

Universidade Estadual Paulista – UNESP

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente

Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais – PosMat

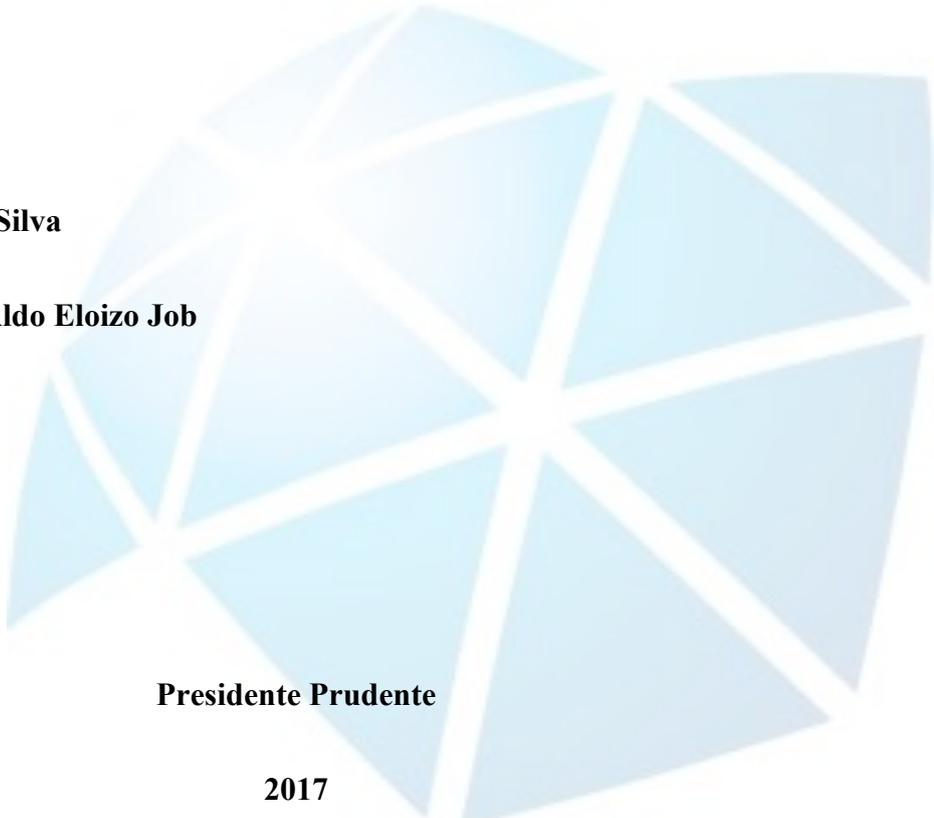
“Avaliação *in vitro* e *in vivo* da Capacidade Antioxidante e Antitumoral da Fração C do Látex de *Hevea brasiliensis* RRIM 600”

Leandra Ernst Kerche Silva

Orientador: Prof. Dr. Aldo Eloizo Job

Presidente Prudente

2017



Leandra Ernst Kerche Silva

**“Avaliação *in vitro* e *in vivo* da Capacidade Antioxidante e Antitumoral
da Fração C do Látex de *Hevea brasiliensis* RRIM 600”**

Tese apresentada como requisito à obtenção do título de Doutor à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração de Biomateriais, sob orientação do Prof. Dr. Aldo Eloizo Job.

Presidente Prudente

2017

Ficha catalográfica elaborada por

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO

UNESP - Bauru

Kerche-Silva, Leandra Ernst.

Avaliação *in vitro* e *in vivo* da capacidade antioxidante e antitumoral da fração C do látex de *Hevea brasiliensis*

RRIM 600 / Leandra Ernst Kerche Silva, 2017

106 f. : il.

Orientador: Aldo Eloizo Job

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual

Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2017

1. Látex. 2. Fração C. 3. *Hevea brasiliensis*. 4. Antioxidante. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE LEANDRA ERNST KERCHE SILVA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS.

