Fator de necrose tumoral- alfa
UTR: Região não- traduzida
UV: Ultravioleta
VC: Viabilidade celular
XRE: Elemento de resposta à xenobióticos

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%: porcentagem

<: menor

>: maior

µg: micrograma

µL: microlitro

µM: micromolar

°C: grau Celsius

cm: centímetro

cm²: centímetro quadrado

g: grama

m/v: massa por volume

mg: miligrama

mL: mililitro

mM: milimolar

nm: nanômetro

U: unidade

U/g: unidade por grama

v/v: volume por volume

ng: nanograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do transcrito primário de HLA-G e das múltiplas isoformas.....	9
Figura 2	Receptores para HLA-G e suas funções.....	12
Figura 3	Carcinogênese é um processo de múltiplas etapas.....	17
Figura 4	Indutores de enzimas de metabolização.....	19
Figura 5	(A) Árvore, (B) folhas e (C) frutos de <i>Garcinia xanthochymus</i>	23
Figura 6	Estrutura química da morelloflavona.....	24
Figura 7	Índices de morte celular causada pela morelloflavona em células mononucleares do sangue periférico em diferentes concentrações.....	44
Figura 8	Índices de morte celular causada pela morelloflavona em células mononucleares do sangue periférico em diferentes concentrações.....	44
Figura 9	Expressão de HLA-G1 (média $\pm$ erro padrão) em linhagem de melanoma humano FON após tratamento de 48 e 72 horas com morelloflavona em diferentes concentrações.....	45
Figura 10	Expressão de HLA-G1 (média $\pm$ erro padrão) em linhagem de coriocarcinoma cervical humano JEG-3 após tratamento de 48 e 72 horas com morelloflavona em diferentes concentrações.....	46
Figura 11	Expressão de HLA-G1 (média $\pm$ erro padrão) em linhagem de melanoma humano transfectada M8HLA-G1 após tratamento de 48 e 72 horas com morelloflavona em diferentes concentrações.....	46

Figura 12	Expressão de HLA-G solúvel (média $\pm$ erro padrão) em linhagem de melanoma humano FON pelo ensaio imunoenziático- Elisa após tratamento de 48 e 72 horas com morelloflavona em diferentes concentrações.....	47
Figura 13	Expressão de HLA-G solúvel (média $\pm$ erro padrão) em linhagem de coriocarcinoma cervical humano JEG-3 pelo ensaio imunoenziático- Elisa após tratamento de 48 e 72 horas com morelloflavona em diferentes concentrações.....	48
Figura 14	Expressão de HLA-G solúvel (média $\pm$ erro padrão) em linhagem de melanoma humano transfectada M8HLA-G1 pelo ensaio imunoenziático- Elisa após tratamento de 48 e 72 horas com morelloflavona em diferentes concentrações.....	49
Figura 15	Expressão de RNAm de HLA-G em linhagem de melanoma humano M8 após 48 e 72 horas de tratamento.....	50
Figura 16	Indução de NAD(P)H: quinona redutase (NQ1).....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise estatística do ensaio de genotoxicidade.....	53
Tabela 2	Análise estatística do ensaio de antigenotoxicidade.....	55

RESUMO

As atividades biológicas e farmacológicas dos biflavonoides são diversas incluindo suas propriedades imunossupressivas, anticancerígenas, antioxidantes, antiangiogênicas, antibacterianas, antivirais e antifúngicas. No presente estudo, avaliou-se a potencial capacidade do biflavonoide morelloflavona, isolada de *Garcinia xanthochymus*, em modular a expressão de HLA-G (*Human Leukocyte Antigen- G*), bem como seu potencial efeito quimiopreventivo. Inicialmente, foi avaliado o índice de morte celular causado pela morelloflavona por meio do ensaio de Anexina V - Iodeto de próidio em PBMC (Células mononucleares do sangue periférico), o qual apresentou índices de morte celular significantes. Através da citometria de fluxo observou-se um aumento da expressão de HLA-G vinculado à membrana celular em linhagens de melanoma (FON) ($p < 0,001$). Pôde-se observar a indução de HLA-G solúvel em linhagens de melanoma transfectada (M8-HLA-G1) ($p < 0,001$), sem alteração para os demais tipos celulares estudados, pelo ensaio imunoenzimático- ELISA. A expressão de RNAm de HLA-G também foi induzida pela morelloflavona, observada pela RT- PCR, em células de melanoma M8 que não expressam *HLA-G* constitutivamente. Ainda, foi avaliada a atividade quimiopreventiva da morelloflavona. Observou-se a duplicação da atividade da enzima quinona redutase na linhagem de hepatocarcinoma celular (Hepa1c1c7) por meio do ensaio quinona redutase. Pelo ensaio do cometa foi possível verificar a capacidade genotóxica e antigenotóxica. Em relação à antigenotoxicidade, a morelloflavona causou dano de DNA no pré-tratamento. No pós-tratamento foi observado que a morelloflavona pode ter a capacidade de reverter danos de DNA causados pelo peróxido de hidrogênio. Sendo assim, os dados demonstrados revelam que a morelloflavona induz a expressão de HLA-G e possui efeito quimiopreventivo.

Palavras-chave: morelloflavona, HLA-G, quimioprevenção, ensaio de quinona redutase, ensaio do cometa, biflavonoide.

ABSTRACT

The biological and pharmacological activities of biflavonoids are diverse, including their immunosuppressive, anticancer, antioxidant, antiangiogenic, antibacterial, antiviral and antifungal properties. In the present study we assessed the potential ability of morelloflavone, a biflavonoid isolated from *Garcinia xanthochymus* in modulating the expression of HLA-G (Human Leukocyte Antigen-G), as well as their potential chemopreventive effect. First, we measured the rate of cell death by morelloflavone using Annexin V - Propidium iodide assay in PBMC (peripheral blood mononuclear cells), which showed significant levels of cell death. By flow cytometry was observed the increased expression of HLA-G membrane bound in melanoma cells line (FON) ($p < 0.001$). Also, was observed the induction of HLA-G soluble in transfected melanoma cells line (M8-HLA-G1) ($p < 0.001$), with no change to other cell types studied by Enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA. The expression of HLA-G mRNA was also induced by morelloflavone, observed by RT-PCR, in melanoma cells (M8) that do not express *HLA-G* constitutively. Still, we evaluated the chemopreventive activity of morelloflavone. We observed a doubling of quinone reductase enzyme activity in hepatocellular carcinoma cells line (Hepa1c1c7) by quinone reductase assay. By comet assay we were able to verify the genotoxic and antigenotoxic capacity. Regarding antigenotoxicity, morelloflavone caused DNA damage pre treatment. In the post-treatment was observed that morelloflavone may be capable of reversing DNA damage caused by hydrogen peroxide. Thus, the data show that morelloflavone induces the expression of HLA-G and has chemopreventive effect.

Keywords: morelloflavone, HLA-G, chemoprevention, quinone reductase assay, comet assay, biflavonoid.

SUMÁRIO

Dedicatória	
Agradecimentos	
Lista de Abreviaturas e Siglas	
Lista de Símbolos e Unidades	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Resumo	
Abstract	
Sumário	

CAPÍTULO 1

1.	Introdução.....	1
2.	Revisão Bibliográfica.....	4
2.1.	Carcinogênese.....	5
2.2.	Complexo Principal de Histocompatibilidade.....	6
2.2.1.	Expressão da Molécula HLA-G.....	7
2.2.2.	Estrutura do Gene e da Molécula HLA-G.....	9
2.2.3.	Características Funcionais da Molécula HLA-G.....	11
2.3.	Quimioprevenção.....	16
2.4.	Biflavonoides.....	21
2.4.1	Morelloflavona.....	24
3.	Objetivos.....	25
3.1.	Objetivo Geral.....	26
3.2.	Objetivos Específicos.....	26
4.	Materiais e Métodos.....	27
4.1.	Extração e Purificação da Morelloflavona.....	28
4.2.	Linhagens Celulares e Cultivo Celular.....	29
4.3.	Citometria de Fluxo.....	30
4.3.1.	Anexina V - Iodeto de Propídio.....	30
4.3.2.	Expressão de HLA-G1.....	31
4.4.	Ensaio Imunoenzimático – ELISA.....	32

4.5.	PCR em Tempo Real (RT-PCR).....	33
4.5.1.	Extração de RNA total.....	34
4.5.2.	Quantificação do RNA Total.....	34
4.5.3.	Síntese do DNA complementar (DNAC).....	35
4.5.4.	Amplificação e detecção dos produtos gerados em RT-PCR.....	35
4.6.	Ensaio de NAD(P)H: quinona redutase (NQ1).....	36
4.7.	Ensaio do Cometa.....	38
4.7.1.	Avaliação de Genotoxicidade.....	38
4.7.2.	Avaliação de Antigenotoxicidade.....	40
4.8.	Análise Estatística.....	41
5.	Resultados.....	42
5.1.	Citometria de Fluxo.....	43
5.1.1	Análise de Anexina V- Iodeto de Propídio.....	43
5.1.2.	Análise da expressão de HLA-G1.....	45
5.2.	Análise da expressão de HLA-G solúvel.....	47
5.3.	Análise da PCR em Tempo Real (RT-PCR).....	49
5.4.	Indução de NAD(P)H: quinona redutase (NQ1).....	50
5.5.	Avaliação da Genotoxicidade por meio do Ensaio do Cometa.....	51
5.5.1	Avaliação de Genotoxicidade.....	51
5.5.2.	Avaliação de Antigenotoxicidade.....	53
6.	Discussão.....	55
7.	Conclusão.....	67
8.	Referências Bibliográficas.....	69

CAPÍTULO 2

1.	Produção Bibliográfica.....	103
----	-----------------------------	-----

CAPÍTULO 1

1. Introdução

O número de casos de câncer no Brasil cresce a cada ano. Segundo dados epidemiológicos do Instituto Nacional do Câncer, no Brasil a incidência e a mortalidade se elevam lado a lado, enquanto que em países desenvolvidos a incidência aumenta e a mortalidade diminui (INCA, 2010).

O câncer se desenvolve devido à capacidade que as células tumorais possuem em subverter a resposta imune por meio de inúmeras maneiras. Um dos mecanismos de escape utilizados pelas células cancerígenas é a expressão da molécula imunoregulatória *Human Leukocyte Antigen- G* (HLA-G). HLA-G é uma molécula HLA de classe I não clássica, expressa na forma vinculada a membrana celular ou solúvel, e que desempenha funções importantes na regulação do sistema imune por meio da inibição da atividade de células *natural killer* e linfócitos T citotóxicos, das respostas de células T CD4+ alorreativas, e maturação e função de células apresentadoras de antígenos (AMIOT *et al.*, 2011).

Existem substâncias que possuem a capacidade de atuar frente ao desenvolvimento do câncer, impedindo, prevenindo ou revertendo a carcinogênese. São denominados compostos quimiopreventivos, os quais atuam principalmente aumentando a produção de enzimas de fase II, como por exemplo, a enzima NAD(P)H: quinona redutase (NQ1).

Muitos dessas substâncias são de origem natural, como os biflavonoides. Atualmente, estudos a respeito dos biflavonoides concentram-se em suas propriedades antiangiogênicas e antitumorigênicas, com relatos em diferentes linhagens celulares, modelos animais e ensaios epidemiológicos humanos que demonstram a associação entre o consumo de frutas, legumes e certas bebidas, e o risco reduzido de doenças crônicas, incluindo câncer (RAMOS, 2007). A literatura mostra que os biflavonoides atuam na inibição do desenvolvimento tumoral através de mecanismos de parada do

ciclo celular de linhagens tumorais (PINKAEW *et al.*, 2009), de proteção de danos oxidativos ao DNA, da inibição da expressão de genes que promovem a instabilidade genética e da ativação de sistemas enzimáticos de metabolização de xenobióticos (TIAN *et al.*, 2005; BENAVENTE-GARCÍA & CASTILLO, 2008; FERNANDES, 2010; FAROMBI *et al.*, 2011).

Diante desse cenário, se faz necessária à busca por substâncias bioativas presentes na biodiversidade brasileira capazes de exercerem alguma atividade antiangiogênica e antitumorigênica. Desta forma, este trabalho tem como objetivo o estudo da morelloflavona extraída da planta *Garcinia xanthochymus*, pelo seu efeito antiangiogênico e antitumorigênico recentemente reconhecido (PANG *et al.*, 2009; PINKAEW *et al.*, 2009), avaliando-se o seu potencial efeito quimiopreventivo e na modulação da resposta imune mediada por HLA-G.

2. *Revisão Bibliográfica*

2.1. Carcinogênese

As grandes etapas da carcinogênese foram deduzidas ao longo dos últimos 50 anos, a partir de estudos em modelos animais, e estas foram denominadas iniciação, promoção e progressão (HURSTING *et al.*, 1999; VICENTI & GATENBY, 2008).

A iniciação é determinada quando o DNA de uma célula ou população de células é danificado pela exposição à carcinógenos exógenos ou endógenos, e se este dano não é reparado, podendo ocorrer mutações genéticas. A responsividade das células mutantes ao seu microambiente pode ser alterada e pode dar-lhes uma vantagem de crescimento (PITOT, 2001; 2007). A promoção é caracterizada pela expansão clonal seletiva das células iniciadas, resultado da expressão alterada de genes cujos produtos estão associados com tecido de hiperproliferação, remodelação e inflamação (VICENTI & GATENBY, 2008). Durante a progressão, células pré-neoplásicas desenvolvem-se em tumores por meio de um processo de expansão clonal que é facilitado pela instabilidade genômica e expressão gênica alterada (LEUNG & BRUGGE, 2012). A visão clássica da carcinogênese experimental, em que a iniciação do tumor é seguida pela promoção e progressão tumoral de forma sequencial, permanece conceitualmente importante para a pesquisa experimental da carcinogênese (PITOT, 2001; 2007).

No entanto, a natureza temporal dos eventos da iniciação, promoção e progressão é complexa (HURSTING *et al.*, 1999). Trabalhos mostram que múltiplos eventos mutacionais estão envolvidos na formação de um tumor (LEUNG & BRUGGE, 2012; SUZUKI & TAKAHASHI, 2012). Ainda, é cada vez mais evidente que os genes do indivíduo podem afetar a sua susceptibilidade a um agente cancerígeno (KUCUKGERGIN *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2012). Assim, ao invés de ocorrer em três fases distintas em uma ordem previsível, a carcinogênese humana é mais bem

caracterizada como um acúmulo de alterações nos genes que regulam a homeostase celular, como oncogenes, genes supressores tumorais, genes de regulação da apoptose, e os genes de reparo do DNA. Dada a natureza de vários estágios de carcinogênese e nosso avanço do conhecimento dos mecanismos críticos envolvidos em cada fase, estratégias para a prevenção do câncer devem usar mecanismos que abordem o bloqueio do processo cancerígeno em todas as fases ao longo da via (SUZUKI & TAKAHASHI, 2012).

Secundariamente aos processos homeostáticos intracelulares, há muito se postula a existência de mecanismos entre as células, capazes de identificar células geneticamente alteradas e que processariam sua destruição, removendo-as. Porém, por meio de uma atuação sobre células e moléculas do sistema imunológico, as células mutadas possuem a capacidade de inibir o sistema imunológico, favorecendo a sobrevivência do tumor (LEUNG & BRUGGE, 2012).

2.2. Complexo Principal de Histocompatibilidade

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) também denominado MHC (*Major Histocompatibility Complex*) foi primeiramente descrito nos anos 40 pela observação de rejeição ou aceitação de transplantes de tecidos entre camundongos alogênicos ou singênicos, respectivamente. Em camundongos essa região está localizada no cromossomo 17 e é denominada Histocompatibilidade-2 (H-2). Em humanos, a região equivalente a H-2 dos camundongos localiza-se no braço curto do cromossomo 6, na região 6p21.3, sendo denominada Antígeno Leucocitário Humano (HLA – *Human Leukocyte Antigen*), pois seus produtos são expressos em leucócitos (VANDIEDONCK & KNIGHT, 2009).

.Atualmente, são reconhecidos mais de 40 locos no MHC humano. A região de classe I engloba os *loci* HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G (LAWLOR *et al.*, 1990; GERAGHTY, 1993; BODMER *et al.*, 1995) e pode ser subdividida em moléculas de HLA-I clássicas (HLA-Ia) e não clássicas (HLA-Ib). As moléculas do grupo HLA-Ia exibem alto grau de polimorfismo e são designadas a apresentar o maior número possível de peptídeos antigênicos, incluem HLA-A, HLA-B e HLA-C, enquanto que as moléculas do grupo HLA-Ib que incluem os genes HLA-E, HLA-F e HLA-G codificam moléculas encontradas em tecidos fetais e em alguns tecidos da fase adulta (GERAGHTY, 1993; PYO *et al.*, 2006).

O antígeno leucocitário humano - G (HLA-G) é uma molécula HLA de classe I não- clássica que foi primeiramente identificada como sendo expressa seletivamente por células do coriocarcinoma. Em 1987, Daniel Geraghty e colaboradores realizaram a primeira clonagem do gene HLA-G. Charlie Loke, juntamente com Shirley Ellis e Susan Kovats, e seus respectivos colaboradores foram os primeiros a identificar a molécula de HLA-G em citotrofoblastos extravilosos (ELLIS *et al.*, 1990; KOVATS *et al.*, 1990). Anos mais tarde, Phillippe Le Bouteiller confirma que HLA-G é expresso em toda a interface materno-fetal (células trofoblásticas invasivas, células do endotélio vascular fetal, células do âmnion e do líquido amniótico) (LE BOUTEILLER *et al.*, 1999), sendo que sua ausência está relacionada a abortos espontâneos (RIZZO *et al.*, 2011).

2.2.1. Expressão da Molécula HLA-G

Em indivíduos saudáveis, níveis basais da transcrição de HLA-G são observados na maioria de células e tecidos, entretanto a tradução das proteínas é restrita ao

trofoblasto (RIZZO *et al.*, 2011), o timo (CRISA *et al.*, 1997), a córnea (LE DISCORDE *et al.*, 2003), o pâncreas (CIRULLI *et al.*, 2006) e precursores eritróides e endoteliais (MENIER *et al.*, 2004).

Algumas células tumorais expressam HLA-G na tentativa de subverter a resposta imune favorecendo o escape tumoral e inibindo o ataque às células tumorais por células *natural killer* (NK) e linfócito T citotóxico, porém o grau de expressão da molécula varia de acordo com o tecido (ROUAS- FREISS *et al.*, 2005). Proteínas HLA-G podem ser encontradas em infecções virais, doenças autoimunes e inflamatórias, após transplantes de órgãos e na transformação maligna.

De modo semelhante aos tumores, os vírus possuem estratégias para escapar do sistema imune. Sendo assim a indução da expressão da molécula de HLA-G por células infectadas por vírus pode ser um mecanismo adicional e induzido que o ajude a subverter as defesas do hospedeiro, como demonstrou Donaghy e colaboradores que verificaram que os níveis de HLA-G solúvel são maiores em indivíduos portadores do HIV (DONAGHY *et al.*, 2007; CAROSELLA *et al.*, 2011).

Em algumas doenças autoimunes e inflamatórias foi observada a presença de HLA-G, mostrando que a molécula pode contribuir para a diminuição da antigenicidade das células envolvidas nestas patologias (WIENDL *et al.*, 2005; DIEPSTRA *et al.*, 2008). Devido às características imunológicas apresentadas pela molécula HLA-G, estudos indicam que a expressão de HLA-G por tecidos transplantados pode favorecer a sobrevida do enxerto e ainda pode indicar que a molécula pode ser usada para monitorar pacientes transplantados que aceitam os enxertos, podendo se beneficiar com a redução do tratamento imunossupressor (LEMAOULT *et al.*, 2003; QIU *et al.*, 2006).

2.2.2. Estrutura do Gene e da Molécula HLA-G

HLA-G é constituído por uma região promotora 5', que se estende por 1,4 kb desde o ATG, oito éxons e sete íntrons (SOLIER *et al.*, 2001). O gene possui algumas características únicas, por exemplo, um códon de término de leitura no éxon 6, e o éxon 8 como último éxon e a região 3'UTR (*Untranslated Region* - região não traduzida do RNA mensageiro), juntamente com um padrão particular de expressão por processamento alternativo (Figura 1) (CASTRO *et al.*, 2000; SOLIER *et al.*, 2001).

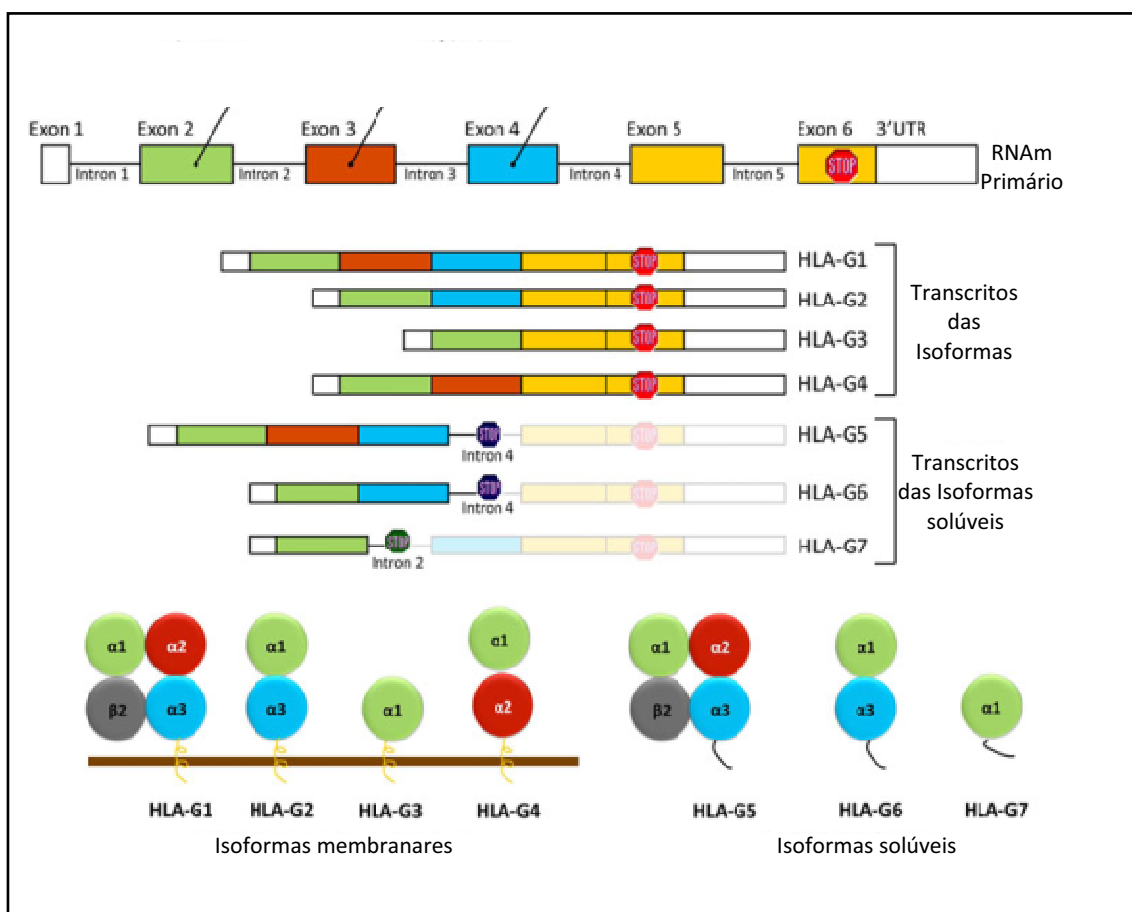


Figura 1. Representação esquemática do transcrito primário de HLA-G e das múltiplas isoformas (Modificado de DONADI *et al.*, 2011).

Até o momento foram reconhecidos 44 alelos de HLA-G, sendo que dois destes são nulos, G*01:13N (G*0103N) e HLA-G*01:05N (G*0105N). A maioria dos alelos

do gene apresentam variações na sequência de regiões codificadoras, sendo que a maior parte deles são substituições sinônimas. Apesar da quantidade de alelos, o HLA-G produz apenas sete tipos de proteínas diferentes geradas por processamento alternativo do transcrito primário (DONADI *et al.*, 2010).

O transcrito primário de HLA-G gera RNA mensageiros (RNAm) alternativos, que tem a capacidade de codificar as isoformas do gene, sendo quatro proteínas de membrana (HLA-G1, -G2, -G3 e -G4) e três proteínas solúveis (HLA-G5, -G6 e -G7) (PAUL *et al.*, 2000).

O HLA-G1 é a isoforma protéica cuja estrutura mais se assemelha à das moléculas HLA classe I clássicas (LE MAOULT *et al.*, 2003). Codifica proteínas com domínios extracelulares, $\alpha 1$, $\alpha 2$ e, $\alpha 3$, ligados ao domínio transmembrana codificado pelo éxon 5, e codifica também uma curta cauda citoplasmática, devido à presença de um códon prematuro de término de leitura presente no éxon 6 (GERAGHTY *et al.*, 1987).

Os transcritos HLA-G2, -G3, e -G4 excluem o éxon 3, os éxons 3 e 4 e o éxon 4 respectivamente, gerando isoformas truncadas que retêm somente o domínio $\alpha 1$ para isoforma -G3, o domínio $\alpha 1$ e $\alpha 3$ para -G2 e o domínio $\alpha 1$ e $\alpha 2$ para -G4, todos ancorados às células pela região transmembrana (PAUL *et al.*, 2000; CAROSELLA, *et al.*, 2011). A isoforma -G5 retém os domínios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ e, $\alpha 3$, incluindo um códon de término de leitura presente no íntron 4, o que determina sua forma solúvel, assim como na isoforma -G6, que por sua vez perde o domínio $\alpha 2$ (FUJII, *et al.*, 1994; PAUL *et al.*, 2000). O mesmo ocorre com -G7, que possui um códon de término de leitura presente no íntron 2 (PAUL *et al.*, 2000). Após a clivagem proteolítica de HLA-G1, podem ser encontradas moléculas solúveis HLA-G1, denominado *shed* HLA-G1 (HLA-G1s), o qual pode ser regulado pela ativação de NF- κ B (ROUAS-FREISS *et al.*,

2007; CAROSELLA *et al.*, 2011). Todas as isoformas possuem o domínio $\alpha 1$.

Uma vez que o éxon 7 de *HLA-G* está sempre ausente nos RNAm maduros e devido ao códon de término de leitura no éxon 6, o éxon 8 não é traduzido, sendo este a região 3' UTR do RNAm maduro. Essa região contém vários elementos de regulação, incluindo sinais de poliadenilação e *motifs* de repetição AU. A região 3'UTR tem função regulatória, como por exemplo, controle da expressão e influencia na estabilidade dos níveis de expressão de transcritos do RNAm. No entanto, ainda não foram descritas funções para todas as variações observadas (DONADI *et al.*, 2011).

2.2.3. Características Funcionais da Molécula HLA-G

HLA-G pode ser expresso nas células tumorais ou nos exossomas derivados do tumor, tanto na sua forma solúvel como ligado à membrana (RITEAU *et al.*, 2003; ROUAS-FREISS *et al.*, 2005). Essa expressão de HLA-G por células malignas pode impedir a rejeição imune ao tumor, devido à capacidade que a molécula HLA-G tem de inibir células *natural killer* (NK), linfócitos T citotóxicos e células apresentadoras de antígenos (APCs) (Figura 2).

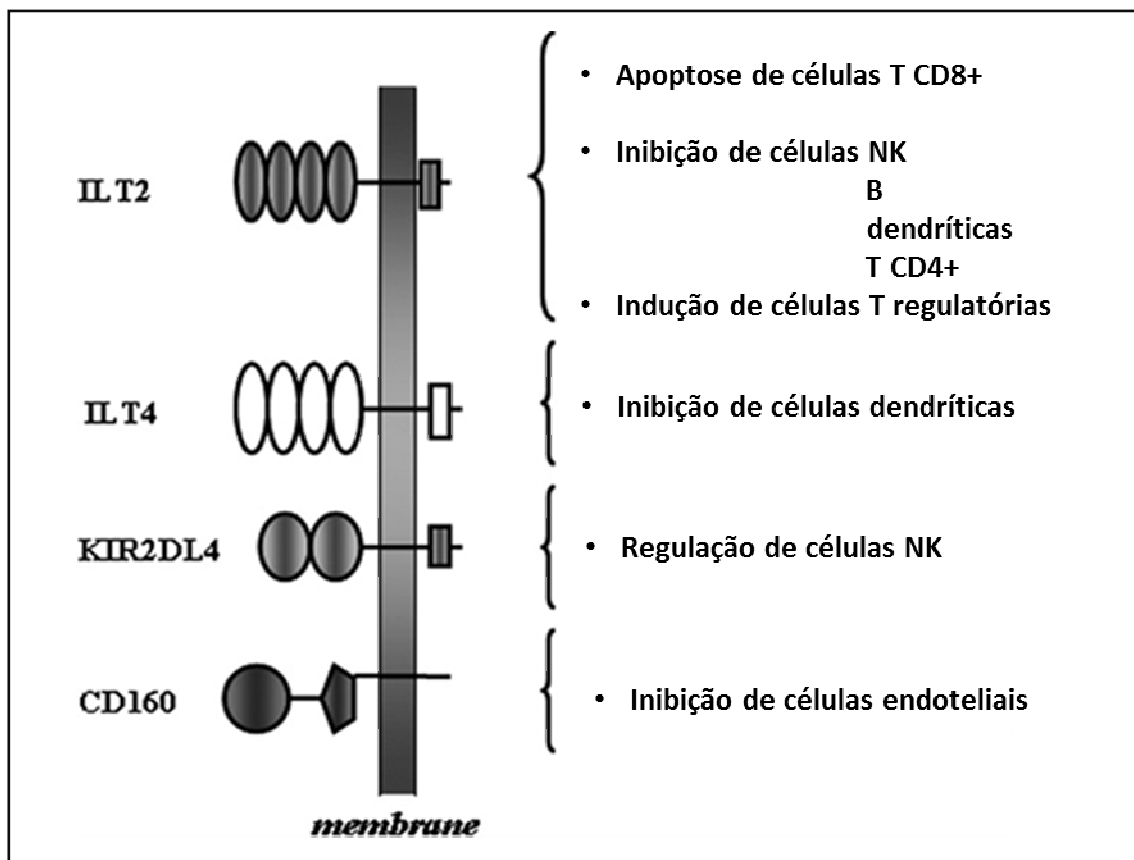


Figura 2. Receptores para HLA-G e suas funções. Receptores para HLA-G expressos em células imunes (LT CD4+ e CD8+, células B, *natural killer*, células dendríticas) e células endoteliais. ILT, *Immunoglobulin-Like Transcript*; KIR, *killer-cell immunoglobulin-like receptor* (RIZZO *et al.*, 2009).

Esta inibição ocorre através de sua ligação direta aos receptores inibitórios ILT (*Immunoglobulin-Like Transcript*), ILT-2 (LILRB1/CD85j), ILT-4 (LILRB2/CD85d), KIR2DL4 (CD158d) (*killer-cell immunoglobulin-like receptor, 2 domains, long cytoplasmic tail, 4*) e também CD160 (LE MAOULT *et al.*, 2005; FAINARD *et al.*, 2011), que é um receptor específico para HLA-G (SHIROISHI *et al.*, 2003). As expressões de HLA-G1 e de HLA-G5 são capazes de induzir o aumento da expressão de seus próprios receptores, ILT2 e ILT4 na APC, ILT2 e KIR2DL4 em células NK, e ILT2 e KIR2DL4 em linfócitos T CD4+, mas não em linfócitos T CD8+ (LE MAOULT *et al.*, 2005; FAINARD *et al.*, 2011). Estes dados mostram que a molécula HLA-G é capaz de alterar o equilíbrio do balanço de sinais de inibição *versus* estímulo,

favorecendo assim a inibição de sinais, e aumentando os limiares de ativação para estas células (ROUAS-FREISS *et al.*, 2007).

A molécula HLA-G5 exibe propriedades inibitórias e possui a capacidade de se ligar à CD8 e aos receptores inibitórios, tal como o HLA-G1. Na verdade, a isoforma solúvel HLA-G5 inibe células mediadoras de lise como NK e LT CD8+, e a resposta alogênica de linfócitos T citotóxicos. Por outro lado, existem relatos de que a molécula HLA-G5 pode induzir a apoptose de LT CD8+ ativados através da ligação de receptores Fas/Fas ligante de LT CD8+ e CD8. Além disso, HLA-G5 naturalmente produzido por LT CD4+ alorreativos, inibe a resposta proliferativa destas células, também exercendo o seu efeito inibitório através de um mecanismo de retroalimentação (CAROSELLA *et al.*, 2003). Uma vez que HLA-G pode ser expresso em células do sistema imune infiltrantes no tumor, bem como no sangue periférico de pacientes com câncer, a molécula pode suprimir a resposta imune de pacientes contra seu próprio tumor. APCs HLA-G positivas podem inibir a função de LT CD4+ e induzir sua diferenciação em células T reguladoras (AMIOT *et al.*, 2011).

As isoformas vinculadas à membrana atuam no local onde são expressas, entretanto, as isoformas solúveis, como por exemplo, HLA-G5, podem exercer suas funções em locais distantes de distribuição, através do sistema circulatório (ROUAS-FREISS *et al.*, 2005). A isoforma HLA-G5 foi encontrada influenciando a liberação de citocinas de células mononucleares de sangue periférico, estimulando a liberação de IL-10, TNF- α , e IFN- γ . Essas proteínas solúveis podem ter uma relevância particular, *in vivo*, uma vez que exerce as suas funções no seu ambiente próximo ao local de origem e/ou em sítios distantes, devido à distribuição através do sistema circulatório (CAROSELLA *et al.*, 2003). A este respeito, HLA-G tem sido responsável por modular

a liberação de citocinas a partir de sangue periférico e de células mononucleares em direção ao perfil Th2 (ROUAS-FREISS *et al.*, 2005).

Várias citocinas podem induzir a expressão de HLA-G, tais como GM-CSF (fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos), IL- 10, IFNs, e LIF (fator inibitório de leucócitos) (CAROSELLA *et al.*, 2008a). Curiosamente, a presença de IL-10, que é secretada por células de linfoma cutâneo, é responsável por induzir a expressão HLA-G *in vitro* e *in vivo*, e no caso do câncer de pulmão, a interleucina aparece fortemente associada à expressão de HLA-G. Devido a estas propriedades imunossupressoras, HLA-G junto a IL-10 podem contribuir para a evasão de células malignas da imunovigilância (UROSEVIC *et al.*, 2002). Além das citocinas, alguns hormônios produzidos durante a gravidez ou que estão presentes no microambiente tumoral, como é o caso dos glucocorticóides (MOREAU *et al.*, 2001) e da progesterona (YIE *et al.*, 2006; SZEKERES-BARTHO *et al.*, 2009), também são moduladores da expressão de HLA-G.

Tanto IFN- β como IFN- γ , parecem reforçar a expressão de HLA-G na superfície celular *in vitro* e mais recentemente *in vivo* (CAROSELLA *et al.*, 2003; MITSDOERFFER *et al.*, 2005). Esta mudança fenotípica pode conferir imunoproteção às células tumorais, facilitando a propagação tumoral no hospedeiro. Assim sendo, a administração de IFNs para imunoterapia de doenças malignas apresenta um potencial efeito colateral para o aumento da regulação positiva da expressão de HLA-G no local do tumor (ROUAS-FREISS *et al.*, 2007; CAROSELLA *et al.*, 2008a).

Contudo, a interação da molécula HLA-G com esses receptores não era suficiente para explicar o mecanismo de escape tumoral dependente de HLA-G. Assim, posteriormente, demonstrou-se que células NK ativadas adquirem a molécula HLA-G presente na membrana de células tumorais por meio de um mecanismo denominado

trogocitose. A trogocitose de HLA-G explica como em um ambiente heterogêneo, algumas células que expressam HLA-G podem proteger uma região maior, onde existem células que não expressam a molécula do ataque por células da resposta imune, onde estas perdem suas propriedades citotóxicas e se comportam como células reguladoras capazes de inibir as funções citotóxicas de outras células NK temporariamente (LE MAOULT *et al.*, 2007).

Isto é mais bem ilustrado no caso das células NK, que na aquisição de HLA-G, mudam o seu comportamento funcional de células de lise para células reguladoras de células tumorais (células alvo) protegendo-as. A trogocitose de HLA-G1 também representa um novo mecanismo de geração da regulação celular. Uma delas não envolve a maturação de células regulatórias de vida longa, e a outra envolve a conversão direta e imediata de células efectoras em células que adquirem temporariamente a função regulatória *in situ*, e assim proporcionam uma supressão imunológica local de emergência (CAROSELLA *et al.*, 2008b). Além de seu papel na inibição direta interagindo com receptores imunológicos, a molécula HLA-G também pode exercer seus efeitos imunossupressores através de uma via indireta, por favorecer a expressão de outra molécula de HLA classe I não- clássica imunomodulatória, a molécula HLA-E (LLANO *et al.*, 1998; IWASZKO & BOGUNIA-KUBIK, 2011).

Nos últimos anos, utilizar a expressão da proteína HLA-G em tecidos e níveis circulantes em fluídos corporais nas pesquisas como um marcador tumoral têm sido o foco de muitas pesquisas no diagnóstico e prognóstico de várias malignidades humanas. Além disso, esta molécula pode ser um alvo terapêutico promissor para abordagens imunológicas com base em suas funções imunes e tolerantes devido a sua expressão altamente específica para o câncer (YIE & HU, 2011).

2.3. Quimioprevenção

A quimioprevenção do câncer envolve retardo ou reversão do processo de carcinogênese através da ingestão de substâncias presentes na dieta ou até mesmo sintéticos (SPORN, 1979; HONG, 1997). A carcinogênese, portanto, pode ser evitada por uma série de substâncias naturais, que tem como propriedade comum elevar a atividade enzimática (enzimas de fase II) por um aumento na sua síntese e/ou diminuição da degradação da mesma (SONG *et al.*, 1999).

Em particular, a indução de enzimas de fase II pode oferecer proteção contra espécies químicas tóxicas e reativas. Estudos recentes tem demonstrado que a elevação de enzimas de fase II, como a NAD(P)H: quinona redutase (NQ1) e glutathione-S-transferase (GST), se correlacionam com a proteção contra a carcinogênese induzida em modelos animais, tanto na fase de promoção como iniciação do carcinoma (SONG *et al.*, 1999; GILLS *et al.*, 2006). Atualmente, avanços das pesquisas fornecem as bases para novas estratégias, especialmente a supressão de vias metabólicas de ativação de carcinógenos ou o bloqueio de sua formação (CUENDET *et al.*, 2006).

Sabe-se que os agentes quimiopreventivos podem atuar em diferentes etapas da carcinogênese, sendo classificados em agentes supressores ou agentes bloqueadores (Figura 3) (GIBELLINI *et al.*, 2011).

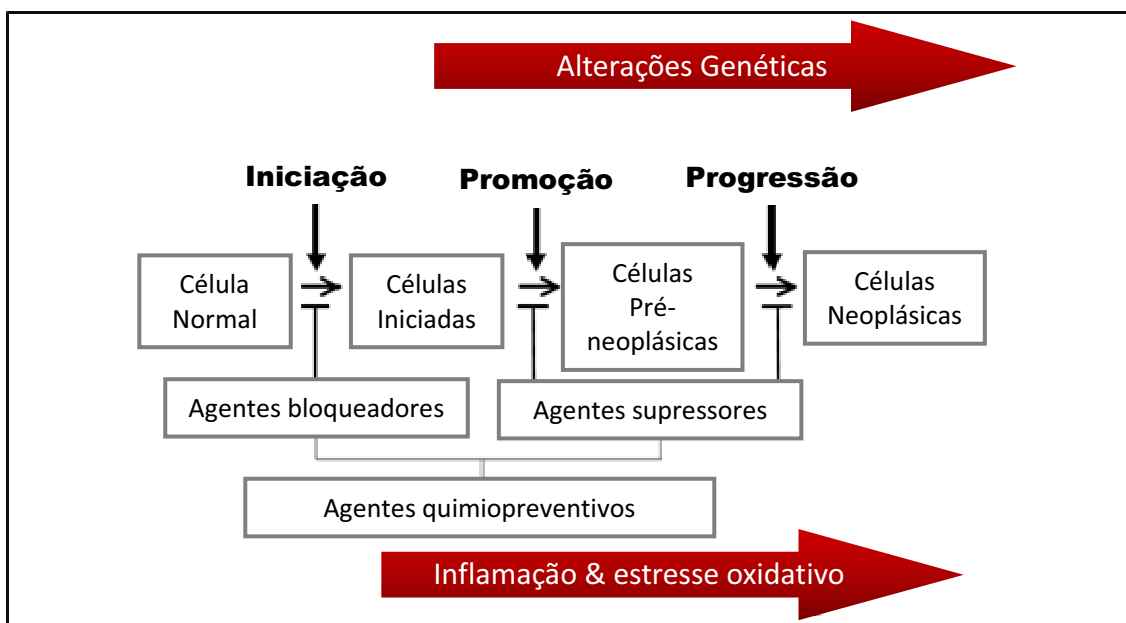


Figura 3. Carcinogênese é um processo de múltiplas etapas. A etapa de iniciação é iniciada pela transformação da célula normal (Modificado de SAW *et al.*, 2010).

Os agentes bloqueadores atuam prevenindo a fase inicial por meio de alguns mecanismos tais como a indução de enzimas de detoxificação, ou ainda, podem impedir que substâncias cancerígenas liguem-se a molécula de DNA através de processos relacionados a alterações de absorção, biotransformação e excreção do agente cancerígeno (WATTENBERG, 1985; SPORN, 2000).

Os agentes supressores atuam em eventos celulares críticos das etapas de promoção e progressão por meio de mecanismos de inibição do metabolismo do ácido araquidônico, indução da diferenciação celular, entre outros. Ainda muitas substâncias possuem dupla atividade, atuam de forma supressora e bloqueadora ao mesmo tempo, apresentando um efeito protetor potencializado, são os chamados inibidores. (MORSE & STONER 1993; SPORN, 2005).

Muitos produtos naturais são capazes de alterar o metabolismo de carcinógenos por meio da indução de enzimas microsossomais envolvidas na detoxificação do organismo, como NQ1 e GST. Uma das abordagens para impedir a carcinogênese é descobrir compostos indutores de enzimas de detoxificação, que possuem a capacidade

de convertem carcinógenos à baixa ou nenhuma reatividade. Várias classes de metabólitos secundários, tais como biflavonoides, fenois, flavonoides, isotiocianatos, indoís e organossulfurados podem induzir as enzimas desintoxicantes (CHEN & KONG, 2004).

Os agentes indutores das enzimas de metabolização são classificados em bifuncionais e monofuncionais, de acordo com o modo de atuação (PROCHASKA & TALALAY, 1988). Os bifuncionais induzem tanto as enzimas de fase II quanto as de fase I, principalmente os citocromos P450 (CYP), ativando a via de detoxificação pelo receptor de hidrocarboneto arila (AhR), o qual é translocado para o núcleo por meio da complexação com a proteína nuclear translocadora de AhR (ARNT). O complexo AhR-ARNT, no núcleo, liga-se ao fator de transcrição nuclear de elemento de resposta a xenobióticos (XRE) (Figura 4) (PROCHASKA *et al.*, 1992; CUENDET *et al.*, 2006).

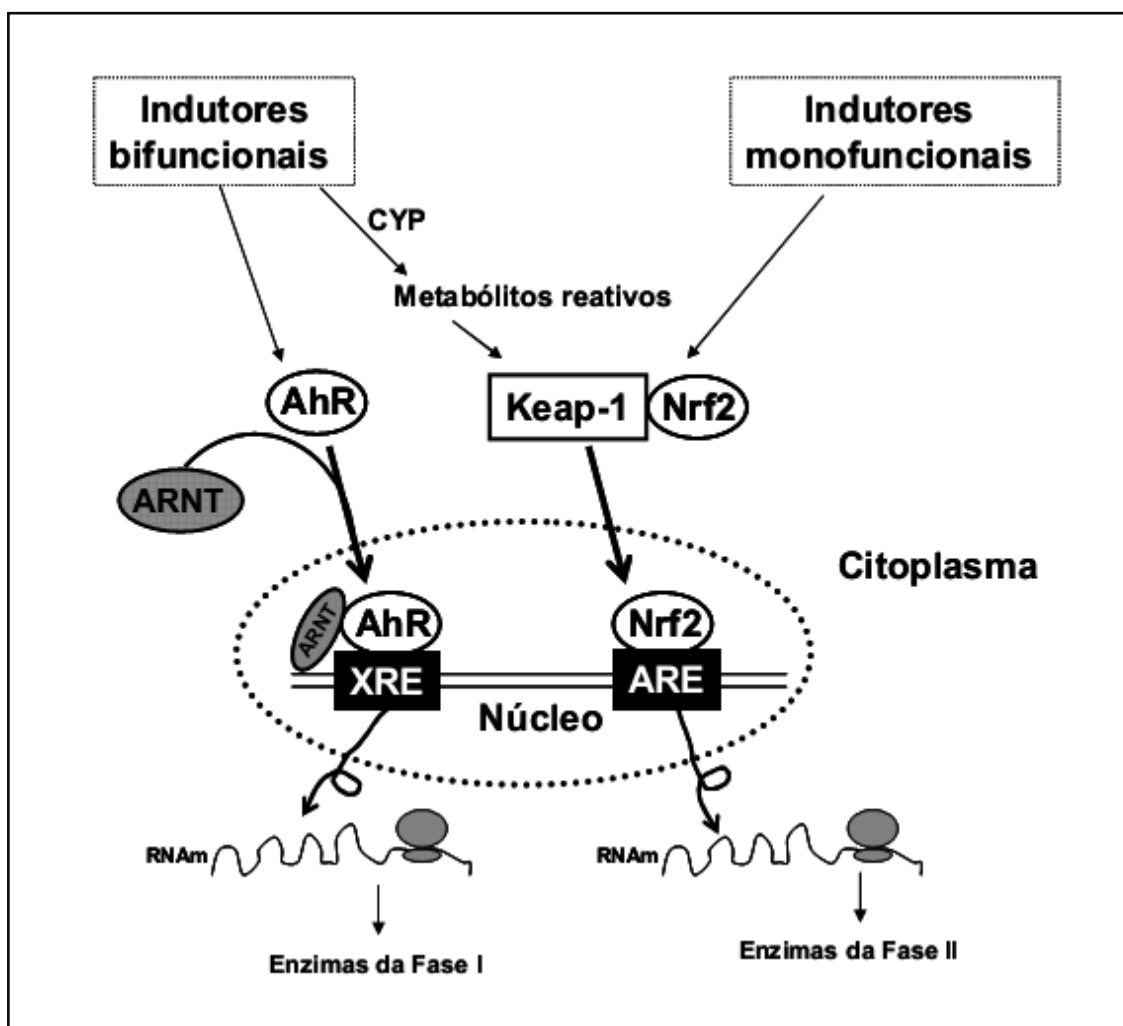


Figura 4. Indutores de enzimas de metabolização. Representação simplificada da regulação transcricional das enzimas de fase I e fase II pelos agentes indutores monofuncionais e bifuncionais (Modificado de ENDRINGER, 2007).