Aos 03 dias do mês de fevereiro do ano de 2017, às 09:00 horas, no(a) Anfiteatro FCT-Unesp/Presidente Prudente, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. ALDO ELOIZO JOB - Orientador(a) do(a) Departamento de Física, Química e Biologia / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Prof. Dr. EDUARDO RENE PEREZ GONZALEZ do(a) Departamento de Química e Bioquímica / Faculdade de Ciências e Tecnologia do Câmpus de Presidente Prudente da UNESP, Prof. Dr. EDGARDO ALFONSO GOMEZ PINEDA do(a) Departamento de Química / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ, Prof. Dr. ANTONIO HERNANDES CHAVES NETO do(a) Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, PROFESSOR ASSOCIADO C ANELI DE MELO BARBOSA do(a) BIOQUÍMICA / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de LEANDRA ERNST KERCHE SILVA, intitulada *Avaliação in vitro e in vivo da Capacidade Antioxidante e Antitumoral da Fração C do Látex de Hevea brasiliensis RRIM 600*. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVAÇÃO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. ALDO ELOIZO JOB

Prof. Dr. EDUARDO RENE PEREZ GONZALEZ

Prof. Dr. EDGARDO ALFONSO GOMEZ PINEDA

Prof. Dr. ANTONIO HERNANDES CHAVES NETO

PROFESSOR ASSOCIADO C ANELI DE MELO BARBOSA

Dedico este trabalho ao meu marido
João Lucas e aos meus filhos João Marcos
e Laura, por aguentarem minha ausência
em tantos momentos e me suportarem com
amor incondicional. Eu amo vocês.

“todavia, para nós há um só Deus, o Pai, de quem
são todas as coisas e para quem existimos; e um só Senhor,
Jesus Cristo, pelo qual são todas as coisas, e nós também, por Ele.”

(1 Cor 8:6)

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem em uma penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”
(Theodore Roosevelt)

AGRADECIMENTOS

- *Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido a oportunidade de fazer o doutorado e por ter me dado forças para prosseguir até o fim. Eu sei que Deus enviou pessoas maravilhosas para me ajudar a trilhar esse caminho. Minha gratidão sem fim!*

- *Agradeço ao meu marido maravilhoso, João Lucas, que teve paciência em tantos momentos de desespero, por ter me dado suporte e muito carinho, e ter me ajudado a vencer essa batalha. Só ele e Deus para saber a dificuldade de trabalhar e levar um doutorado ao mesmo tempo! Eu te amo, meu amor!! Você e nossos filhos são as coisas mais preciosas que tenho na vida. Tudo isso é por vocês!*

- *Agradeço aos meus pais, Marcos e Sandra, e minha irmã Renata, por também me darem tanto suporte. Minha mãe morou 4 meses comigo enquanto eu estudava para a prova da POSMAT. Me ajudou a cuidar dos meus bebês para que eu pudesse galgar mais esse degrau em minha vida! Obrigada pelo carinho, pelo amor, pelo suporte tantas vezes financeiro! Amo vocês!*

- *Agradeço também aos meus sogros, João e Sonia, por também me suportarem de diversas formas. Seja cuidando dos bebês, seja fazendo comida para mim, seja financeiramente, vocês sempre estiveram aqui por mim. Amo vocês. Muito obrigada!*

- *Agradeço ao meu orientador, prof. Aldo, que aceitou me orientar mesmo sabendo que eu não estaria ali todos os dias, todos os momentos. Mesmo assim, acreditou que eu podia realizar esse trabalho. Obrigada pelas broncas, pela ajuda e por acreditar em mim!*

- *Agradeço de forma mais que especial à prof.^a Alessandra Cecchini. Me recebeu em seu laboratório, disponibilizou materiais e equipamentos, confiou no meu projeto e me ajudou de diversas formas. Não tenho nem palavras para agradecer tamanho suporte. Sem você, esse trabalho não existiria! Muito obrigada!*

- *Agradeço também de forma especial à Iriana e à Poliana, dois anjos do Laboratório de Patologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, que me ajudaram e fizeram muito por mim! Esse trabalho também é de vocês!*