Os agentes monofuncionais induzem seletivamente as enzimas de fase II, promovendo o desligamento do complexo Keap 1 – Nrf2, posteriormente liberando o fator Nrf2, o qual é translocado para o núcleo, onde se liga ao fator de transcrição nuclear de resposta ao elemento antioxidante (ARE) (TALALAY, 2000; EGGLER *et al.*, 2005). As enzimas de fase I são requeridas na detoxificação dos elementos xenobióticos que podem atuar como agentes pró-carcinogênicos; pois estas enzimas estimulam a formação de espécies reativas (YANG *et al.*, 1994; TALALAY, 2000; CUENDET *et al.*, 2006). Dessa forma, agentes monofuncionais que ativem seletivamente as enzimas de fase II, tornam-se importantes candidatos a agentes

quimiopreventivos de câncer (YANG *et al.*, 1994; TALALAY, 2000).

Nos dias atuais está bem estabelecido que mutações podem ser causadas por erros durante o processo de duplicação da molécula de DNA, por mutágenos endógenos, tais como espécies reativas de oxigênio, ou induzidas por agentes externos: i) agentes físicos, como luz ultravioleta e radiações ionizantes; ii) agentes biológicos como é o caso de alguns vírus, que se integram ao genoma celular interrompendo sequências gênicas ou promovendo rearranjos gênicos; e iii) agentes químicos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e as nitrosaminas (GARDNER; 1986; ESTELLER & HERMAN, 2002, TRAN *et al.*, 2007).

Para evitar este risco genotóxico é pertinente identificar o envolvimento de mutágenos ambientais de modo a minimizar a exposição humana a eles, bem como aumentar a exposição aos agentes antimutagênicos, tais como os que ocorrem naturalmente em plantas (EDENHARDER *et al.*, 2002; IKUMA *et al.*, 2006; JEONG *et al.*, 2006). Paralelamente, estudos epidemiológicos revelam que dietas ricas em vegetais poderiam reduzir a incidência dos tumores em até 31%. Desde então estudos vêm sendo conduzidos a fim de identificar substâncias que possam apresentar alguma atividade genotóxica e/ou antigenotóxica (KUNDU & SURH 2005; CARIÑO-CORTÉS *et al.*, 2007).

A avaliação do potencial genotóxico, bem como do potencial antigenotóxico de produtos naturais vem sendo bastante explorada, tornando-se uma ferramenta interessante para avaliar a possível atividade quimiopreventiva de plantas. Nos últimos anos tem havido um crescente interesse no papel de medicamentos complementares e alternativos para o tratamento de várias doenças agudas e crônicas (ARUOMA *et al.*, 2006).

2.4. Biflavonoides

As plantas são fontes ricas de substâncias fenólicas, e tem sido reconhecidas por possuírem uma grande variedade de propriedades biológicas, incluindo antioxidantes, antibacterianas, anti-inflamatórias, hepatoprotetoras e anticarcinogênica (WINSLOW *et al.*, 1998; SEEF *et al.*, 2001).

Os flavonoides são caracterizados por serem um grupo grande e heterogêneo, derivados de benzo- γ -pirona que compartilham um esqueleto de carbono comum de difenilpropanos ($C_6-C_3-C_6$), ou seja, dois anéis de benzênicos unidos por uma cadeia de três carbonos linear que forma um heterociclo oxigenado (RAMOS, 2007). Os biflavonoides constituem uma classe de flavonoides diméricos, diferenciam-se de outros oligômeros como as proantocianidinas, devido à origem biogenética das unidades constituintes (SUZART *et al.*, 2007). Podem ser divididos em classes diferentes de acordo com suas estruturas moleculares, os principais grupos são chalconas, flavanóis, flavonas, flavanonas, flavonóis, isoflavonas e antocianinas (RAMOS, 2007).

A maioria dos representantes da classe dos biflavonoides é formada pelos dímeros flavona-flavona, flavona-flavanona, flavanona-flavanona além de ocorrerem, mais raramente, os dímeros de chalconas e de isoflavonas (CROZIER *et al.*, 2009).

Ainda, existem dois tipos gerais de ligação entre os biflavonoides, ligações C-C ou C-O-C, com o vínculo de ligação suscetível a diversas posições, por exemplo, 3"-4', 4'-4"', entre outras. Nos biflavonoides, muitos grupos hidroxílicos e metoxílicos são localizados em diferentes posições (SUZART *et al.*, 2007), portanto, estima-se que um grande número de biflavonoides possa existir, apesar das espécies de plantas que contém biflavonoides como principais constituintes não serem amplamente distribuídas, como é o caso das espécies de *Ginkgo biloba* e *Garcinia kola*. A amentoflavona e

ginkgetin são os biflavonoides mais comumente relatados, porém, a descoberta de novos biflavonoides com estruturas químicas originais de plantas tem crescido (REN *et al.*, 2010).

Garcinia xanthochymus Hook.f. (Clusiaceae) é uma planta medicinal nativa de países asiáticos como China, Tailândia e Índia (WHITMORE, 1973; CHEN *et al.*, 2008). A maioria das espécies está localizada nos trópicos como árvores ou arbustos que crescem 10-20 metros de altura (Figura 5A) (CHEN *et al.*, 2008), sendo atualmente cultivada em alguns países tropicais da África, América do Sul e Austrália. No Brasil, as espécies mais cultivadas são *G. xanthochymus* e *G. gardneriana* juntamente com a espécie nativa *G. brasiliensis*.



Figura 5. (A) Árvore, (B) folhas e (C) frutos de *Garcinia xanthochymus*. (Gardening with Wilson, acessado em: jul. 2012).

A planta *G. xanthochymus* também é conhecida como *G. tinctoria*, por possuir propriedades corantes utilizadas em aquarelas e tecidos, e popularmente designada por

uma variedade de nomes, tais como gamboja e falso mangostão (BAGGET *et al.*, 2005). As árvores possuem grandes folhas verdes escuras e frutos amarelos ácidos (Figura 5B e C) comestíveis que geralmente contêm duas sementes rodeadas por uma polpa amarela. O fruto da *G. xanthochymus* tem sido amplamente utilizado como um medicamento tradicional para a diarreia e disenteria (AMBASTA, 1986; BAGGETT, 2005).

FERNANDES (2010) realizou profunda revisão bibliográfica sobre estudos fitoquímicos das folhas, frutos, cascas e caules de *G. xanthochymus*, bem como o isolamento de determinadas frações purificadas e substâncias isoladas dos frutos e das folhas. O autor relata a presença de benzofenonas, flavonoides, biflavonoides, triterpenos e xantonas extraídos da planta, e descreve algumas de suas propriedades biológicas, como funções analgésicas, antibacterianas, antioxidantes, antivirais e antitumorais.

2.4.1. Morelloflavona

Morelloflavona ou fukugetina (5, 7, 4', 5", 7", 3"', 4'''-heptahydroxy-[3,8"]-flavonilflavanona) é um biflavonoide constituído por uma unidade flavanona e outra flavona ligadas covalentemente – correspondentes à naringenina e luteolina, respectivamente, e que pode ser isolada de *G. xanthochymus* (Figura 6). Até o momento, poucos são os dados existentes sobre as propriedades biológicas deste biflavonoide na literatura. Há algum tempo, foi demonstrada sua atividade antiviral (LIN *et al.*, 1997) e anti-inflamatória (GIL *et al.*, 1997). Recentemente, foram demonstradas as propriedades antitumorigênicas e antiangiogênicas da morelloflavona por meio de ensaios *in vitro* (PANG *et al.*, 2009; PINKAEW *et al.*, 2009).

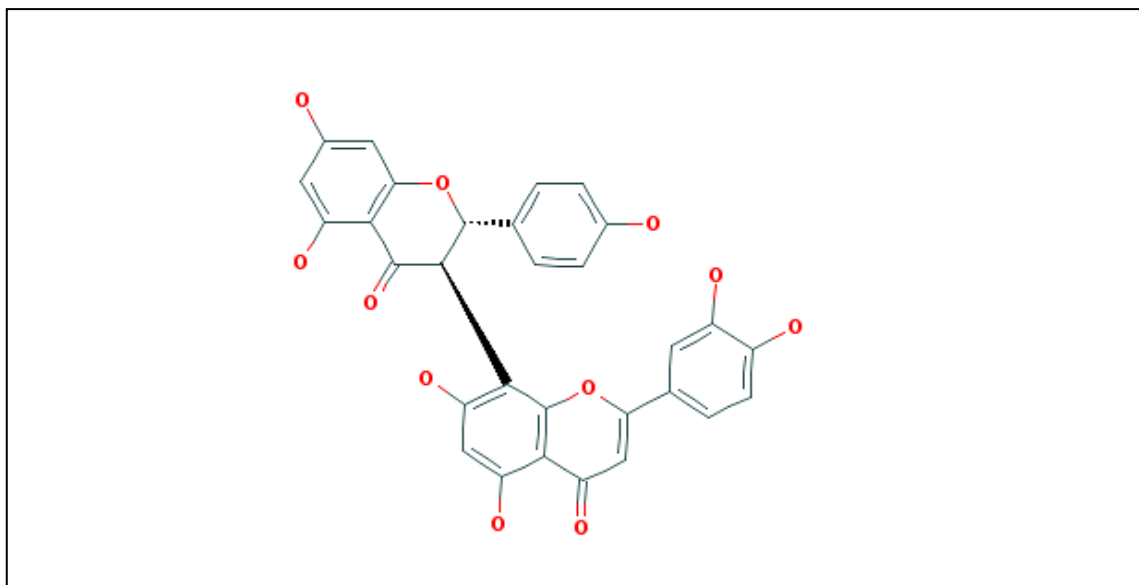


Figura 6. Estrutura química de morelloflavona. Peso molecular: 556,4732; fórmula molecular: C₃₀H₂₀O₁₁ (PUBCHEM COMPOUND, 2012).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

O presente estudo tem por objetivo avaliar a regulação da expressão de HLA-G nas linhagens celulares humanas de carcinoma que expressam (FON, JEG-3 e M8HLA-G1) e que não expressam (M8) HLA-G, bem como avaliar o potencial quimiopreventivo nas linhagens de hepatocarcinoma murino (Hepa1c1c7) e humano (HepG2) frente ao tratamento com morelloflavona em diferentes concentrações.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade em PBMC - *Peripheral blood mononuclear cells* (células mononucleares do sangue periférico) por meio do ensaio de Anexina V-Iodeto de propídio (IP);
- Avaliar a expressão protéica da molécula HLA-G vinculada à membrana (HLA-G1);
- Avaliar a expressão protéica da molécula HLA-G solúvel (HLA-Gs) por meio do ensaio imunoenzimático- Elisa;
- Avaliar a expressão de RNAm de HLA-G;
- Caracterizar a capacidade de indução da enzima NAD(P)H: quinona redutase;
- Caracterizar o potencial genotóxico;
- Caracterizar o potencial antigenotóxico a partir de concentrações não genotóxicas.

4. Materiais e Métodos

4.1. Extração e Purificação da Morelloflavona

Os processos de extração e purificação de morelloflavona foram realizados no NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese, e Ecofisiologia de Produtos Naturais) com a colaboração da Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira da Silva e Ms. Daniara Fernandes do Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, UNESP - Araraquara. Para a elucidação estrutural do biflavonoide foram empregadas técnicas espectrométricas como Ressonância Magnética Nuclear mono- e bidimensionais, Espectrometria de Massas (EM), Espectrometria no infravermelho (IV) e Espectrometria no ultravioleta (UV).

As folhas de *G. xanthochymus* foram coletadas no Campus da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP) - Jaboticabal em maio de 2008, sendo identificados pelo Prof. Antonio Baldo G. Martins (ESA88276).

As folhas foram secas em estufa a 40 °C e pulverizadas em moinho de facas. Os produtos obtidos foram submetidos ao processo de extração por maceração em hexanos (3x), com posterior maceração em etanol (3x), fornecendo as soluções hexânica e etanólica, respectivamente. Essas soluções foram evaporadas a pressão reduzida e forneceram os extratos hexânico (Hex) e etanólico (EtOH), respectivamente. O extrato etanólico foi solubilizado em uma mistura de água: metanol (3:2) e então submetido à extração líquido-líquido (ELL), empregando hexanos, AcOEt e *n*-BuOH como contrafase. A fração AcOEt sofreu sucessivas etapas cromatográficas (cromatografia de permeação em gel e cromatografia de fase reversa), levando ao isolamento da morelloflavona.

4.2. Linhagens Celulares e Cultivo Celular

As linhagens celulares M8 (HLA-A, -B, -C, -E positiva; HLA-G, -DP, -DQ, -DR negativa) (PAUL *et al.*, 1998) e FON (HLA-A, -B, -C, -E, -G1 positiva) (DUFOUR *et al.*, 1997) são derivadas de lesões primárias de melanoma humano. A linhagem celular FON foi escolhida por expressar constitutivamente a molécula de HLA-G ancorada à sua membrana celular. Adicionalmente, como linhagens celulares não tumorais foram utilizados PBMC de doadores saudáveis voluntários, cedidos pela equipe de PhD. Nathalie Rouas-Freiss (Commissariat à l'Energie Atomique/ Paris VII Université, Service de Recherches en Hémato-Immunologie). As linhagens acima citadas foram cultivadas e mantidas em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*) (Sigma-Aldrich, França). Células M8 transfectadas com o plasmídeo contendo HLA-G1 DNA complementar (DNAc) (M8-HLA-G1) ou com pcDNA3.1/hygro vetor vazio (-) (M8-pcDNA) (RITEAU *et al.*, 2001) foram mantidas em meio RPMI 1640 contendo 100 ug/mL de higromicina B (Sigma-Aldrich, França). A linhagem de coriocarcinoma cervical humano JEG-3 HLA-G1-positiva (HTB-36 American Type Culture Collection-ATCC), foi mantida em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) com Glutamax-I (Sigma-Aldrich, França) suplementado com 4500mg/L de glicose e 1mM de piruvato de sódio (Invitrogen, EUA). As linhagens acima citadas foram cultivadas com adição de gentamicina (10 mg/L; Invitrogen, EUA) e fungizona (250 ug/L; Invitrogen, EUA) ao meio de cultura.

As células da linhagem de hepatocarcinoma celular murino Hepa 1c1c7 (CRL-2026 ATCC) foram cultivadas em meio α -MEM (*Alfa modified of Eagle Medium*) (Sigma-Aldrich, França) sem ribonucleosídeos ou desoxirribonucleosídeos, acrescido de estreptomicina 0,1 mg/mL e penicilina 100 U/mL. A linhagem de hepatocarcinoma

celular humano HepG2 (HB-8065 ATCC) foi mantida em meio DMEM acrescido de penicilina 100 U/mL e estreptomicina 0,1 mg/mL.

Todas as culturas foram também suplementadas com 10% de soro fetal bovino inativado-FCS (Invitrogen, EUA) e mantidas a 37°C em atmosfera humida com 5% de CO₂. As linhagens aderentes sofreram remoção com a solução de tripsina (0,25%+EDTA 1mM) em solução salina tamponada (PBS) pH 7,4 quando necessário.

Somente após 24 horas de plaqueamento as células foram tratadas em diferentes concentrações e tempos de tratamento com morelloflavona, previamente diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) de tal forma que a concentração final deste solvente, não excedesse 0,5%. Foram utilizadas diversas concentrações e os tempos de tratamento foram estabelecidos de acordo com cada ensaio. No controle negativo, as células cresceram na ausência do composto, isto é, somente em meio de cultura. Adicionalmente, foi utilizado um controle de veículo (DMSO), no qual as células foram cultivadas em 0,5% de DMSO diluído em meio de cultura. Todas as células foram novamente mantidas a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até o final do período de exposição das células à morelloflavona (24, 48 e 72 horas). No entanto, para o ensaio com PBMC (cultivo em suspensão), o tratamento foi realizado logo após a obtenção das células, e esses foram tratados por 18 horas.

4.3. Citometria de Fluxo

4.3.1. Anexina V - Iodeto de Propídio

A fim de avaliar os índices de morte celular por apoptose e necrose causados pela morelloflavona, decidiu-se realizar o ensaio de Anexina V - Iodeto de Propídio em

PBMC. O ensaio de Anexina V- Iodeto de Propídio foi escolhido por ser rápido e sensível para a detecção de apoptose precoce, tardia e necrose nas alterações nucleares, tais como a fragmentação de DNA (VAN DEN EIJNDE *et al.*, 1997; WATANABE *et al.*, 2002). A ligação da Anexina V às células tratadas foi analisada utilizando-se o kit de detecção de apoptose por Anexina V marcada com FITC (isotiocianato de fluoresceína) (Alexis, Suíça). Após tratamento das células nas concentrações 60, 100, 200, 300 μ M durante 18 horas, foi realizada a citometria de fluxo. Para o ensaio, cerca de 10^5 células foram exaustivamente lavadas com PBS contendo 2% de FCS e centrifugação a 2.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o material celular ressuspendido com 500 μ L de tampão de ligação, 5 μ L de Anexina V conjugada com FITC, e 5 μ L de iodeto de propídio. A leitura foi realizada no citômetro de fluxo EPICS XL (Beckman Coulter, França) utilizando-se o programa Expo-32 (Beckman Coulter, França).

4.3.2. Expressão de HLA-G1

Para a determinação das moléculas de HLA-G vinculadas à membrana (HLA-G1) foi realizado o ensaio de citometria de fluxo nas linhagens que expressam (FON, M8HLA-G1 e JEG-3). Após tratamento das células propostas para o ensaio com morelloflavona nas concentrações 60, 80, 100, 120 e 140 μ M durante 48 e 72 horas, foi realizada a citometria de fluxo.

Para o ensaio, cerca de 2×10^5 foram contadas e analisadas pelo Azul de Tripán. Resumidamente, m microscópio óptico, células viáveis apresentam auto-fluorescência e membrana bem defina, enquanto células não-viáveis incorporam o corante, apresentando membranas disformes e núcleo corado em azul. Após o preparo da

suspensão celular, as células foram intensamente lavadas com PBS contendo 2% de FCS. Posteriormente ao tratamento com o biflavonoide, as células foram tripsinizadas e submetidas à centrifugação a 2.000 rpm por 2 minutos, com solução de PBS e FCS 2%. O sobrenadante foi descartado e o material celular ressuspensionado com o anticorpo monoclonal anti- HLA-G conjugado com ficoeritrina (1:100), clone MEM-G/9 (Exbio, República Tcheca), o qual possui a capacidade de reconhecer a molécula HLA-G associada à β_2 -microglobulina. Como controle isotípico, foi utilizado o anticorpo murino monoclonal IgG1 conjugado com ficoeritrina (1:100), clone PPV-06 (Exbio, República Tcheca). Os tubos contendo a suspensão celular foram incubados a 4 °C por 30 minutos ao abrigo da luz. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de solução de PBS/FCS 2 %, e as amostras foram novamente submetidas à centrifugação, 1.600 rpm por 5 minutos a 4 °C. A leitura foi realizada no citômetro de fluxo EPICS XL (Beckman Coulter, França) utilizando-se o programa Expo-32 (Beckman Coulter, França).

4.4. Ensaio Imunoenzimático – ELISA

Para a determinação das moléculas de HLA-Gs, foi realizado o ensaio imunoenzimático – ELISA (*Enzyme-linked immunoabsorbent assay*) nas linhagens FON, M8HLA-G1 e JEG-3. No ensaio foi utilizado o sobrenadante das linhagens após 48 e 72 horas de tratamento com a morelloflavona nas concentrações 60, 80, 100, 120 e 140 μ M na busca da proteína solúvel, ou seja, *shed* HLA-G1 (HLA-G1s). Para isto, foi utilizado anticorpo monoclonal anti- HLA-G, clone MEM-G/9 (1:100) (Exbio, República Tcheca) para a sensibilização da placa, realizada durante a noite à 4 °C. A placa foi então submetida a sucessivas lavagens com tampão PBS/Tween 2 %, foi adicionada a solução bloqueadora, e a placa foi submetida a leve agitação por uma hora

e meia. A placa foi lavada e foram adicionadas as amostras em triplicata. Foram utilizados três controles para o ensaio, i) controle branco, no qual foi utilizado o diluente utilizado nas amostras, ii) controle negativo no qual foi utilizado o sobrenadante da cultura celular de M8 pcDNA (plasmídeo vazio), e iii) controle positivo no qual utilizou-se o sobrenadante da cultura celular de M8-HLA-G5 (M8 transfectada com o plasmídeo HLA-G5). Novamente a placa foi submetida a leve agitação por uma hora e meia e sucessivas lavagens. Em seguida, foi adicionado o anticorpo de detecção policlonal anti- β_2 -microglobulina humana, clone B2M conjugado com peroxidase (HRP- *Horseradish Peroxidase*) (Dako Corporation, EUA) e colocado sob agitação por uma hora a 37 °C. Após, foi adicionado o substrato tetrametilbenzidina (Dako Corporation, EUA) por 30 minutos no escuro, e interrompeu-se a reação com HCl. A densidade óptica foi calibrada para 450 nm em espectrofotômetro de microplaca (Biotek Instruments, França).

As concentrações da molécula solúvel HLA-G foram determinadas por interpolação a partir da curva padrão. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em ng/mL.

4.5. PCR em Tempo Real (RT-PCR)

O uso da PCR em tempo real para quantificar níveis de expressão de RNAm de interesse requer primeiramente o isolamento do RNA, conversão do mesmo em DNAc pela enzima transcriptase reversa e finalmente a amplificação e detecção dos produtos gerados em RT-PCR.

4.5.1. Extração de RNA total

A extração do RNA total foi realizada após o tratamento de M8 (não expressa HLA-G constitutivamente com morelloflavona por 48 e 72 horas em diferentes concentrações (60, 80, 100, 120 e 140 μM) utilizando-se o Kit RNeasy mini (Qiagen, EUA) na linhagem M8, a qual não expressa *HLA-G* constitutivamente. Primeiramente as células foram lisadas com 350 μL de tampão RLT. Posteriormente, foi adicionado 350 μL de etanol 100% para diluir o RNA, e a amostra (700 μL) foi transferida para a coluna. Após centrifugação de 15 segundos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e adicionado 350 μL de tampão RW1. As amostras foram novamente submetidas à centrifugação (15 segundos e 10.000 rpm) e foram adicionados 80 μL de DNase:tampão RDD e mantida em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente. Realizou-se mais uma lavagem com 600 μL tampão RW1, centrifugação a 15 segundos e 10.000 rpm. Adicionou-se 500 μL do tampão RPE à coluna e a mesma foi submetida a centrifugação, 15 segundos a 10.000 rpm, e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 500 μL do tampão RPE para lavar a membrana da coluna e realizada centrifugação por 2 minutos a 10.000 rpm. Em um novo tubo coletor de 1,5 mL, adicionou-se 30 μL de água RNase-free diretamente sobre a membrana e centrifugou-se durante 1 minuto a 10.000 rpm. As amostras foram armazenadas a -80°C .

4.5.2. Quantificação do RNA Total

Para a quantificação de RNA total das amostras, uma alíquota de 3 μL foi diluída em 600 μL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e analisada por espectrofotometria utilizando o aparelho BioPhotometer Eppendorf (Rochester, EUA).

A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, para estimativa da concentração de RNA/ μ L nas amostras.

4.5.3. Síntese do DNA complementar (DNAC)

A síntese do DNAC foi realizada a partir de 2 μ g ou 1 μ g de RNA total, utilizando-se oligonucleotídeos complementares à cauda poli-A característica do RNAm, produzindo um DNAC puro, exclusivamente a partir do RNAm. Para a reação de síntese, 1 μ g de RNA total foram acrescentados a 10 μ L água tratada com DEPC e submetido 65°C por 5 minutos para desnaturação do RNA. Após, foi adicionado o *mix* de dNTPs 20 mM 1 μ L, 1 μ L de oligo(dT) 12-18 (50 ng/ μ l), 4 μ l de tampão de reação (5x), 2 μ L de DTT (100 mM), 0,5 μ L de RNAsin (40 U/ μ L), 1 μ L de água tratada com DEPC e 1 μ L da enzima M-MLV-RT- *Transcriptase reversa Moloney Murine Leukemia Virus* (Invitrogen, EUA). Esta mistura foi incubada por 10 minutos a 25 °C, seguida de incubação por 60 minutos a 42 °C e 8 minutos a 95 °C para que a reação de síntese do DNAC ocorresse. A concentração e a pureza de DNAC foram determinadas através de espectrofotometria a 260 nm e pela razão 260/230 e 260/280 nm, respectivamente, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (ThermoScientific, EUA). O DNAC sintetizado foi armazenado a -20 °C até a amplificação por PCR.

4.5.4. Amplificação e detecção dos produtos gerados em RT-PCR

As reações da PCR foram preparadas utilizando-se o conjunto de reagentes TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA) no termociclador ABI Prism 7000 sds (Applied Biosystems, EUA). Neste ensaio foram utilizados 2 μ L de

DNAc de cada amostra, 12,5 µL de Master Mix TaqMan 2X (Roche, Suíça), 1,25 µL GAPDH, 0,75 µL de cada *primer* (10 µM), 1 µL de sonda HLA-G 5 pmol/µL (Applied Biosystems, EUA) e 6,75 µL de água tratada com DEPC completando o volume final para 25 µL. Para a reação, as amostras foram submetidas às seguintes condições de ciclagem: Um ciclo de 50°C durante 2 minutos; um ciclo de 95°C durante 10 minutos; e quarenta ciclos de 95 °C durante 15 segundos e 60 °C durante 1 minuto. Por fim, foi empregado um ciclo final de 20 minutos com temperatura crescente de 60 a 95 °C para obtenção da curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para análise da especificidade da amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de *threshold cycle* (Ct) ou linha de corte, definido após a reação, sendo este ponto correspondente ao momento da reação, onde a amplificação atinge um limiar, que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado em relação ao gene de referencia humano GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase).

4.6. Ensaio de NAD(P)H: quinona redutase (NQ1)

Cerca de 1×10^4 células/mL Hepa1c1c7 foram cultivadas com morelloflavona por 48 horas em diferentes concentrações (2,2; 4,4; 8,9; 17,9; 35,9 µM) para que ocorresse a possível indução enzimática. Após o tratamento, o meio de cultura foi descartado e adicionou-se 50 µL de solução de lise. A placa foi então incubada por 10 minutos a 37 °C. Para facilitar a lise celular, as placas foram agitadas manualmente por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a lise, avaliou-se a atividade da NQ1 com a adição de 200 µL da solução de ensaio. A placa foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Posteriormente foi realizada a leitura, na qual a absorbância foi medida usando um leitor de iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, EUA) a 595 nm

(PROCHASKA *et al.*, 1988; GROSS *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 2004). A potência de indução enzimática da NQ1 é expressa em unidades por grama (U/g). Uma unidade de atividade indutora de NQ1 é definida com a quantidade de produto natural necessário para duplicar a atividade específica da NQ1 em relação a células não tratadas (PROCHASKA *et al.*, 1988; GROSS *et al.*, 2000).

A viabilidade celular foi determinada em uma placa de 96 poços, concomitantemente à reação de determinação da NQ1. O ensaio de violeta cristal foi realizado com algumas modificações, de acordo com a metodologia descrita por Kang (2004) e Lin (1997). Este método foi utilizado para avaliar a viabilidade celular frente ao tratamento com o biflavonoide escolhido. A coloração por violeta cristal reflete a perda da monocamada celular através da quantidade total de proteína (KANG *et al.*, 2004) ou ácido nucléico (GILLIES *et al.*, 1986), envolvendo a estimativa de mudanças das células tratadas quando comparadas com células que não foram submetidas a tratamento, pois o dano ocasionado na célula resulta na diminuição do número de células aderidas (MICKUVIENE *et al.*, 2004).

Então, após 48 horas, os tratamentos foram removidos, e as células foram coradas utilizando 100 µL de solução 0,2% violeta cristal em 2% etanol. O corante foi desprezado e a placa foi lavada em água corrente e seca naturalmente. Para leitura espectrofotométrica, o violeta cristal foi solubilizado em 200 µL de 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS) em 50% de etanol e mantida a temperatura ambiente no agitador para solubilizar o corante completamente. A leitura foi realizada também com absorbância a 595nm, utilizando leitor de placas iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, EUA) (PROCHASKA *et al.*, 1992). Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram comparados com controle positivo (β - Naftoflavona, 0,1 M).

4.7. Ensaio do Cometa

4.7.1. Avaliação de Genotoxicidade

O ensaio do cometa foi realizado com o objetivo de avaliar a possível genotoxicidade da morelloflavona em células HepG2 e o protocolo foi seguido de acordo com Singh e colaboradores (1988). Resumidamente, as células foram embebidas em agarose, submetidas à solução de lise, e com o relaxamento promovido pelo tampão alcalino ($\text{pH} > 13$) os fragmentos de DNA podem migrar em direção ao pólo na eletroforese, formando uma espécie de cauda que em conjunto com a célula é denominada cometa (WOLFF & MÜLLER, 2006)

A suspensão celular de $2,5 \times 10^5$ células/poço foi cultivada com morelloflavona durante 48 horas, e as concentrações foram escolhidas a partir da indução da NQ1 e duas concentrações adicionais, ou seja, uma concentração abaixo e outra acima daquela que apresentou atividade quimiopreventiva, 4,4; 8,9; 2,2 μM , respectivamente. A partir das concentrações que apresentaram potencial genotóxico decidiu-se testar concentrações mais baixas (0,54 e 1,1 μM) a fim de encontrar concentrações não genotóxicas. Como controle negativo foi utilizado células não tratadas, e como controle positivo células tratadas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 0,1 M por 5 minutos. Ainda, utilizou-se o controle de veículo, no qual as células foram tratadas com DMSO. Os tratamentos foram realizados em duplicata e por 24 horas.

Posteriormente, os tratamentos foram removidos, as células foram lavadas com solução de Hanks (solução tamponada de sais enriquecida com aminoácidos), tripsinizadas e centrifugadas a 1500rpm por 3 minutos. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se solução de Hanks, para retirar o máximo possível de meio

de cultura restante, pois este pode interferir na agarose LMP diminuindo sua adesão à lâmina. As células foram então centrifugadas novamente, no qual foi retirado o sobrenadante. As células precipitadas foram ressuspensas em 200 µL de LMP e destas foram transferidos 100 µL da mistura cuidadosamente para uma lâmina previamente preparada com agarose ponto de fusão normal, esta transferência foi feita em duplicata, ou seja, duas lâminas por concentração. Foi colocada uma lamínula (24x60 mm) sobre as lâminas e estas foram submetidas a 4 °C ao abrigo da luz por 5 minutos. Então as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram mergulhadas em solução de lise recém preparada a 4 °C por um período mínimo de 12 horas sob refrigeração e ao abrigo da luz.

As lâminas foram retiradas da solução de lise e colocadas na cuba eletroforética sob a adição da solução tampão de eletroforese a 4 °C. Deixou-se descansar 20 minutos para que houvesse o relaxamento das fitas de DNA. Após, as lâminas foram submetidas à corrida eletroforética por 20 minutos a 25 volts; a miliamperagem e a potência foram reguladas de acordo com a quantidade de solução colocada na cuba. Após a eletroforese alcalina, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas em solução de neutralização a 4 °C por 15 minutos. As lâminas foram fixadas em etanol 100 % e reservadas a temperatura ambiente.

Para coloração das lâminas, foi utilizado 20 µL de solução de brometo de etídio por lâmina e, posteriormente, a lâmina foi coberta com uma lamínula. A leitura das lâminas foi realizada imediatamente após a coloração em um microscópio de fluorescência com filtro de 516-560 nm, barreira de filtro de 590 nm e aumento total de 400 vezes. Esse aumento permitiu a observação de imagens microscópicas com contorno circular, indicando que não houve danos ao DNA ou núcleo celular fragmentado em forma de “cometa” o que significa possíveis danos ao DNA. Foram capturadas imagens de 100 nucleóides, por alíquota de células e analisadas pelo

programa TriTek *CometScore*TM versão 1.5. O parâmetro adotado no presente estudo foi a porcentagem (%) de DNA na cauda (*Tail Moment*) que nos permite analisar a quantidade de DNA fragmentado (MOLLER, 2005).

4.7.2. Avaliação de Antigenotoxicidade

Para avaliação da antigenotoxicidade da morelloflavona foi utilizado como agente indutor de dano o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na linhagem HepG2. Foram empregados os protocolos de pré-tratamento e pós-tratamento, segundo proposto por Scolastici e colaboradores (2008). Esses dois protocolos de tratamento permitiram a identificação do mecanismo de ação antigenotóxica das diferentes concentrações do biflavonoide. O ensaio de antigenotoxicidade foi realizado a partir de concentrações não genotóxicas obtidas pelo ensaio de genotoxicidade, no qual se estabeleceu a concentração em que não ocorreu dano significativo quando comparado ao controle negativo.

Após 24 horas do plaqueamento as células HepG2 foram tratadas da seguinte forma: no pré-tratamento as células foram submetidas à diferentes concentrações da morelloflavona diluída (diluição seriada) em meio DMEN não suplementado com FCS, resultando em um volume final de 500 μ L/poço por 24 horas. Passado o tempo de tratamento, o meio foi removido e foi adicionado o H_2O_2 a 0,1M por 5 minutos. Em seguida, as células foram tripsinizadas e o protocolo foi realizado como descrito anteriormente; no pós-tratamento, após 24 horas de plaqueamento as células HepG2 foram submetidas ao indutor de dano, H_2O_2 a 0,1M por 5 minutos, depois desse período o H_2O_2 foi removido e a morelloflavona foi adicionada. Após 24 horas o meio foi

removido e as células foram tripsinizadas e o protocolo foi realizado como descrito anteriormente.

4.8. Análise Estatística

Para as análises dos dados obtidos da apoptose, análise da expressão de HLA-G e do potencial de indução de NQ1 a partir do tratamento com morelloflavona foi utilizada a análise de variância One Way ANOVA com pós-teste de Tukey, utilizada para analisar dados paramétricos. Para a comparação dos resultados quantitativos de genotoxicidade/antigenotoxicidade do tratamento com a morelloflavona comparadas com o controle negativo e positivo respectivamente foi aplicado a análise de variância *Kruskal wallis* com pós-teste de Dunn para dados não- paramétricos. Em todos os testes estatísticos foi considerado o nível de significância de $p < 0,05$ através do programa GraphPad Prism 5.0.

5. Resultados

5.1. Citometria de Fluxo

5.1.1. Análise de Anexina V- Iodeto de Propídio

Para a detecção de apoptose recente, a recomendação é que se utilize a Anexina V conjugada ao FITC, que se liga preferencialmente a uma fosfatidilserina que faz a translocação para o exterior da membrana plasmática no momento da apoptose, combinada ao iodeto de propídio. A célula positiva para Anexina V e para Iodeto de Propídio é uma célula necrótica, enquanto que uma célula somente positiva para Anexina V e negativa para Iodeto de Propídio é uma célula apoptótica (WADA *et al.*, 2003).

Sendo assim, escolheu-se realizar o ensaio de Anexina V marcada com FITC e Iodeto de Propídio com o intuito de verificar a possível atividade citotóxica da morelloflavona em células normais. No presente estudo, foram realizados três experimentos independentes em PBMC obtidos de doadores voluntários saudáveis. Pôde-se observar que a morelloflavona induziu apoptose nas células monucleares entre as concentrações 60 e 200 μM ($p < 0,01$), aumentando o índice de apoptose conforme aumenta a concentração testada ($p < 0,001$) (Figuras 7 e 8).

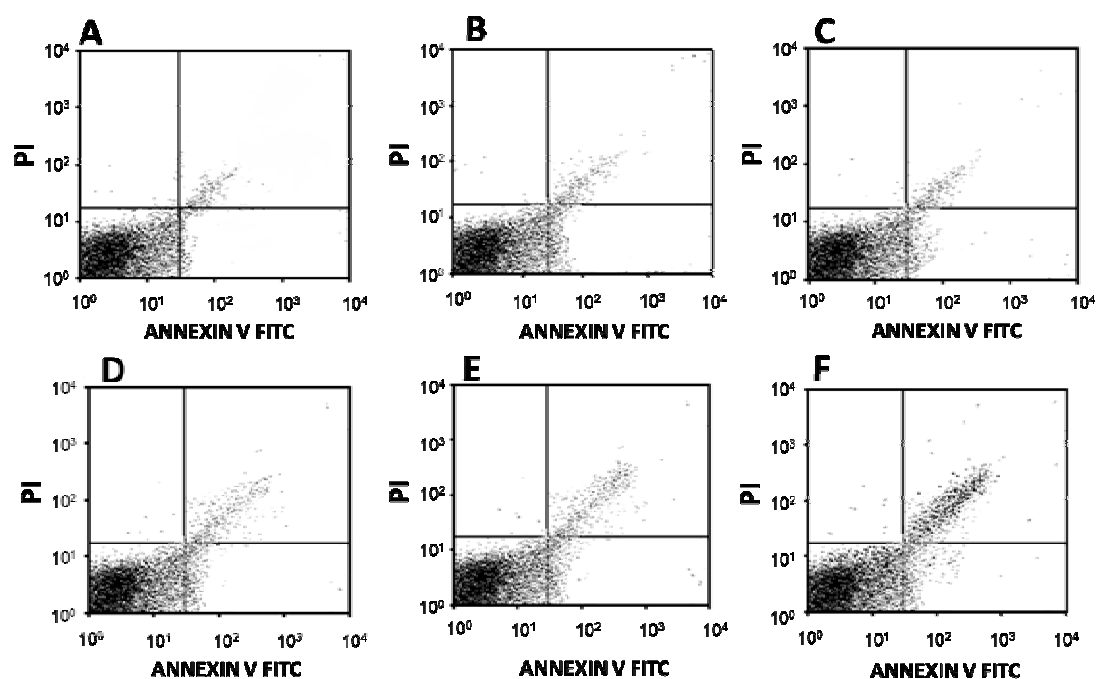


Figura 7. Índices de morte celular causada pela morelloflavona em células mononucleares do sangue periférico em diferentes concentrações. A) PBMC não-tratados, B) PBMC tratados com DMSO, C) 60µM, D) 100µM, E) 200µM e F) 300µM. MFI: Média de intensidade da fluorescência. IP: Iodeto de Propídio.

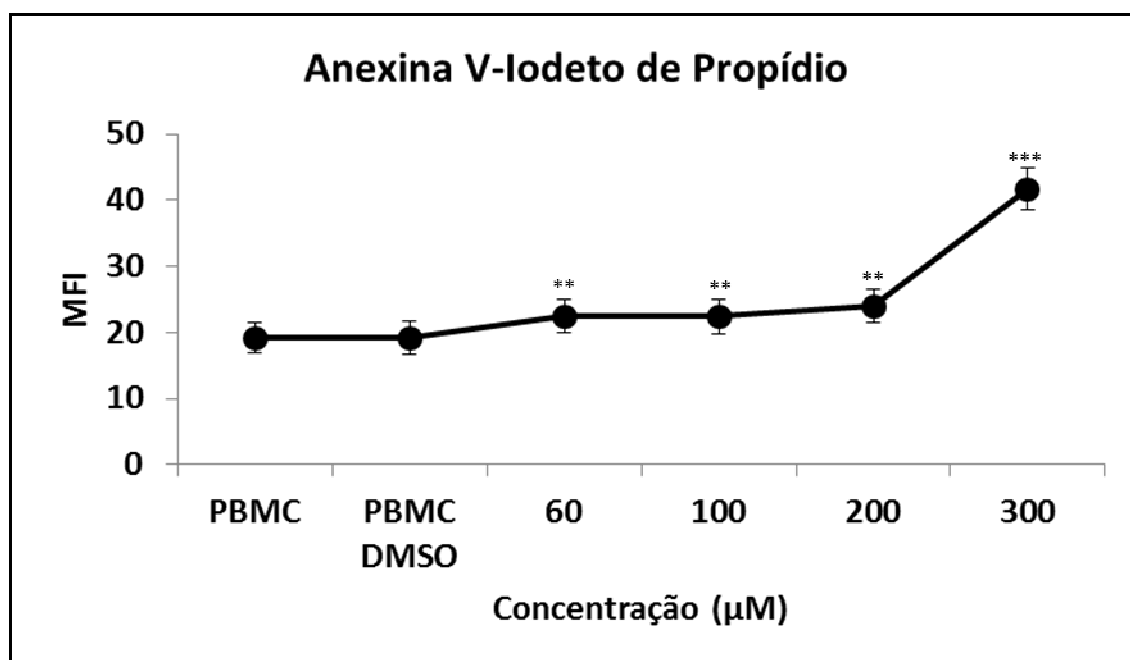


Figura 8. Índices de morte celular causada pela morelloflavona em células mononucleares do sangue periférico em diferentes concentrações. MFI: Média de intensidade da fluorescência. IP: Iodeto de Propídio. Análise de variância (One Way ANOVA com pós-teste de Tukey). (*) $p < 0,05$ (*), (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

5.1.2. Análise da expressão de HLA-G1

Houve um aumento significativo da expressão de HLA-G1 na linhagem FON nas concentrações e nos tempos de tratamento testados ($p < 0,001$). Pôde-se observar que na concentração 80 μM no tempo de tratamento de 48 horas, a expressão de HLA-G1 foi mais intensa ($p < 0,001$) sem alteração da viabilidade celular ($p < 0,001$) avaliada no momento do ensaio através da contagem de células viáveis pelo Azul de Tripán. (Figura 9).

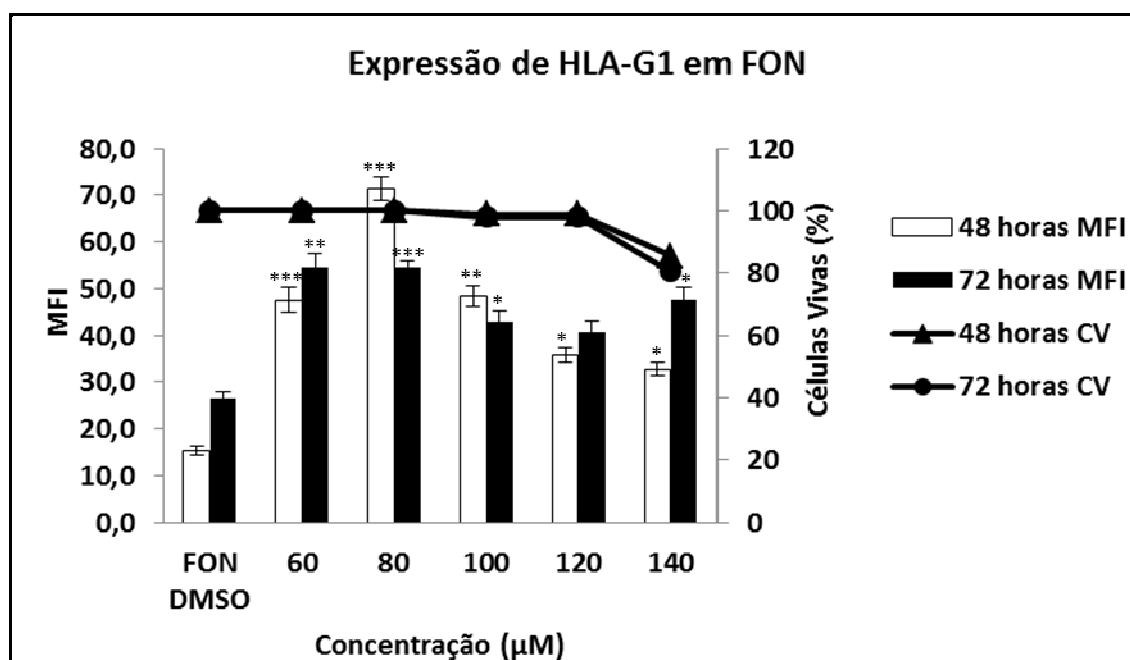


Figura 9. Expressão de HLA-G1 (média $\pm$ erro padrão) em linhagem de melanoma humano FON após tratamento de 48 e 72 horas com morelloflavona em diferentes concentrações. CV: Células viáveis. MFI: Média de intensidade da fluorescência. Análise de variância (One Way ANOVA com pós-teste de Tukey). (*) $p < 0,05$ (*), () $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.**

O tratamento com morelloflavona não foi capaz de alterar os índices de expressão de HLA-G1 na linhagem JEG-3 e M8HLA-G1 (Figuras 10 e 11).