- *Agradeço à minha amiga e grande ajudante Dalita. Sua chegada possibilitou os meios para a realização de uma grande parte desse trabalho. Quando eu te via como minha veterana na UEL, jamais imaginava que um dia estaríamos vivendo essa grande aventura juntas. Obrigada pelo suporte! Do fundo do meu coração!*
- *Agradeço também às companheiras de jornada Danna e Andressa, pelas risadas, pela ajuda, pela companhia!*
- *Agradeço à minha aluna de iniciação científica Caroline, pelos fins de semana em que me ajudou a montar lâminas, pelas coletas de látex, centrifugação, leitura das lâminas... muito obrigada!!!*
- *Agradeço também ao Eidi, da APTA, pela disponibilização do laboratório de cultivo celular. Obrigada por esse suporte!*
- *Agradeço à UNOESTE e à minha coordenadora querida, Dr.^a Nilva Galli, pelo suporte e por acreditar em meu trabalho!*
- *Agradeço às minhas amigas Pistow e Mazzucks pela simples presença em minha vida! Tudo fica mais leve porque tenho vocês!! E agora minhas sobrinhas Júlia e Manuela! Amo vocês!!!*
- *Agradeço à POSMAT, à FAPESP, ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro direto ou indireto.*
- *Agradeço também a cada pessoa que foi importante direta ou indiretamente na realização desse trabalho, e que por falta de memória, mas não de gratidão, possa não ter sido mencionada nessas linhas.*

**“Aqui, no entanto, nós não olhamos para trás
por muito tempo, nós continuamos seguindo em frente,
abrindo novas portas e fazendo coisas novas,
porque somos curiosos, e a curiosidade continua nos
conduzindo por novos caminhos.**

Siga em frente.”

(Walt Disney)

RESUMO

KERCHE-SILVA, L. E. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* da Capacidade Antioxidante e Antitumoral da Fração C do Látex de *Hevea brasiliensis* RRIM 600.** 2017. 106f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Presidente Prudente, São Paulo.

Biomateriais podem ser definidos como dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos tanto na forma de sólidos quanto de líquidos e géis. Para um novo biomaterial, são necessários testes toxicológicos e de interação *in vitro* e *in vivo*. O látex é uma substância branca e leitosa que exsuda da casca da *Hevea brasiliensis* quando a mesma é perfurada e que tem sido apontado como um biomaterial promissor. O látex quando centrifugado em alta velocidade é separado em três frações: a fração com partículas de borracha, uma fração aquosa chamada fração C e uma fração de fundo chamada fração B. A fração C é a fração metabolicamente ativa do látex. Assim, o presente estudo investigou os potenciais efeitos antioxidantes, citotóxicos, genotóxicos e antitumorais da fração C do látex da *Hevea brasiliensis*. Para isso, foram utilizados os testes de sequestro de radicais livres e capacidade antioxidante total em meio *in vitro* sem células; o teste do MTT, o ensaio do cometa, avaliação de morte celular com coloração com Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio (PI) e avaliação de parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo em meio *in vitro* com duas linhagens celulares, a CHO-k1, linhagem de células normais de epitélio de ovário de hamster, e a B16F10, linhagem de células de melanoma murino; e a ação da fração C na indução de carcinoma de células escamosas (SCC) em camundongos SKH-1 por exposição crônica à radiação UVB. Nossos resultados mostraram que a fração C é antioxidante, com capacidade para sequestrar os radicais HO[•] e NO[•] e o H₂O₂. A fração C não alterou a viabilidade celular das células CHO-k1, não induziu danos no DNA dessas células, não induziu apoptose e necrose e nem alterou a quantidade de tiol total e de malonaldeído (MDA) nessas células. No entanto, para a linhagem celular B16F10, a fração C mostrou atividade antitumoral, reduzindo a viabilidade celular, induzindo danos no material genético, induzindo morte celular e alterando os níveis de tiol e MDA nessas células. Nos animais que foram expostos cronicamente à radiação UVB, a fração C protegeu os eritrócitos e a pele dos animais do estresse oxidativo promovido pela irradiação e protegeu as células da pele de transformação maligna para SCC. Em resumo, nossos resultados mostraram que a fração C do látex da *H. brasiliensis* apresenta propriedades terapêuticas antioxidantes e antitumorais.