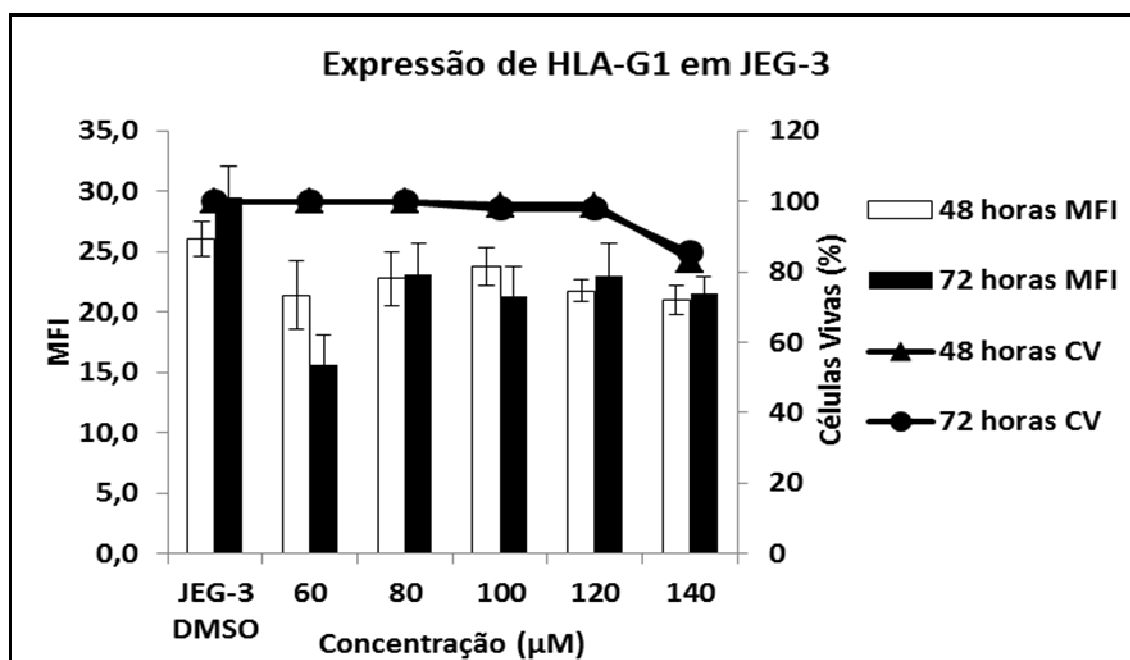


Figura 10. Expressão de HLA-G1 (média $\pm$ erro padrão) em linhagem de coriocarcinoma cervical humano JEG-3 após tratamento de 48 e 72 horas com morelloflavona em diferentes concentrações. CV: Células viáveis. MFI: Média de intensidade da fluorescência. Análise de variância (One Way ANOVA com pós-teste de Tukey).

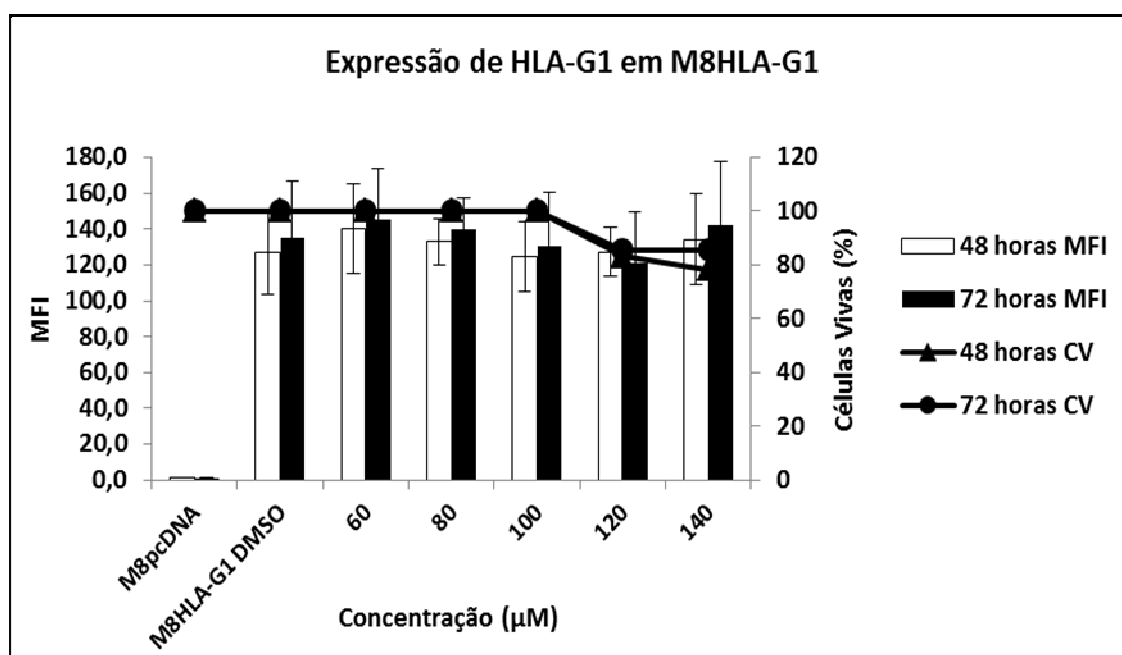


Figura 11. Expressão de HLA-G1 (média $\pm$ erro padrão) em linhagem de melanoma humano transfectada M8HLA-G1 após tratamento de 48 e 72 horas com morelloflavona em diferentes concentrações. CV: Células viáveis. MFI: Média de intensidade da fluorescência. Análise de variância (One Way ANOVA com pós-teste de Tukey).

5.2. Análise da expressão de HLA-G solúvel

Para a determinação da expressão da molécula HLA-G solúvel (HLA-Gs), foi realizado o ensaio imunoenzimático - ELISA, com o sobrenadante das culturas submetidas ao ensaio de citometria de fluxo. A linhagem FON não expressou a molécula HLA-Gs nos diferentes tempos de tratamento (Figura 12), bem como a linhagem JEG-3 (Figura 13). Ambas as linhagens são reconhecidas por expressarem somente a proteína vinculada à membrana da célula (HTB-36 ATCC) (DUFOUR *et al.*, 1997).

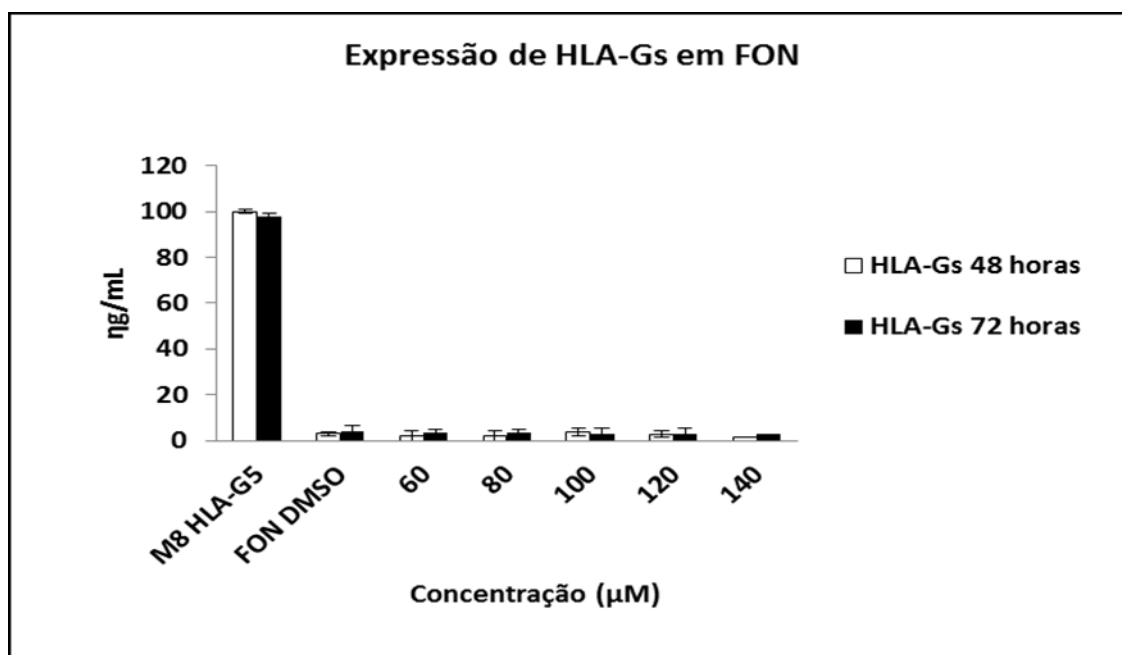


Figura 12. Expressão de HLA-G solúvel (média $\pm$ erro padrão) em linhagem de melanoma humano FON pelo ensaio imunoenzimático- Elisa após tratamento de 48 e 72 horas com morelloflavona em diferentes concentrações. Análise de variância (One Way ANOVA com pós-teste de Tukey).

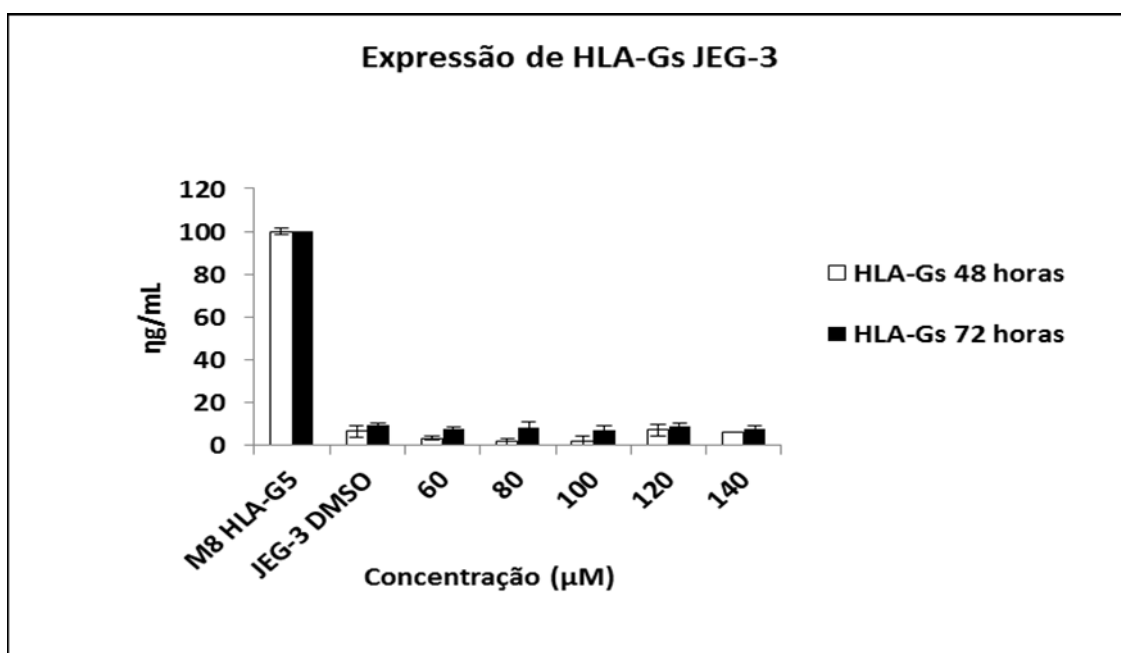


Figura 13. Expressão de HLA-G solúvel (média $\pm$ erro padrão) em linhagem de coriocarcinoma cervical humano JEG-3 pelo ensaio imunoenziático- Elisa após tratamento de 48 e 72 horas com morelloflavona em diferentes concentrações. Análise de variância (One Way ANOVA com pós-teste de Tukey).

Surpreendentemente, a linhagem de melanoma transfectada M8HLA-G1 apresentou altos níveis de expressão de HLA-Gs, sugerindo que a morelloflavona é capaz de induzir o desprendimento (*shedding*) da molécula de HLA-G1 da membrana celular após 72 horas de tratamento ($p < 0,001$) na linhagem transfectada (Figura 14). Apesar dos dados obtidos com a linhagem celular FON, onde pôde-se observar uma aumento da expressão de HLA-G1 (Figura 9), a morelloflavona não foi capaz de induzir o desprendimento de HLA-G1 (Figura 12).

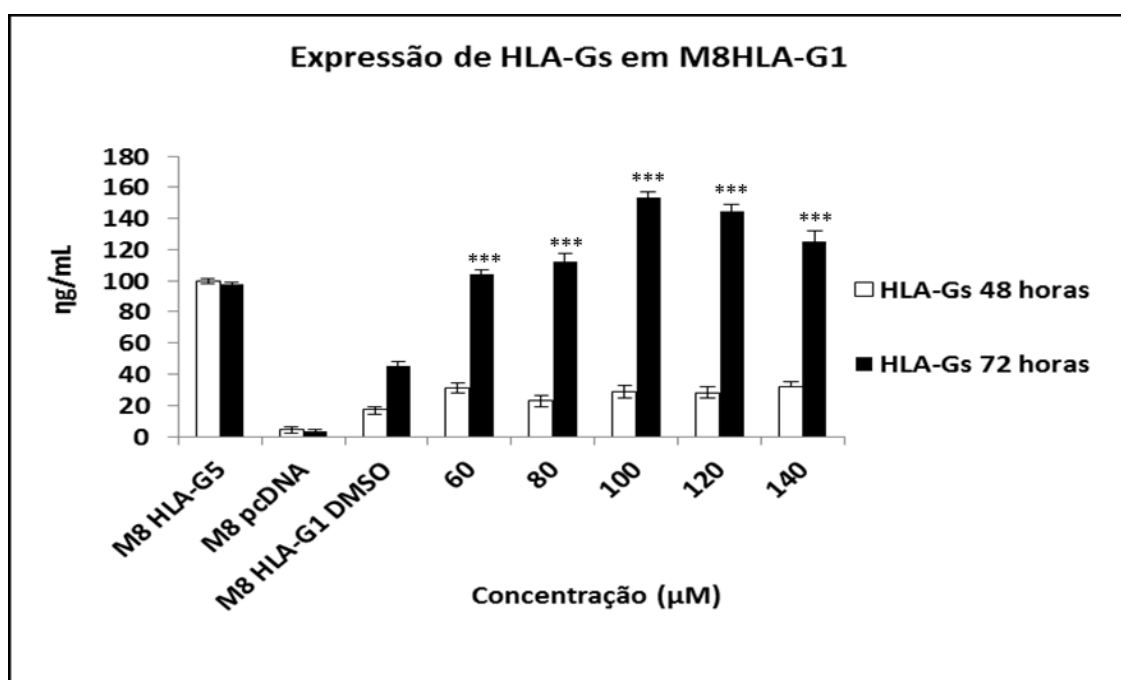


Figura 14. Expressão de HLA-G solúvel (média $\pm$ erro padrão) em linhagem de melanoma humano transfectada M8HLA-G1 pelo ensaio imunoenziático- Elisa após tratamento de 48 e 72 horas com morelloflavona em diferentes concentrações. Análise de variância (One Way ANOVA com pós-teste de Tukey). (*) $p < 0,05$ (*), (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

5.3. Análise da PCR em Tempo Real (RT-PCR)

A técnica utilizada para a determinação da expressão de RNAm de HLA-G foi a RT-PCR, ou PCR quantitativa. Essa técnica é capaz de detectar a presença de uma única cópia gênica e quantificar exatamente a expressão de um gene. Para o ensaio, a linhagem utilizada foi aquela que não expressa HLA-G constitutivamente M8, comparando-a com JEG-3, reconhecida por expressar altos níveis de *HLA-G*.

Os resultados sugerem que após o tratamento com morelloflavona, houve indução da expressão de RNAm em ambos os tempos de tratamento (48 e 72 horas) de forma semelhante em variadas concentrações ($p < 0,001$) (Figura 15). Os resultados estão mostrados em médias de dois experimentos independentes.

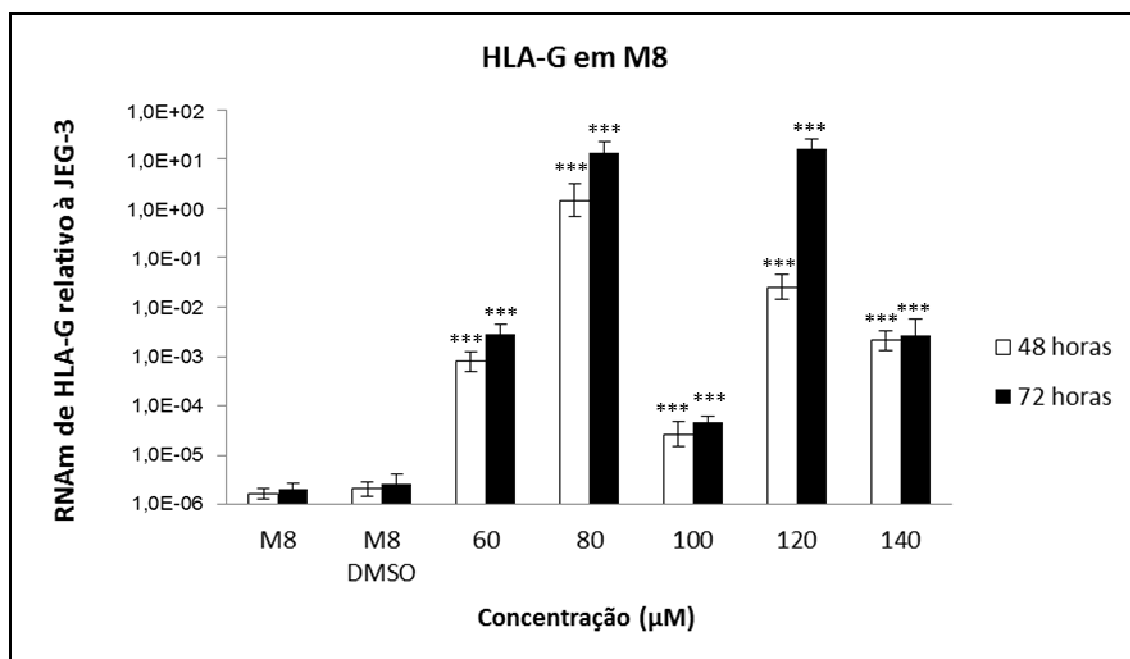


Figura 15. Expressão de RNAm de HLA-G em linhagem de melanoma humano M8 após 48 e 72 horas de tratamento. Média de dois ensaios independentes. Análise de variância (One Way ANOVA). (*) $p < 0,05$ (*), (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

5.4. Indução de NAD(P)H: quinona redutase (NQ1)

Foram realizados três experimentos independentes para avaliar a capacidade de indução da atividade da enzima NQ1 e a viabilidade celular pelo ensaio do violeta cristal, levando em consideração a indução de β -naftoflavona (β -NF; controle positivo). O biflavonoide morelloflavona extraído das folhas de *G. xanthochymus* apresentou indução da atividade da enzima NQ1. O índice de indução da enzima revela que durante o tratamento de 48 horas das células com 4,4 μ M houve o aumento na atividade da enzima em $2,0 \pm 0,3$ vezes. Além disso, foi observada uma relativa atividade da enzima nas demais concentrações testadas.

Em relação ao comportamento celular durante o ensaio, a porcentagem de células vivas nessa concentração foi de $101 \pm 7,49\%$. As concentrações 2,2; 8,9; 17,9 e 35,9 μ M apresentaram diferenças significativas em relação à β -NF para a indução da

enzima NQ1 ($p < 0,001$). Na análise da viabilidade celular não houve significância estatística em nenhuma das concentrações em relação às células tratadas com DMSO (Figura 16).

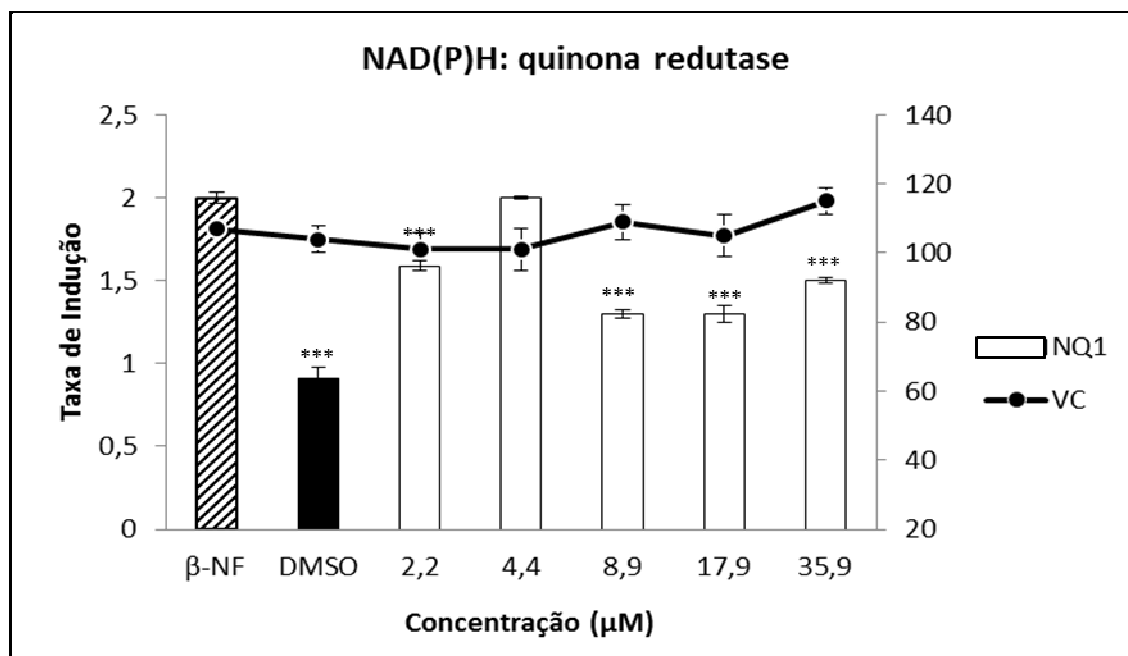


Figura 16. Indução de NAD(P)H: quinona redutase (NQ1). Indução da NQ1 (média $\pm$ erro padrão) em células de hepatocarcinoma murino Hepa1c1c7 por meio da morelloflavona (tratamento/controle) e relação com viabilidade celular (VC; porcentagem) pelo ensaio de violeta cristal, comparadas com β -Naftoflavona (β -NF 0,1µM; controle positivo). Análise de variância (One Way ANOVA com pós teste de Tukey). (*) $p < 0,05$ (*), (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

5.5. Avaliação da Genotoxicidade por meio do Ensaio do Cometa

5.5.1. Avaliação de Genotoxicidade

Foram realizados dois experimentos com o ensaio do Cometa, no qual se avaliou a genotoxicidade e a antigenotoxicidade em linhagem de células HepG2. As concentrações utilizadas nesses experimentos são provenientes do resultado do ensaio de quinona redutase, no qual foi obtida a concentração que duplica a atividade da

enzima NQ1, ou seja, 4,4 μM sem interferir na viabilidade celular significativa (Figura 16).

A partir das leituras das caudas dos cometas formados sobre as lâminas, as células foram analisadas pelo programa TriTek CometScore TM versão 1.5. Este programa permite a obtenção dos valores do *Tail moment*, que relaciona a quantidade de DNA fragmentado com a distância que os fragmentos migraram durante a eletroforese. Após a análise das imagens, os valores resultantes foram tabulados e calculados a partir da média dos valores de *Tail moment* de cada concentração $\pm$ erro padrão. Os resultados estão projetados na tabela 1, estes foram comparados com as células sem tratamento utilizando-se análise estatística de variância Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn.

Na genotoxicidade, foi observado que a concentração de 0,54 μM da morelloflavona não apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle negativo, não causando dano nessas condições, assim como o controle negativo (Tabela 1). Porém, as concentrações de 2,2; 4,4 e 8,9 μM apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo, indicando que são concentrações genotóxicas, ou seja, nessas concentrações a morelloflavona causa dano significativo no DNA quando comparado ao controle negativo (Tabela 1).

Tabela 1. Análise estatística do ensaio de genotoxicidade.

	<i>Tail Moment</i> ± Erro Padrão
<i>HepG2 sem tratamento</i>	10,60 ± 1,61
<i>HepG2 + H₂O₂</i>	41,39 ± 2,41 ^{***}
<i>HepG2 + DMSO</i>	11,40 ± 2,78
0,54	11,56 ± 2,53
1,1	7,89 ± 2,31 ^{**}
2,2	16,13 ± 1,19 [*]
4,4	16,05 ± 1,69 [*]
8,9	26,87 ± 3 ^{***}

Análise de variância Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$. Concentração em μM .

É importante relatar que na concentração de 1,1 μM os índices de *Tail Moment* foram abaixo do controle negativo, podendo-se justificar sua diferença estatística significativa em relação às células não tratadas (Tabela 1).

5.5.2. Avaliação de Antigenotoxicidade

No ensaio de antigenotoxicidade, foi realizado o pré e pós-tratamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As concentrações das substâncias utilizadas neste ensaio foram determinadas a partir do resultado do ensaio de genotoxicidade, no qual a concentração de 0,54 μM não causa dano significativo no DNA. Portanto, é possível verificar a possibilidade do biflavonoide proteger a célula contra danos de DNA, em concentrações abaixo de 0,54 μM . Os resultados estão projetados na tabela 2, estes foram comparados com HepG2 tratadas simultaneamente com H_2O_2 , a partir do programa GraphPad Prism®, utilizando análise estatística de variância Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn.

Na avaliação de antigenotoxicidade no pré-tratamento foi observado que na concentração de 0,54 μM não houve diferença estatística significativa, ou seja, seu

resultado foi igual ao de HepG2 tratada com H_2O_2 (controle positivo) casando o mesmo grau de dano (Tabela 2). Já na concentração de $0,27 \mu M$ houve diferença significativa, porém foi observada uma intensificação do dano, uma vez que o valor resultante da concentração de $0,27 \mu M$ é muito distante quando comparado ao de HepG2 tratada com H_2O_2 ($66,92 \pm 6,28$ para $100,24 \pm 7,25$) ($p < 0,01$). O mesmo foi observado na concentração de $0,135$, porém com uma intensificação de dano ainda maior ($66,92 \pm 6,28$ para $155,22 \pm 8,34$) ($p < 0,01$).

Tabela 2. Análise estatística do ensaio de antigenotoxicidade.

	<i>Tail Moment</i> $\pm$ Erro Padrão	
	Pré	Pós
<i>HepG2 sem tratamento</i>	$8,70 \pm 1,35$	$6,90 \pm 1,55$
<i>HepG2 + H_2O_2</i>	$66,92 \pm 6,28^{***}$	$62,92 \pm 5,47^{***}$
<i>HepG2 + DMSO</i>	$11,40 \pm 2,78$	$12,30 \pm 1,26$
<i>0,135</i>	$155,22 \pm 8,34^{***}$	$49,24 \pm 6,91^{**}$
<i>0,27</i>	$100,24 \pm 7,25^{**}$	$37,25 \pm 6,32^{***}$
<i>0,54</i>	$86,60 \pm 6,76$	$55,48 \pm 6,35$

Análise de variância Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn (*). $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. Concentração em μM .

Na avaliação de antigenotoxicidade no pós-tratamento foi observado que na concentração de $0,54 \mu M$ não houve diferença significativa em relação às células tratadas com H_2O_2 , demonstrando o mesmo potencial de dano causado pelo controle. Já nas concentrações de $0,27$ e $0,135 \mu M$ houve diferença significativa em relação às células tratadas com H_2O_2 , demonstrando que nessas concentrações a morelloflavona pode ter capacidade de reparar os danos causados pelo H_2O_2 nas células de HepG2, após tempo de recuperação (Tabela 2).

6. *Discussão*

Os produtos naturais são a base de muitos fármacos atualmente disponíveis no mercado para o tratamento de várias doenças humanas. Este sucesso é devido à rica diversidade química que é encontrada em extratos microbianos e em fontes botânicas. Deles podem ser obtidas substâncias ativas, cuja produção na forma sintética seria muito dispendiosa, ou ainda, podem ser extraídos compostos básicos que, com modificações estruturais, tornam-se mais eficazes e menos tóxicos, ou então, podem ser utilizados como modelos para fármacos sintéticos, que possuam propriedades farmacológicas semelhantes às originais (MCMAHON *et al.*, 1995; HOUGHTON, 1996; NIELSEN, 2002).

Nos últimos 30 anos, a grande conquista na área da pesquisa de novos fármacos, foi a introdução de sistemas biológicos *in vitro* em grande escala, os quais podem testar atividades de várias amostras, em um curto período de tempo, permitindo executar facilmente as repetições dos experimentos e propiciando uma análise estatística dos resultados. Os sistemas de ensaio *in vitro* são, frequentemente, baseados na utilização de culturas de células, de sistemas enzimáticos ou de receptores clonados. Pesquisadores, nas indústrias farmacêuticas ou na instituição acadêmica, podem utilizar estes ensaios rotineiramente para a pesquisa de um grande número de amostras produzidas por química combinatorial, de coleções de organismos da biosfera e do fracionamento de extratos naturais (HOUGHTON, 2000).

O Brasil é considerado o país detentor da maior biodiversidade mundial e em função da significativa variedade da sua flora, um grande número de espécies vegetais é empregado pela população para curar diversos males, sendo utilizadas com as mais diversas finalidades e de diferentes formas (FUNARI & FERRO, 2005). Nos últimos anos, o Brasil realiza várias pesquisas as quais possuem contribuições relevantes sobre os efeitos biológicos de extratos e dos constituintes químicos isolados, não só quanto

aos aspectos fitoquímicos, mas também quanto à atividade biológica de plantas que ocorrem nos diferentes ecossistemas brasileiros (ALBUQUERQUE, 2006).

Estudos que se propõem a avaliar os efeitos de morte, toxicidade e proliferação celular em conjunto são de fundamental importância para o desenvolvimento de novos fármacos (YAMAMOTO & NISHIOKA, 2005). Neste contexto, propõe-se avaliar o potencialmente índice de morte causado pela morelloflavona em células normais por meio do ensaio de Anexina V e Iodeto de propídio pela citometria de fluxo. A citometria de fluxo é um método qualitativo, quantitativo e exato para análise de apoptose.

No presente estudo pôde-se observar que houve indução de morte celular por apoptose, induzida pela morelloflavona em PBMC obtidos de pacientes saudáveis nas concentrações entre 60 e 300 μM , para a análise através do ensaio de Anexina V e Iodeto de propídio. Até o momento, não existem relatos da morte celular em PBMC pelo ensaio de Anexina V- Iodeto de propídio após tratamento com morelloflavona.

Lin e colaboradores (1997) avaliaram a atividade anti-HIV de biflavonoides isolados de *Garcinia multiflora* em PBMC infectados com HIV-1. Para a realização dos ensaios, os autores utilizaram o método de incorporação da timidina marcada com o objetivo de avaliar a citotoxicidade nas células estudadas. Os autores descrevem que a morelloflavona demonstrou uma atividade moderada com CI_{50} (*half maximal inhibitory concentration*, concentração inibitória a 50%) à 82 μM , enquanto a volkensiflavona (naringenina I-3-II-8 apigenina) demonstrou uma atividade fraca com inibição à 200 μM em PBMC HIV-1 infectados. No estudo, os autores descrevem que os biflavonoides construídos de unidades flavanona- flavona com ligações I-3-II-8, como é o caso da morelloflavona e volkensiflavona, apresentam atividade moderada a fraca em relação à citotoxicidade de PBMC HIV-1 positivos. Outros biflavonoides ligados por meio de I-

3-II-8, como GB1a e GB2a apresentaram atividade moderada, enquanto que biflavanonas ligadas através de um anel A de duas unidades de naringenina (rhusflavanona e succedaneaflavanona) foram inativas. Este estudo sugere fortemente que os grupos hidroxila e pelo menos uma unidade de flavona nos biflavonoides são necessários para a atividade inibitória de PBMC HIV-1 infectados. Uma ligação I-3-II-8 é necessária às biflavanonas para exibir atividade, e os compostos ativos tornam-se inativos quando grupos de hidroxilas são metilados (LIN *et al.*, 1997).

Um estudo que avalia a citotoxicidade dos biflavonoides em linhagens tumorais demonstrou que o biflavonoide conhecido como GB1 extraído de *Garcinia kola* não apresentou toxicidade à aproximadamente 100µM contra as linhagens tumorais humanas HuCCA-1, HepG2 e A549 (ANTIA *et al.*, 2010).

No contexto das linhagens não tumorais, Matsuo e colaboradores (2005) relataram a citotoxicidade das unidades que formam a morelloflavona separadamente, ou seja, dos flavonoides naringenina e luteolina, em fibroblastos embrionários de pulmão humano (TIG-1) e em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC). Os dados revelaram uma elevada variação de CI_{50} entre as linhagens celulares, e também entre outros flavonoides estudados. A naringenina apresentou CI_{50} nas concentrações $> 300 \mu M$ e $108 \mu M$ em TIG-1 e HUVEC, respectivamente, enquanto que a luteonina apresentou CI_{50} em $107 \mu M$ e $57 \mu M$ em TIG-1 e HUVEC, respectivamente. Adicionalmente, o estudo demonstra que 3-hidroxiflavona e apigenina são mais citotóxicos em relação às células TIG-1 do que outros flavonoides, e que a luteolina, quercetina, e naringenina são mais citotóxicas para as células HUVEC. Outro dado interessante que se assemelha aos dados obtidos no nosso estudo com a morelloflavona, é que a taxifolina foi ligeiramente tóxica ($CI_{50} > 300 \mu M$ e $> 200 \mu M$ em TIG-1 e HUVEC, respectivamente), e a rutina não apresentou qualquer toxicidade

(MATSUO *et al.*, 2005). Estes dados sugerem que a relação estrutura- atividade dos biflavonoides e flavonoides com células humanas normais ainda não é clara, e que sua toxicidade difere dependendo do tipo celular.

Algumas células tumorais expressam HLA-G na tentativa de subverter a resposta imune favorecendo o escape tumoral e inibindo o ataque às células tumorais por células *natural killer* (NK) e linfócito T citotóxico (ROUAS- FREISS *et al.*, 2005). Sendo assim, a indução da expressão da molécula de HLA-G por células transformadas pode ser um mecanismo adicional e induzido que ajude a célula à subverter as defesas do organismo. Por outro lado, a expressão da molécula pode contribuir para a diminuição da antigenicidade das células envolvidas em doenças autoimunes e transplantes, devido às características imunológicas apresentadas por HLA-G (LEMAOULT *et al.*, 2003; QIU *et al.*, 2006).

Inicialmente a molécula HLA-G foi descrita como sendo seletivamente expressa em células trofoblásticas (ELLIS *et al.*, 1986) e com funções inibitórias *in vitro* em relação às células NK (ROUAS-FREISS *et al.*, 1997). O melanoma humano foi o primeiro tecido tumoral onde se analisou a expressão de HLA-G (ROUAS-FREISS *et al.*, 2007). Este tumor é certamente o mais estudado a partir do ponto de vista imunológico, e ainda, possui muitas propriedades semelhantes ao trofoblasto, sendo o melanoma o único tipo de câncer para os quais as metástases podem ser encontradas em tecido placentário. Foram realizados muitos estudos para o melhor conhecimento da expressão de HLA-G por melanócitos malignos que podem ser resumidos da seguinte forma: (i) ele está associado com a transformação e progressão maligna uma vez que a expressão de HLA-G ainda não foi detectada na pele normal em torno da lesão tumoral (PAUL *et al.*, 1999; IBRAHIM *et al.*, 2004). O aumento da regulação da expressão de HLA-G em células melanocíticas foi melhor preditor de malignidade do que HLA de

classe I clássicos; (ii) é seletivamente expresso nos tumores com alta capacidade de infiltração; (iii) a expressão de HLA-G no local do tumor pode ser encontrada em células de melanoma e / ou células imunes infiltrantes (IBRAHIM *et al.*, 2004). Estes dados auxiliam no entendimento dos resultados encontrados, uma vez que no presente estudo pôde-se observar níveis aumentados de HLA-G em células de melanoma após tratamento. Além de melanomas, foi descrita a expressão específica de tumor HLA-G em várias doenças malignas incluindo o carcinoma cervical (ROUAS-FREISS *et al.*, 2005).

A demonstração da expressão de HLA-G em lesões tumorais sugere fortemente que esta expressão está sob o controle de fatores ambientais, tais como vírus, citocinas, hormônios, fatores de estresse, privação de nutrientes e aumento da acidez (CAROSELLA *et al.*, 2008). Nosso estudo mostra que após tratamento de 48 e 72 horas a morelloflavona foi capaz de induzir a expressão de HLA-G1 em linhagens de melanoma humano FON. E ainda, foi capaz de induzir a produção de HLA-Gs em M8-HLA-G1. O aumento de HLA-G1s é um dado relevante, uma vez que a proteína solúvel impede a citólise realizadas por células NK contra células-alvo de melanoma (ZIDI *et al.*, 2006).

Sabe-se que o tratamento com agentes que possuem propriedades de desmetilação de DNA podem reativar *HLA-G* e a expressão da proteína em células malignas (MOREAU *et al.*, 2003; MOUILLOT *et al.*, 2005). A partir da PCR em tempo real, foi possível observarmos a expressão de RNAm em células de melanoma, durante o tratamento de 48 e 72 horas em variadas concentrações (60-140 μ M). O papel de fatores *in vivo* na manutenção da expressão de HLA-G em tumores tem também sido apoiado em linhagens por meio de estudos celulares *in vitro*.

Na verdade, com a exceção das linhagens de células de coriocarcinoma, a qual fatores intrínsecos devem sustentar a manutenção da expressão de HLA-G, somente

poucas linhagens de células analisadas dentro de cada tipo de tumor, expressam HLA-G (ROUAS-FREISS *et al.*, 2003). Estes dados, em contradição com os obtidos em *ex vivo*, destacam que fatores do microambiente tumoral o qual permitem expressão HLA-G *in vivo* podem estar ausentes em meios de cultura.

Como citado anteriormete, a expressão de HLA-G é modulada por fatores imunossupressores e por citocinas inflamatórias, tais como IFN- γ fatores de crescimento cuja expressão está sob o controlo de NF- κ B. NF- κ B é um fator de transcrição essencial na imunidade inata e adaptativa (BONIZZI *et al.*, 2004). Em particular, NF- κ B desempenha um papel essencial em eventos precoces da resposta imune inata por meio de vias de sinalização reguladas por receptores *toll-like* (KARIN & GRETEN, 2005). Entre eles estão os genes que codificam uma grande variedade de moléculas efetoras, que estão criticamente envolvidos em respostas inflamatórias (PAHL, 1999). Demonstrou-se que o HLA-G modula a produção de citocinas uma vez que a regulação positiva da resposta Th2 por HLA-G foi demonstrada em células mononucleares a partir de sangue periférico (KANAI *et al.*, 2001). Sendo assim, sugere-se que NF- κ B pode modular a expressão de HLA-G e HLA-G poderia regular a atividade de NF- κ B, direta ou indiretamente.

Por meio de linhagens celulares tumorais foi mostrado que o TNF- α e PMA (acetato de forbolmiristato), ambos indutores de NF- κ B aumentam intracitoplasmaticamente o teor de proteína HLA-G por um mecanismo pós transcricional, e estimulam a atividade da metaloproteinase que promove o desprendimento da isoforma vinculada a membrana, originando o HLA-G solúvel, presente no meio de cultura (ROUAS FREIS *et al.*, 2007; ZIDI *et al.*, 2006). Estes dados poderiam explicar o aumento da expressão de HLA-G1 em FON observado no nosso estudo, e ainda, aos resultados obtidos pelo ensaio imunoenzimático-ELISA na

linhagem de melanoma transfectada M8HLA-G1, onde foi possível observar o desprendimento de HLA-G1 da membrana celular. A possibilidade dos tratamentos com morelloflavona afetarem a estabilidade ou induzirem a degradação de proteínas HLA-G na superfície da célula não é sustentada uma vez que o anticorpo MEM-G/9 utilizado no ensaio ELISA possui a capacidade estrita de reconhecer a estrutura conformacional da molécula HLA-G associada à β_2 -microglobulina das moléculas HLA-G1s e HLA-G5.

No presente estudo, avaliou-se a possível regulação de *HLA-G* frente ao tratamento com morelloflavona em diferentes linhagens tumorais, bem como linhagens de melanoma humano. Até o momento, estudos da relação de moléculas HLA com biflavónides, ou mesmo flavonoides são inéditos. Na literatura, um trabalho realizado por TIAN e colaboradores (2005), é relatada a indução de NF- κ B em células de adenocarcinoma cervical humano, após tratamento com o biflavonoide isocamajasma à 10-15 μ M. Uma hipótese para a indução da expressão de *HLA-G* em FON seria uma maior suscetibilidade celular que talvez induza a ativação de NF- κ B.

Além de avaliarmos a modulação da expressão de HLA-G frente ao tratamento com a morelloflavona, também foi avaliado o seu perfil quimiopreventivo através do ensaio de quinona redutase. NAD(P)H: quinona redutase (NQ1) é uma enzima de fase II metabolizadora de xenobióticos que catalisa a redução de dois elétrons de uma vasta gama de quinonas, compostos quinóides endógenos e exógenos, e protege as células contra espécies reativas de oxigênio geradas pela quinonas e compostos electrofílicos relacionados (TALALAY & DINKOVA-KOSTOVA, 2004). A indução de NQ1 pode auxiliar na quimioprevenção contra o câncer e toxicidade química com compostos naturais ou sintéticos (FROYEN *et al.*, 2010).

As várias propriedades dos flavonoides, como atividade antioxidante, capacidade de ligação metal, capacidade de afetar o sistema endócrino e capacidade de

prevenir a ativação enzimática de carcinógenos, são consistentes com um papel protetor contra doenças. As observações relacionadas aos dados de relação estrutura-atividade para as propriedades antioxidantes dos flavonoides têm sido estudadas em detalhe usando uma variedade de sistemas de ensaio (UDA *et al.*, 2006). Rice-Evan e colaboradores (1996) revelaram em um estudo de estrutura-atividade a importância de 3', 4'-dihidroxil no anel B e de uma ligação 2,3 no anel C como principais determinantes da atividade antioxidante. Sendo assim, a estrutura da morelloflavona favoreceria sua atividade antioxidante. Sabe-se que a quercitina, um flavonol, é indutora de enzimas de fase II e de detoxificação de carcinógenos (GANDHI & KHANDUJA, 1993; SIESS *et al.*, 1992; GULICK *et al.*, 1995). Prester e colaboradores (1993) propuseram que alguns anticarcinógenos da dieta podem inibir a ativação da iniciação do câncer por efetuarem o balanceamento entre ativação de enzimas de fase I (tais como citocromo P450) e de fase II (enzimas de detoxificação tais como GST, NQ1 e UDP-glucuronil-transferase). Fatores que reprimem ou inibem enzimas de fase I ou induzem ou ativam enzimas de fase II são suscetíveis em ter um papel protetor contra o dano celular.

Estudos a respeito de biflavonoides, ou mesmo o papel da morelloflavona na indução de enzimas de detoxificação, são inexistentes até o momento. Entretanto o papel dos flavonoides na indução de NQ1 são fortemente relatados (MOON *et al.*, 2006). Foi descrito que o flavonoide apigenina, uma flavona como a unidade luteonina da morelloflavona, é capaz de induzir NQ1 em 1,6 vezes (UDA *et al.*, 2006). A taxifolina, flavanonol o qual difere da flavanona pela presença de uma hidroxila no anel C, também é capaz de induzir NQ1. A atividade específica da enzima foi induzida em até 3,65 vezes, entre as concentrações 31,3 e 62,5 μM (LEE *et al.*, 2007). O efeito da suplementação de naringenina na alimentação de ratos demonstrou por meio do ensaio de NQ1, que a flavanona pode promover a atividade de NQ1 no fígado de animais sob

condições estresse oxidativo (ANDRADE *et al.*, 2007). No presente estudo, pode-se observar similaridade aos dados apresentados pela literatura, onde a indução de NQ1 pela morelloflavona foi 2 vezes maior na concentração 4,4 μ M, com ausência de morte celular nessa concentração pelo violeta cristal, mostrando a importância de seu papel na quimioprevenção.

A proteção contra danos ao DNA é uma importante propriedade quimiopreventiva a qual pode evitar a fase de iniciação. Os flavonoides que possuem atividade antioxidante e anti-radicaís são capazes de extinguir radicaís livres, que podem promover mutações e danos no DNA. A técnica do cometa alcalino possibilita identificar a presença de quebras em fitas simples do DNA e é usada para verificar a propriedade quimiopreventiva de proteção ao DNA contra determinados danos. Sabe-se que a replicação do DNA é necessária para corrigir alterações genéticas. Por esta razão, a baixa fidelidade desta replicação pode levar à instabilidade genômica e às mutações, que por sua vez podem levar às alterações na expressão ou função de genes responsáveis pela manutenção da homeostasia celular. Essas alterações genéticas podem converter uma célula normal em uma célula transformada, que se caracteriza pela perda de sinais de controle de proliferação, morte e diferenciação celular. Se esta mutação ocorrer em células que mantêm sua capacidade proliferativa (células progenitoras), esta mutação poderá ser mantida, e sua frequência na população celular aumenta (LEUNG & BRUGGE, 2012), iniciando a carcinogênese.

Sendo assim, pode-se dizer que a carcinogênese é um processo complexo provavelmente envolvendo uma série de mudanças genéticas e epigenéticas ocorrendo em níveis morfológicos, celulares e moleculares (PITOT, 2001, 2007).

O termo "epigenético" refere-se a modificações na expressão gênica causada na hereditariedade, mas potencialmente reversível, alterações na metilação do DNA e da

estrutura cromatina (CORTEZ & JONES, 2008). Dado o fato de que modificações epigenéticas são reversíveis e ocorrem durante o início da carcinogênese como eventos potencialmente iniciais para o desenvolvimento do câncer, elas foram identificadas como novos alvos promissores para estratégias de prevenção do câncer (MATUO 2012).

Muitas substâncias químicas, incluindo peróxido de hidrogênio são conhecidas para gerar danos ao DNA através de um mecanismo de radicais de oxigênio e podem induzir aberrações cromossômicas, mutações genéticas e quebras na fita de DNA (MCKELVEY-MARTIN *et al.*, 1993). Foi observado que por meio do ensaio do cometa em HepG2, a morelloflavona é capaz de induzir dano de DNA em concentrações entre 2,2 e 8,9 μM . Nas menores concentrações, não foi observada atividade genotóxica da morelloflavona. Dessa forma, avaliou-se a atividade antigenotóxica na morelloflavona nas menores concentrações e foi possível observar ação antigenotóxica nas concentrações de 0,135 e 0,27 μM no pós-tratamento, diferentemente do pré-tratamento, o qual não apresentou efeito quimiopreventivo. Nossos resultados diferem dos poucos trabalhos que avaliam a indução de dano de DNA através do ensaio do cometa em biflavonoides. A kolavirona obtida a partir de *G. kola*, em concentrações entre 30 e 90 μM diminuiu quebras no DNA induzidas por H_2O_2 em linfócitos humanos e células de fígado de rato (FAROMBI *et al.*, 2004a; b). A estrutura da kolavirona mostra a existência de uma hidroxila no anel C, o que direciona a atividade antioxidante do biflavonoide, e possivelmente sua atividade quimiopreventiva.

Os trabalhos com as unidades isoladas da morelloflavona também são escassos, mostrando algumas vezes efeitos protetores ao DNA, dependendo do tipo celular e das concentrações utilizadas. Um estudo realizado com a naringenina em camundongos diabéticos mostra que a administração do flavonoide (50-75 mg/kg durante 7 dias)

resultou num aumento significativo do peso corporal e diminuição de danos ao DNA induzidos em linfócitos periféricos, mas não nas células de fígado e de rim dos animais (ORŠOLIĆ *et al.*, 2011). Por outro lado, um estudo realizado com a luteolina (5 a 20 mg/ml) demonstra que esta não induz danos ao DNA detectáveis no ensaio do cometa em células de adenocarcinoma mamário humano (CHEN *et al.*, 2012, RAMOS *et al.*, 2010a) e adenocarcinoma colorretal humano (RAMOS *et al.*, 2010b). Com relação à luteolina, dados publicados revelam que esta diminuiu acentuadamente danos ao DNA induzidos por H₂O₂ em células epiteliais de adenocarcinoma colorretal (RAMOS *et al.*, 2010b). No nosso estudo, observou-se uma proteção da morelloflavona no pós-tratamento de HepG2, assemelhando-se ao resultado encontrado por Ramos e colaboradores (2010b).

Os diferentes resultados obtidos com vários tipos celulares podem refletir as diferenças na biologia das diversas linhagens celulares analisadas, bem como na sensibilidade dos métodos utilizados para detectar o papel da morelloflavona na regulação de HLA-G e/ou seu efeito quimiopreventivo.

7. Conclusão

Através da análise dos dados obtidos pode-se concluir que o biflavonoide morelloflavona:

- Induziu morte celular em PBMC - *Peripheral blood mononuclear cells* (células mononucleares do sangue periférico);
- Induziu a expressão protéica da molécula HLA-G vinculada à membrana (HLA-G1);
- Induziu a expressão protéica da molécula HLA-G solúvel (HLA-Gs);
- Induziu a expressão do RNAm de HLA-G;
- Induziu NAD(P)H: quinona redutase na concentração;
- Não apresentou genotoxicidade em concentrações abaixo de 0,54µM e apresentou genotoxicidade em concentrações acima de 2,2µM;
- Apresentou antigenotoxicidade no pós-tratamento.

8. Referências Bibliográficas

ADAMASHVILI, I. M.; KELLEY, R. E.; PRESSLY, T.; MCDONALD, J. C. Soluble HLA: patterns of expression in normal subjects, autoimmune diseases, and transplant recipients. **Rheumatol int**, v. 25, p. 491-500, 2005.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 16, p. 678-689, 2006.

AMBASTA, S. P. **The usefull plants of India**, CSIR, New Delhi, p. 231, 1986.

AMIOT, L.; FERRONE, S.; GROSSE-WILDE, H.; SELIGER, B. Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 3, p. 417-431, 2011.

ANTIA, B.S.; PANSANIT, A.; EKPA, O.D.; EKPE, U.J.; MAHIDOL, C.; KITTA KOOP, P. Alpha-glucosidase inhibitory, aromatase inhibitory, and antiplasmodial activities of a biflavonoid GB1 from *Garcinia kola* stem bark. **Planta Med**, v. 76, n. 3, p. 276-277, 2010.

ARUOMA, O. I.; SUN, B.; FUJI, H.; NEERGHEEN, V. S.; BAHORUN, T.; KANG, K. S.; SUNG, M. K. Low molecular proanthocyanidin dietary biofactor oligonol: Its modulation of oxidative stress, bioefficacy, neuroprotection, food application and chemoprevention potentials. **Biofactors**, v. 27, p. 245-265, 2006.

BAGGETT, S.; PROTIVA, P.; MAZZOLA, E. P.; YANG, H.; RESSLER, E. T.; BASILE, M. J.; WEINSTEIN I. B.; KENNELLY, E. J. Bioactive benzophenones from *Garcinia xanthochymus* fruits. **J Nat Prod**, v. 68, n. 3, p. 354-360, 2005.

BAMBERGER, A. M.; JENATSCHKE, S.; SCHULTE, H. M.; LONING, T.; BAMBERGER MC. Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates the human HLA-G promoter in JEG3 choriocarcinoma cells. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 85, p. 3932-3936, 2000.

BENAVENTE-GARCÍA, O. & CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular and anti-inflammatory activity. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 15, p. 6185-6205, 2008.

BODMER, J. G.; MARSH, S. G. E.; ALBERT, E. D.; BODMER, W. F.; BONTROP, R. E.; CHANNON, D.; DUPONT, B.; ERLICH, H. A.; MACH, W. R.; PARHAM, P.; SASAZUKI, T.; SCHNEUDEUR, G. H. T. H.; STROMINGER, J. L.; SVEJGAARD, A.; TERASAKI, P. I. Nomenclature for factors of the HLA system. **Tissue Antigens**, v. 46, p.1-18, 1995.

BONIZZZI, G.; KARIN, M.; The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **Trends Immunol**, v. 25, p. 280-288, 2004.

CARIÑO-CORTÉS, R.; HERNÁNDEZ-CERUELOS, A.; TORRES-VALENCIA, J. M.; GONZÁLEZ-AVILA, M.; ARRIAGA-ALBA, M.; MADRIGAL-BUJADAR, E.

Antimutagenicity of *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria* evaluated with the Ames test. **Toxicol. Vitro**, v. 21, p. 691-697, 2007.

CAROSELLA, E. D.; FAVIER, B.; ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; LE MAOULT, J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4862-4870, 2008b.

CAROSELLA, E. D.; GREGORI, S.; LEMAOULT, J. The tolerogenic interplay(s) among HLA-G, myeloid APCs and regulatory cells. **Blood**, v. 118, n. 25, p. 6499-6505, 2011.

CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P.; LE MAOULT, J.; LE DISCORDE, M.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. **Trends Immunol**, v. 81, p. 199-252, 2003.

CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P.; LE MAOULT, J.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G: from biology to clinical benefits. **Trends Immunol**, v. 29, n. 3, p. 125-132, 2008a.

CASTRO, M. J.; MORALES, P.; MARTINEZ-LASO, J.; ALLENDE, L.; ROJO-AMIGO, R.; GONZALEZ-HEVILLA, M.; VARELA, P.; MORENO, A.; GARCIA-BERCIANO, M.; ARNAIZ-VILLENA, A. Evolution of MHC-G in humans and primates based on three new 3'UT polymorphisms. **Hum Immunol**, v. 61, p. 1157-1163, 2000.

CHEN, Y.; ZHONG, F.; HE, H.; HU, Y.; ZHU, D.; YANG, G. Structure elucidation and NMR spectral assignment of five new xanthenes from the bark of *Garcinia xanthochymus*. **Magn Reson Chem.**, v. 46, n. 12, p. 1180-1184, 2008.

CHEN, C. & KONG, A. N. Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. **Free Radic Biol Med**, v. 36, p. 1505-1516, 2004.

CHEN, V.; STAUB, R. E.; BAGGETT, S.; CHIMMANI, R.; TAGLIAFERRI, M.; COHEN, I., SHTIVELMAN, E. Identification and analysis of the active phytochemicals from the anti-cancer botanical extract Bezielle. **PLoS One**, v. 7, n. 1, e30107, 2012.

CHINKWO, K. A. *Surtherleia frutescens* extracts can induce apoptosis in cultured carcinoma cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p: 163-170, 2005.

CIRULLI, V.; ZALATAN, J.; MCMASTER, M.; PRINSEN, R.; SALOMON, D.R.; RICORDI, C.; TORBETT, B.E.; MEDA, P.; CRISA, L. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. **Diabetes**, v. 55, n. 5, p. 1214-1222, 2006.

CORTEZ, C. C.; JONES, P. A. Chromatin, cancer and drug therapies. **Mutat Res**, v. 647, n. 1-2, p. 44-51, 2008.

CRISA, L.; MCMASTER, M. T.; ISHII, J. K.; FISHER, S. J.; SALOMON, D. R. Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts. **J Exp Med**, v. 186, n. 2, p. 289-298, 1997.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Nat Prod Rep.**, v. 26, p. 1001-1043, 2009.

CUENDET, M.; OTEHAM, C.; MOON, R.; PEZZUTO, J. Quinone reductase induction as a

biomarker for cancer chemoprevention. **J Nat Prod**, v. 69, p. 460-463, 2006.

DIEPSTRA, A.; POPPEMA, S.; BOOT, M.; VISSER, L.; NOLTE, I.M.; NIENS, M.; TEMEERMAN, G.J.; VAN DEN BERG, A. HLA-G protein expression as a potential immune escape mechanism in classical Hodgkin's lymphoma. **Tissue Antigens**, v. 71, n. 3, p. 219-226, 2008.

DIERENDONCK, J. H.; REUTELINGSPERGER, C.P.; VERMEJI-KEERS, C. In situ detection of apoptosis during embryogenesis with annexin V: from whole mount to ultrastructure. **Cytometry**, v. 29, n. 313–320, 1997.

DONADI, E. A.; CASTELLI, E. C.; ARNAIZ-VILLENA, A.; ROGER, M.; REY, D.; MOREAU, P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function.; regulation.; evolution and disease association. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 3, p. 369-395, 2011.

DONAGHY, L.; GROS, F.; AMIOT, L.; MARY, C.; MAILLARD, A.; GUIGUEN, C.; GANGNEUX, J. P. Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leucocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis. **Clin Exp Immunol**, v. 147, n. 2, p. 236-240, 2007.

DUFOUR, E.; CARCELAIN, G.; GAUDIN, C.; FLAMENT, C.; AVRIL, M.F.; FAURE, F. Diversity of the cytotoxic melanoma-specific immune response: some CTL clones recognize autologous fresh tumor cells and not tumor cell lines. **J Immunol**, v. 158, n. 8, p. 3787-3795, 1997.

ELLIS, S. A. ; SARGENT, I.L.; REDMAN, C. W. G.; MCMICHAEL, A. J. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. **Immunology**, v. 59, 595-601, 1986.

ELLIS, S. A.; PALMER, M. S.; MCMICHAEL, A. J. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. **J Immunol**, v. 144, p. 731-735, 1990.

EGGLER, A. L.; LIU, G.; PEZZUTO, J. M.; van BREEMEN, R. B.; MESECAR, A. D. Modifying specific cysteins of electrophile-sensing human Keap 1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. **PNAS**, v. 102, n. 29, p. 10070- 10075, 2005.

ENDRINGER, D. C. Química e atividades biológicas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (eca) e efeito na quimioprevenção de câncer. 2007. 260 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 2007.

ESTELLER, M. & HERMAN, J. G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. **J Pathol**, v. 196, n. 1, p. 1-7, 2002.

FAINARDI, E.; CASTELLAZZI, M.; STIGNANI, M.; MORANDI, F.; SANA, G.; GONZALEZ, R.; PISTOIA, V.; BARICORDI, O. R.; SOKAL, E.; PEÑA, J. Emerging topics and new perspectives on HLA-G. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 3, p. 433-451, 2011.

FAROMBI, E.O.; MOLLER, P.; DRAGSTED, L.O. Ex-vivo and in vitro protective effects of kolaviron against oxygen-derived radical-induced DNA damage and oxidative stress in human lymphocytes and rat liver cells. **Cell Biol. Toxicol**, v. 20, p. 71-82, 2004a.

FAROMBI EO, HANSEN M, RAVN-HAREN G, MØLLER P, DRAGSTED LO. Commonly consumed and naturally occurring dietary substances affect biomarkers of oxidative stress and DNA damage in healthy rats. **Food Chem Toxicol**. v. 42, n. 8, p. 1315-22, 2004b.

FERNANDES, D. C. **Estudo químico e atividade biológica de *Garcinia xanthochymus* (Clusiaceae)**. 2010. 260 f. Dissertação (Mestrado em Química Psicologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Araraquara 2010.

FROYEN, D.; VAN ATTEVELDT, N.; BLOMERT, L. Exploring the Role of Low Level Visual Processing in Letter-Speech Sound Integration: A Visual MMN Study. **Front Integr Neurosci**, v. 13, n. 4, p. 9, 2010.

FUJII, T.; ISHITANI, A.; GERAGHTY, D. E. A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. **J Immunol**, v. 153, n. 12, p. 5516-5524, 1994.

FUNARI, C. S. & FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 15, n. 2, p. 281–296, 2005.

GANDHI, R. K.; KHANDUJA, K. L. Impact of quercetin composition on phase I and phase II drug metabolizing enzymes in mice, **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 14, n. 107–112, 1993.

GARDNER, J.E.; SNUSTAD, P. Principles of Genetcs; 7 ed. New York: John Wiley & Sons. INC., 1986.

GARDENING WITH WILSON. Disponível em: 2012.
<http://gardeningwithwilson.com/tag/garcinia-xanthochymus/>

GERAGHTY, D. E. Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes. **Immunology**, v. 5, p. 3-7, 1993.

GERAGHTY, D. E, KOLLER, B. H.; ORR, H. T. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, p. 9145-9149, 1987.

GIBELLINI, L.; PINTI, M.; NASI, M.; MONTAGNA, J. P.; DE BIASI, S.; ROAT, E.; BERTONCELLI, L.; COOPER, E. L.; COSSARIZZA A. Quercetin and cancer chemoprevention. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM. **Evid Based Complement Alternat Med**, Epub 2011 Apr 14.

GIL, B.; SANZ, M. J.; TERCENCIO, M. C.; GUNASEGARAN, R.; PAYÁ, M.; ALCARAZ, M. J. Morelloflavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholipase A2 with anti-inflammatory activity. **Biochem Pharmacol**, v. 53, n. 5, p. 733-740, 1997. Erratum in: **Biochemical Pharmacology**, v. 53, n. 12, p. 1946, 1997.

GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of Cell Number in Monolayer Cultures. **Analytical Biochemistry**, Vol. 159, p. 109-113, 1986.

GILLS, J. J.; JEFFREY, E. H.; MATUSHESKI, N. V.; MOON, R. C.; LANTVIT, D. D.; PEZZUTO, J. M. Suphorafane prevents mouse skin tumorigenesis during the stage of promotion. **Cancer Lett.**, v. 236, p. 72 - 79, 2006.

GULICK, A. M.; FAHL, W. E. Forced evolution of glutathione S-transferase to create a more efficient drug detoxication enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 8140–8144.

HARBORNE, J. H.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HONG, W, K. & SPORN, M. B. Recent advances in chemoprevention of cancer. **Science**, v. 278, n. 5340, p. 1073-1077, 1997.

HOUGHTON, P. J. Compounds with anti-HIV activity from plants. *Transactions from the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.90, p.601-604, 1996.

HOUGHTON, P. J. Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. **Phytother Res**, v.14, p.419-423, 2000.

HURSTING, S. D.; SLAGA, T. J.; FISCHER, S. M.; DIGIOVANNI, J.; PHANG, J. M. Mechanism-based cancer prevention approaches: targets, examples, and the use of transgenic mice. **J. Natl. Cancer Inst**, v. 91, n. 3, p. 215-225, 1999.

IBRAHIM, E. C.; MORANGE, M.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; PAUL, P. Heat shock and arsenite induce expression of the nonclassical class I histocompatibility HLA-G gene in tumor cell lines. **Cell Stress Chaperones**, v. 5, n. 207–218, 2000.

IBRAHIM, E. L. C.; ARACTINGI, S.; ALLORY, Y.; BORRINI, F.; DUPUY, A.; DUVILLARD, P, CAROSELLA ED, AVRIL MF, PAUL P. Analysis of HLA antigen expression in benign and malignant melanocytic lesions reveals that upregulation of HLA-G expression correlates with malignant transformation, high inflammatory infiltration and HLA-A1 genotype. **Int J Cancer**, v. 108, p. 243–250, 2004.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2010. Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf> Acesso em: 25 jun. 2011.

IKUMA, N. E. M.; PASSONI, H. M.; BISO, I. F.; LONGO, C.M.; CARDOSO, P. R. C.; CAMPANER, S. L.; VARANDA, A.E. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. **Toxicol. Vitro**, v. 20, p. 361-366, 2006

JEONG, T. J.; MOON, J.H.; PARK, K.H.; SHIN, S.C.H. Isolation and characterization of a new compound from *Prunus mume* fruit that inhibits cancer cells. *J Agr Food Chem*, v. 54, p. 2123-2128, 2006.

KANAI, T.; FUJII, T.; KOZUMA, S.; YAMASHITA, T.; MIKI, A.; KIKUCHI, A. TAKETANI Y. Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. **Mol Hum Reprod**, v. 7, p. 195–200, 2001.

KANG, Y.; PEZZUTO, J.M. Induction of Quinone Reductase as a Primary Screen for Natural Product Anticarcinogens. **Meth Enzymol**, v. 382, p. 380-413, 2004.

KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nat Rev Immunol**, v. 5, p. 749–759, 2005.

KOVATS, S.; MAIN, E. K.; LIBRACH, C.; STUBBLEBINE, M.; FISHER, S. J.; DeMARS, R. A class 1 antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. **Science**, v. 248, p. 220-223, 1990.

KUCUKGERGIN, C.; ISMAN, F. K.; DASDEMIR, S.; CAKMAKOGLU, B.; SANLI, O.; GOKKUSU, C.; SECKIN, S. The role of chemokine and chemokine receptor gene variants on the susceptibility and clinicopathological characteristics of bladder cancer. **Gene**. 2012 Sep 13. pii: S0378-1119(12)01092-X. doi: 10.1016/j.gene.2012.09.011. [Epub ahead of print].

KUNDU, K. J.; SURH, J-Y. Breaking the relay in deregulated cellular signal transduction as a rationale for chemoprevention with antiinflammatory phytochemicals. **Mutat Res**, v. 591, p. 123–146, 2005.

LAWLOR, D. A.; ZEMMOUR, J.; ENNIS, P. D.; PARHAM, P. Evolution of class-I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection. **Biochem Pharmacol**, v. 8, p. 23-63, 1990.

LE BOUTEILLER, P.; SOLIER, C.; PROLL, J.; AGUERRE-GIRR, M.; FOURNEL, S.; LENFANT, F. Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? **Hum reprod Update**, v. 5, p. 223-233, 1999.

LE DISCORDE, M.; MOREAU, P.; SABATIER, P.; LEGEAIS, J. M.; CAROSELLA, E. D. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. **Hum Immunol**, v. 64, n. 11, p. 1039-1044, 2003.

LEFEBVRE, S.; BERRIH-AKNIN, S.; ADRIAN, F.; MOREAU, P.; POEA, S.; GOURAND, L.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; PAUL, P. A specific interferon (IFN)-stimulated response element of the distal HLA-G promoter binds IFN-regulatory factor 1 and mediates enhancement of this nonclassical class I gene by IFN-beta. **J Biol Chem**, v. 276, p. 6133–6139.

LE MAOULT, J.; CAUMARTIN, J.; DAOUYA, M.; FAVIER, B.; LEROND, S.; GONZALEZ, A.; CAROSELLA, E.D. Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2040-2048, 2007.

LE MAOULT, J.; LE DISCORDE, M.; ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; MENIER, C.; MCCLUSKEY, J.; CAROSELLA, E. D. Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness. **Tissue Antigens**, v. 62, n. 4, p. 273-284, 2003.

LE MAOULT, J.; ZAFARANLOO, K.; LE DANFF, C.; CAROSELLA, E. D. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. **FASEB J**, v. 19, n. 6, p. 662–664, 2005.

LEUNG, C. T.; BRUGGE, J. S. Outgrowth of single oncogene-expressing cells from suppressive epithelial environments. **Nature**, v. 482, n. 7385, p. 410-413.

LI, Y. & OHIZUMI, Y. Search for constituents with neurotrophic factor-potentiating activity from the medicinal plants of paraguay and Thailand. **Yakugaku Zasshi**. v. 124, n. 7, p. 417-424, 2004.

LIN, Y.; NIE, Y.; ZHAO, J.; CHEN, X.; YE, M.; LI, Y.; DU, Y.; CAO, J.; SHEN, B.; LI, Y. Genetic polymorphism at miR-181a binding site contributes to gastric cancer susceptibility. **Carcinogenesis**. 2012 Sep 12. [Epub ahead of print]

LIN, Y. ANDERSON, H.; FLAVIN, M.T.; PAI, Y.H.; MATA-GREENWOOD, E.; PENGSUPARP, T.; PEZZUTO, J. M.; SCHINAZI, R. F.; HUGHES, S. H. ; CHEN, F. C. In vitro Anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. **J Nat Prod**, v. 60, n. 9, p. 884-888, 1997.

LLANO, M.; LEE, N.; NAVARRO, F.; GARCIA, P.; ALBAR, J. P.; GERAGHTY, D. E.; LOPEZ-BOTET, M. HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. **Eur J Immunol**, v. 28, p. 2854-2863, 1998.

MATSUO, M.; SASAKI, N.; SAGA, K.; KANEKO, T. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. **Biol Pharm Bull**, v. 28, n. 2, 253-259, 2005.

MATUO, R. Avaliação dos mecanismos envolvidos na resposta aos danos no DNA induzidos pelo agente antitumoral 5-fluorouracil. 2012. 256 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre 2012.

MCKELVEY-MARTIN, V.J.; GREEN, M.H.L.; SCMEZER, P.; POOL-ZOBEL, B.L.; DEMEO, M.P. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. **Mutat. Res**, v. 288, p. 47-63, 1993.

MCMAHON, J. B.; CURRENS, M. J.; GULAKOWSKI, R. J.; BUCKHEIT, R. W. J.; LACKMAN-SMITH, C.; HALLOCK, Y. F.; BOYD, M. R. Michellamine B, a novel plant alkaloid, inhibits human immunodeficiency virus—induced cell killing by at least two distinct mechanisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, p. 484-488, 1995.

MENIER, C.; RABREAU, M.; CHALLIER, J. C.; LE DISCORDE, M.; CAROSELLA, E. D.; ROUAS-FREISS, N. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. **Blood**, v. 104, n. 10. p. 3153-3160, 2004.

MICKUVIENE, I.; KIRVELIENE, VOL.; JUDOKA, B. Experimental survey of non-clonogenic viability assays for adherent cells in vitro. **Toxicol In vitro**, Vol. 18, p. 639-648, 2004.

MITSDOERFFER, M.; SCHREINER, B.; KIESEIER, B. C.; NEUHAUS, O.; DICHGANS, J.; HARTUNG, H. P.; WELLER, M.; WIENDL, H. Monocyte-derived HLA-G acts as a strong

inhibitor of autologous CD4 T cell activation and is upregulated by interferon-beta in vitro and in vivo: rationale for the therapy of multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, v. 159, n. 1-2, p. 155-164, 2005.

MÖLLER, P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 96, Suppl 1, p. 1-42, 2005.

MOREAU, P.; FAURE, O.; LEFEBVRE, S.; IBRAHIM, E. C.; O'BRIEN, M.; GOURAND, L.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; PAUL, P. Glucocorticoid hormones upregulate levels of HLA-G transcripts in trophoblasts. **Transplant proc**, v. 33, p. 2277-2280, 2001.

MOREAU P, MOUILLOT G, ROUSSEAU P, MARCOU C, DAUSSET J, CAROSELLA ED. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 1191–1196, 2003.

MORSE, M. A. & STONER, G. D. Cancer chemoprevention: principles and prospects. **Carcinogenesis**. v. 14, n. 9, p. 1737-1746, 1993.

MOON, Y. J.; WANG, X.; MORRIS, M. E. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicol In Vitro**, v. 20, n. 2, p. 187-210, 2006.

NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. Curr. **Opinion Chem. Biol**, v. 6, p. 297-305, 2002.

ONNO, M.; LE FRIEC, G.; PANGAULT, C.; AMIOT, L.; GUILLOUX, V.; DRENOU B, CAULET-MAUGENDRE, S.; ANDRÉ, P.; FAUCHET, R.. Modulation of HLA-G antigens expression in myelomonocytic cells. **Hum Immunol**, v. 61, p. 1086–1094, 2000.

ORŠOLIĆ, N.; GAJSKI, G.; GARAJ-VRHOVAC, V.; DIKIĆ, D.; PRSKALO, Z. Š.; SIROVINA, D. DNA-protective effects of quercetin or naringenin in alloxan-induced diabetic mice. **Eur J Pharmacol**, v. 656, n. 1-3, p. 110-118, 2011.

PANG, X.; YI, T.; YI, Z.; CHO, S. G.; QU, W.; PINKAEW, D.; FUJISE, K.; LIU, M. Morelloflavone, a biflavonoid, inhibits tumor angiogenesis by targeting rho GTPases and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. **Cancer Res**, v. 69, n. 2, p. 518-525, 2009.

PAUL, P.; CABESTRE, F. A.; IBRAHIM, E. C.; LEFEBVRE, S.; KHALIL-DAHER, I.; VAZEUX, G.; QUILES, R. .M., BERMOND, F.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G RNAm and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. **Hum Immunol**, v. 61, n. 11, p. 1138-1149, 2000.

PAUL, P.; ROUAS-FREISS, N.; KHALIL-DAHER, I.; MOREAU, P.; RITEAU, B.; LE GAL, F. A.; AVRIL, M. F.; DAUSSET, J.; GUILLET, J. G.; CAROSELLA E. D. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, p. 4510-4515, 1998.

PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription fac-tors. **Oncogene**,

v. 18, p. 6853–6866, 1999.

PAUL, P.; CABESTRE, F.A.; LE GAL, F. A.; KHALIL-DAHER, I.; LE DANFF, C.; SCHMID, M.; SCHMID, M.; MERCIER, S.; AVRIL, M. F.; DAUSSET, J.; GUILLET, J. G., CAROSELLA, E. D. Heterogeneity of HLA-G gene transcription and protein expression in malignant melanoma biopsies. **Cancer Res**, v. 59, p. 1954-1960, 1999.

PINKAEW, D.; CHO, S. G.; HUI, D. Y.; WIKTOROWICZ, J. E.; HUTADILOK-TOWATANA, N.; MAHABUSARAKAM, W.; TONGANUNT, M.; STAFFORD, L. J.; PHONGDARA, A.; LIU, M.; FUJISE, K. Morelloflavone blocks injury-induced neointimal formation by inhibiting vascular smooth muscle cell migration. **Biochim Biophys Acta**. v. 1790, n. 1, p. 31-39, 2009.

PITOT, H. C. Animal models of neoplastic development. **Dev Biol (Basel)**. v. 106, p. 53-57, 2001.

PITOT, H. C. Adventures in hepatocarcinogenesis. **Annu Rev Pathol**, v. 2, p. 1-29, 2007.

PRESTERA, T.; ZHANG, Y.; SPENCER, S.R.; WILCZAK, C. A.; TALALAY, P. The electrophile counterattack response: protection against neoplasia and toxicity, Adv. **Enzyme Regul.** v. 33, p. 281–296, 1993.

PROCHASKA, H. J & TALALAY, P. Regulatory mechanisms of monofunctional and

bifunctional anticarcinogenic enzymes inducers in murine liver. **Cancer Res**, v. 48, p. 4776-4782, 1988.

PROCHASKA, J. O.; DICLEMENTE, C. C.; VELICER, W. F.; ROSSI, J. S. Criticisms and concerns of the transtheoretical model in light of recent research. **Br J Addict**, v. 87, n. 6, p. 825-828, 1992.

PUBCHEM SUBSTANCE. Disponível em:
http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=135029098&loc=es_rss

PYO, C.; WILLIAMS, L. M.; MOORE, Y.; HYODO, H.; LI, S. S.; ZHAO, L. P.; SAGESHIMA, N.; ISHITANI, A.; GERAGHTY, D. E. HLA-E, HLA-F, and HLA-G polymorphism: genomic sequence defines haplotypes structure and variation spanning the nonclassical class I genes. **Immunogenetics**, v. 58, p. 241-251, 2006.

QIU, J.; TERASAKI, P. I.; MILLER, J.; MIZUTANI, K.; CAI, J.; CAROSELLA, E. D. Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. **Am J Transplant**, v. 6, n. 9, p. 2152-2156, 2006.

RAMOS, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. **J Nutr Biochem.**, v. 18, n. 7, p. 427-442, 2007.

RAMOS, A. A.; PEREIRA-WILSON, C.; COLLINS, A. R. Protective effects of ursolic acid and luteolin against oxidative DNA damage include enhancement of DNA repair in Caco-2 cells. **Mutat Res**, v. 692, n. 1-2, p. 6-11, 2010a.

RAMOS, A. A.; AZQUETA, A.; PEREIRA-WILSON, C.; COLLINS, A. R. Polyphenolic compounds from *Salvia* species protect cellular DNA from oxidation and stimulate DNA repair in cultured human cells. **J Agric Food Chem.** v. 58, n. 12, p. 7465-7471, 2010b.

REN, Y.; LANTVIT, D. D.; CARCACHE DE BLANCO, E. J.; KARDONO, L. B.; RISWAN, S.; CHAI, H.; COTTRELL, C. E.; FARNSWORTH, N. R.; SWANSON, S. M.; DING, Y.; LI, X.C.; MARAIS, J. P.; FERREIRA D.; KINGHORN A. D. Proteasome-inhibitory and cytotoxic constituents of *Garcinia lateriflora*: absolute configuration of caged xanthones. **Tetrahedron**, v. 66, n. 29, p. 5311-5320, 2010.

RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, **Free Rad. Biol. Med.** v. 20, p. 933–956, 1996.

RITEAU, B.; FAURE, F.; MENIER, C.; VIEL, S.; CAROSELLA, E. D.; AMIGORENA, S.; ROUAS-FREISS, N. Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells. **Hum Immunol**, v. 64, n. 11, p. 1064-1072, 2003.

RITEAU, B.; MOREAU, P.; MENIER, C.; KHALIL-DAHER, I.; KHOSROTEHRANI, K.; BRAS-GONCALVES, R.; PAUL, P.; DAUSSET, J.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E. D. Characterization of HLA-G1, -G2, -G3, and -G4 isoforms transfected in a human melanoma cell line. **Transplant Proc**, v. 33, n. 3, p. 2360-2364, 2001.

RIZZO, R.; STIGNANI, M.; MELCHIORRI, L.; BARICORDI, O. R. Possible role of human leukocyte antigen-G molecules in human oocyte/embryo secretome. **Hum Immunol.**, v. 70, n. 12, p. 970-975, 2009.

RIZZO, R.; VERCAMMEN, M.; VAN DE VELDE, H.; HORN, P. A.; REBMANN, V. The importance of HLA-G expression in embryos.; trophoblast cells.; and embryonic stem cells. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 3, 341-352, 2011.

ROUAS-FREISS, N.; MARCHAL, R. E.; KIRSZENBAUM, M.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D. The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 94, p. 5249–5254, 1997.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; MENIER, C.; CAROSELLA, E. D. HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system. **Semin Cancer Biol**, v. 13, p. 325–336, 2003.

ROUAS-FREISS, N.; BRUEL, S.; MENIER, C.; MARCOU, C.; MOREAU, P.; CAROSELLA, E. D. Switch of HLA-G alternative splicing in a melanoma cell line causes loss of HLA-G1 expression and sensitivity to NK lysis. **Int J Cancer**, v. 117, p. 114-122, 2005.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; MENIER, C.; LE MAOULT, J.; CAROSELLA, E. D. Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. **Semin Cancer Biol.**, v. 17, n. 6, p. 413-421, 2007.

SAW, C. L.; WU, Q.; KONG, A. N. Anti-cancer and potential chemopreventive actions of ginseng by activating Nrf2 (NFE2L2) anti-oxidative stress/anti-inflammatory pathways. **Chin Med.**, v. 27, n. 5, p. 37, 2010.

SCOLASTICI, C.; ALVES DE LIMA, R. O.; BARBISAN, L. F.; FERREIRA, A. L.; RIBEIRO, D. A.; SALVADORI, D. M. Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. **Toxicol In vitro**, v. 22, n. 2, p. 510-514, 2008.

SEEF, L. B.; LINDSAY, K. L.; BACON, B. R.; KRESINA, T. F.; HOOFNAGLE, J. H. Complementary and alternative medicine in chronic liver disease. **Hepatology**, v. 34, p. 595-603, 2001.

SHIROISHI, M.; TSUMOTO, K.; AMANO, K.; SHIRAKIHARA, Y.; COLONNA, M.; BRAUD, V. M.; ALLAN, D. S.; MAKADZANGE, A.; ROWL-JONES, S.; WILLCOX, B.; JONES, E. Y.; VAN DER MERWE, P. A.; KUMAGAI, I.; MAENAKA, K. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 100, p. 8856-8861, 2003.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SIESS, M.H.; LE BON, A.M.; SUSCHETET, M. Dietary modification of drug metabolizing enzyme activities: dose-response effect of flavonoids, *J. Toxicol. Environ. Health* 35 (1992) 141– 152.

SPORN, M. B. & SUH, N. Chemoprevention of cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 525-530, 2000.

SOLIER, C.; MALLET, V.; LENFANT, F.; BERTRAND, A.; HUCHENQ, A.; LE BOUTEILLER, P. HLA-G unique promoter region: functional implications. **Immunogenetics**, v. 53, p. 617-625, 2001.

SONG, L. L.; KOSMEDER, J. W.; LEE, S. K.; GERHÄUSER, C.; LANTVIT, D.; MOON, R. C.; MORIARTY, M.; PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive activity mediated by 4'-bromoflavone, a potent inducer of phase II detoxification enzymes. **Cancer Res**, v. 59, n. 3, p. 578-585, 1999.

SPORN, M. B. & NEWTON, D. L. Chemoprevention of cancer with retinoids. **Fed Proc**, v. 38, n. 11, p. 2528-2534, 1979.

SPORN, M. B. & LIBY, K. T. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 2, n. 10, p. 518-525, 2005.

SULLIVAN, L. C.; HOARE, H. L.; McCLUSKEY, J.; ROSSJOHN, J.; BROOKS, A. G. A structural perspective on MHC class Ib molecules in adaptive immunity. **Trends Immunol**, v. 27, n. 9, p. 413-420, 2006.

SUZART, L. R.; DANIEL, J. F. S.; CARVALHO, M. G.; KAPLAN, M. A. C. Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos em espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochnaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 984-987, 2007.

SUZUKI, M. & TAKAHASHI, T. Aberrant DNA replication in cancer. **Mutat Res**, v. 8, 2012.
[Epub ahead of print]

SZEKERES-BARTHO, J.; HALASZ, M.; PALKOVICS, T. Progesterone in pregnancy; receptor-ligand interaction and signaling pathways. **J Reprod Immunol**, v. 83, n. 1-2, p. 60-64, 2009.

TALALAY, P. Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes. **Biofactors**, v. 12, n. 1 - 4, p. 5-11, 2000.

TALALAY, P. & DINKOVA-KOSTOVA, A. T. Role of nicotinamide quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in protection against toxicity of electrophiles and reactive oxygen intermediates. **Methods Enzymol**, v. 382, p. 355–364, 2004.

TABAYOYONG, W. B. & ZAVAZAVA, N. Soluble HLA revisited. **Leuk Res**, v. 31, n. 2, p. 121–125, 2007.

TRAN, N.; ROSE, B. R.; O'BRIEN, C. J. Role of human papillomavirus in the etiology of head and neck cancer. **Head Neck**, v. 29, n. 1, p. 64-70, 2007.

TIAN, Q.; LI, J. ; XIE, X. ; SUN, M.; SANG, H.; ZHOU, C.; AN, T. ; HU, L. ; YE, R. D.,
WANG MW. Stereospecific induction of nuclear factor-kappaB activation by
isochamaejasmin. **Mol Pharmacol**. v. 68, n. 6, p. 1534-1542, 2005.

UDA, Y.; PRICE, K. R.; WILLIAMSON, G.; RHODES, M. J. Induction of the
anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells in vitro by
flavonoids. **Cancer Lett**. v. 120, n. 2, p. 213-216, 1997.

UROSEVIC, M.; WILLERS, J.; MUELLER, B.; KEMPF, W.; BURG, G.; DUMMER, R.
HLA-G protein upregulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10
expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. **Blood**, v. 99, n. 2, p.
609-617, 2002.

UROSEVIC, M.; DUMMER, R. HLA-g and IL-10 expression in human cancer—different
stories with the same message. **Semin Cancer Biol**, v. 13. p. 337–342, 2003.

VAN DEN EIJNDE, S. M.; LUIJSTERBURG, A. J.; BOSHART, L.; DE ZEEUW, C. I.; VAN
DIERENDONCK, J. H.; REUTELINGSPERGER, C. P.; VERMEJI-KEERS, C. In situ
detection of apoptosis during embryogenesis with annexin. V: from whole mount to
ultrastructure. **Cytometry**, v. 29, p. 313-320, 1997.

VANDIEDONCK, C. & KNIGHT, J. C. The human Major Histocompatibility Complex as a
paradigm in genomics research. **Brief Funct Genomic Proteomic**, v. 8, n. 5, p. 379-394, 2009.

WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of cancer. **Cancer Res**, v. 45, n. 1, p. 1-8, 1985.

WIENDL, H.; FEGER, U.; MITTELBRONN, M.; JACK, C.; SCHREINER, B.; STADELMANN, C.; ANTEL, J.; BRUECK, W.; MEYERMANN, R.; BAR-OR, A.; KIESEIER, B. C.; WELLER, M. Expression of the immune-tolerogenic major histocompatibility molecule HLA-G in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. **Brain**, v. 128, n. 11, p. 2689-2704, 2005.

WINSLOW, L. C. & KROL, D. J. Herbs as medicines. **Arch. Intern. Med.** v. 1258, p. 2192-2199, 1998.

YAMAMOTO, T. e NISHIOKA, K. Increased expression of p53 and p21 (waf1/cip1) in the lesional skin of bleomycin-induced scleroderma. *Arch Dermatol Res*, v. 296, n. 11, p. 509-513, 2005.

YANG, J. G.; LIU, B. G.; LIANG, G. Z.; NING, Z. X. Structure-activity relationship of flavonoids active against lard oil oxidation based on quantum chemical analysis. **Molecules**, v. 14, n. 1, p. 46-52, 2008.

YIE, S. M.; XIAO, R.; LIBRACH, C. L.; Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. **Hum reprod**, v. 21, p. 2538-2544, 2006.

YIE, SHANG-MIAN & HU ZHENBO. Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) as a marker for diagnosis, prognosis and tumor immune escape in human malignancies. **Histol Histopathol**, v. 26, p. 409-420, 2011.

ZAVAZAVA, N. Soluble HLA class I molecules: biological significance and clinical implications. **Mol Med Today**, v. 4, n. 3, p. 116-121, 1998.

ZIDI, I.; GUILLARD, C.; MARCOU, C.; KRAWICE-RADANNE, I.; SANGROUBER, D.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E. D; MOREAU, P. Increase in HLA-G1 proteolytic shedding by tumor cells: a regulatory pathway controlled by NF-kappaB inducers. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, p. 2669–2681, 2006.

CAPÍTULO 2

1. Produção Bibliográfica

Histol Histopathol (2011) 26: 1487-1497

<http://www.hh.um.es>

**Histology and
Histopathology**

Cellular and Molecular Biology

Expression of the nonclassical HLA-G and HLA-E molecules in laryngeal lesions as biomarkers of tumor invasiveness

Tarsia G. Silva¹, Janaina C.O. Crispim^{2,3}, Fabiana A. Miranda⁴, Marcela K. Hassumi⁴, Júlia M.Y. de Mello¹,
Renata T. Simões³, Francisco Souto⁵, Edson G. Soares⁴, Eduardo A. Donadi³ and Christiane P. Soares¹

¹Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, SP, ²Department of Clinical and Toxicology Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, UFRN, RN, ³Division of Clinical Immunology, Department of Medicine, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, ⁴Department of Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo-USP, SP, and ⁵Department of Internal Medicine, Federal University of Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil

Human Immunology 73 (2012) 258-262



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect



journal homepage: www.elsevier.com/locate/humimm



Upregulation of soluble and membrane-bound human leukocyte antigen G expression is primarily observed in the milder histopathological stages of chronic hepatitis C virus infection

Janaina Cristiana de Oliveira Crispim ^{a,*}, Tarsia Giabardo Alves Silva ^b, Francisco José Dutra Souto ^c,
Fernanda Fernandes Souza ^d, Carmen Lucia Bassi ^c, Christiane Pienna Soares ^b, Sérgio Zucoloto ^e,
Philippe Moreau ^f, Ana de Lourdes Candolo Martinelli ^d, Eduardo Antonio Donadi ^g

^a Department of Clinical Analysis and Toxicology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, CEP 59012-570, Brazil

^b Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo State, UNESP, São Paulo, CEP 14801-902, Brazil

^c School of Medical Sciences, Federal University of Mato Grosso, Cuiabá, CEP 78060-900, Brazil

^d Department of Internal Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, FMRP-USP, São Paulo, CEP 14049-900, Brazil

^e Department of Pathology, University of São Paulo, FMRP-USP, São Paulo, CEP 14049-900, Brazil

^f Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives, Université Paris VII/DSV/IBBM/Service de Recherches en Hématologie-Immunologie, IUIH, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France

^g Department Division of Clinical Immunology, Department of Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, (FMRP-USP), São Paulo, CEP 14049-900, Brazil



Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

American Journal of
OTOLARYNGOLOGY

American Journal of Otolaryngology–Head and Neck Medicine and Surgery 33 (2012) 193–198

www.elsevier.com/locate/amjoto

Original contributions

Expression of nonclassical molecule human leukocyte antigen–G in oral lesions

Paula A.G. Fregonezi^a, Tarsia G.A. Silva^a, Renata T. Simões^{b,c}, Philippe Moreau^d,
Edgardo D. Carosella^d, Carla P.M. Kläy^c, Maria A.G. Gonçalves^b, Edson G. Soares^c,
Francisco Souto^c, Eduardo A. Donadi^b, Christiane P. Soares^{a,*}

^aDepartment of Clinical Analyses, School of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, UNESP, University of São Paulo State, Brazil

^bDivision of Clinical Immunology, Department of Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^cDepartment of Pathology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^dCEA/2BM, Service de Recherche en Hémato-immunologie, Paris, France

^{*}Department of Internal Medicine, Federal University of Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil

Received 27 October 2009



Transplantation Proceedings, 42, 4505–4508 (2010)

Interferon- γ +874 Polymorphism in the First Intron of the Human Interferon- γ Gene and Kidney Allograft Outcome

J.C.O. Crispim, I.J. Wastowski, D.M. Rassi, C.T. Mendes-Junior Silva, C. Bassi, E.C. Castelli,
R.S. Costa, L.T. Saber, T.G.A. Silva, and E.A. Donadi

© 2010 Published by Elsevier Inc.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

Expression of human leucocyte antigen-G primarily targets affected skin of patients with psoriasis

R.N. Cardili, T.G. Alves,* J.C.O.C. Freitas,† C.P. Soares,* C.T. Mendes-Junior,‡ E.G. Soares,§ E.A. Donadi¶ and C. Silva-Souza

Department of Internal Medicine, Division of Dermatology, §Department of Pathology and ¶Division of Immunology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

*Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo State, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil

†Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University Federal of Rio Grande of Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil

‡Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

Tumor Biol. (2010) 31:513–522
DOI 10.1007/s13277-010-0064-2

RESEARCH ARTICLE

Alkaloids extracted from *Pterogyne nitens* induce apoptosis in malignant breast cell line

Roberta Aparecida Duarte • Elaine Rodrigues Mello • Camila Araki •
Vanderlan da Silva Bolzani • Dulce Helena Siqueira e Silva • Luis Octavio Regasini •
Tarsia Giabardo Alves Silva • Mauro César Cafundó de Moraes •
Valdecir Farias Ximenes • Christiane Pienna Soares

Received: 4 February 2010 / Accepted: 31 May 2010 / Published online: 11 August 2010
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2010

ARTICLE

Low Expression of Human Histocompatibility Soluble Leukocyte Antigen-G (HLA-G5) in Invasive Cervical Cancer With and Without Metastasis, Associated With Papilloma Virus (HPV)

Marcia C.M. Guimarães, Christiane P. Soares, Eduardo A. Donadi, Sophie F.M. Derchain, Líliliana A.L.A. Andrade, Tarsia G.A. Silva, Marcela K. Hassumi, Renata T. Simões, Fabiana A. Miranda, Régia C.P. Lira, Janaina Crispim, and Edson G. Soares

Department of Pathology (MCMG,MKH,FAM,RCPL,EGS) and Division of Clinical Immunology (EAD,RTS), Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo State, Araraquara, Brazil (CPS,TGAS); Department of Obstetrics and Gynecology (SFMD) and Department of Anatomic Pathology (LALAA), Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, São Paulo, Brazil; Department of Toxicology and Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University Federal Rio Grande do Norte State, Natal, Brazil (JC); and Núcleo de Pós-Graduação e Pesquisa, Santa Casa de Belo Horizonte, Brazil (RTS)

ARTICLE

Galectin-3 Overexpression in Invasive Laryngeal Carcinoma, Assessed by Computer-assisted Analysis

Fabiana A. Miranda, Marcela K. Hassumi, Marcia C.M. Guimarães, Renata T. Simões, Tarsia G.A. Silva, Régia C.P. Lira, Ana M. Rocha, Celso T. Mendes Jr., Eduardo A. Donadi, Christiane P. Soares, and Edson G. Soares

Department of Pathology, Faculty of Medicine (FAM,MKH,MCMG,RCPL,AMR,EGS), Division of Clinical Immunology, Department of Medicine, Faculty of Medicine (RTS,EAD), and Department of Chemistry, Faculty of Philosophy, Science and Letters (CTM) of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, and Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, São Paulo, Brazil (TGAS,CPS)