Palavras-chave: látex, fração C, *Hevea brasiliensis*, antioxidante, antitumoral.

ABSTRACT

KERCHE-SILVA, L. E. ***In vitro* and *in vivo* evaluation of antioxidant and antitumor capacity of Latex C-serum from *Hevea brasiliensis* RRIM 600.** 2017. 106 p. Thesis (PhD, Doctoral). Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Presidente Prudente, São Paulo.

Biomaterials can be defined as devices that come in contact with biological systems in the form of solids, liquids and gels. *In vitro* and *in vivo* toxicological tests are needed for a new biomaterial to come out. Latex is a white and milky solution that exsudes from *Hevea brasiliensis* bark when perforated, and it has been appointed as a new promising biomaterial. When centrifuged in high speed, latex can be separated in three parts: rubber particle fraction, aqueous C-serum fraction and a bottom fraction called B-serum. C-serum is the part that is metabolically active. In this way, the aim of this work was to investigate potential antioxidant, cytotoxic, genotoxic and antitumor effects of latex C-serum from *Hevea brasiliensis*. For this purpose, we used *in vitro* free-radical scavenger and total antioxidant capacity tests; MTT test, comet assay, staining with Hoechst 33342 and Propidium Iodide (PI) to evaluate cell death, and evaluation of biochemical parameters of oxidative stress in Chinese hamster ovary epithelium normal cell line, CHO-k1, and murine melanoma cell line, B16F10; and C-serum effects in the induction of squamous cell carcinoma (SCC) in SKH-1 mice by chronic UVB exposure. Our results show that latex C-serum is an antioxidant compound that was able to scavenge HO[•] and NO[•] radicals and H₂O₂. C-serum did not alter the cell viability in CHO-k1 cells and it did not promote DNA damage in these cells, it did not alter the levels of apoptotic and necrotic cells for this cell lineage and did not alter total thiol and MDA levels in these cells. However, for B16F10 cells, latex C-serum presented antitumor effect, reducing cell viability, inducing DNA damage and cell death, and altering total thiol and MDA levels in these cells. In the animals chronically exposed to UVB radiation, latex C-serum protected the erythrocytes and skin cells from oxidative stress promoted by the irradiation, and prevented skin cells from malignant transformation to SCC. In summary, this work shows that latex C-serum from *Hevea brasiliensis* present antioxidant and antitumor therapeutic properties.

Keywords: latex, C-serum, *Hevea brasiliensis*, antioxidant, antitumor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas do ciclo de vida de um biomaterial	2
Figura 2. O látex de <i>Hevea brasiliensis</i> ao exsudar da casca	4
Figura 3. Frações do látex fresco obtidas após centrifugação	5
Figura 4. Partículas de borracha envolvidas por uma camada proteína-fosfolipídio	6
Figura 5. Esquema representativo das diferentes camadas da pele	8
Figura 6. Penetração dos diferentes raios UV nas camadas da pele	9
Figura 7. Fontes endógenas e exógenas de espécies reativas na pele, e mecanismos de defesa antioxidante	10
Figura 8. Modelo mostrando a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em dois sistemas na célula	13
Figura 9. Estrutura química do ascorbato	17
Figura 10. Estrutura química do α -tocoferol	17
Figura 11. Proteção da peroxidação lipídica de membrana pelo α -tocoferol, e posterior regeneração do mesmo pelo ascorbato	18
Figura 12. Classificação dos nucleoides de células B16F10 no ensaio do cometa após coloração com GelRed	31
Figura 13. Classificação morfológica das células apoptóticas, necróticas e normais	32
Figura 14. Camundongo SKH-1 após 15 semanas de irradiação por radiação UVB	34

Figura 15. Capacidade de sequestro do radical hidroxil (HO [•]) por diferentes concentrações da fração C do látex	39
Figura 16. Capacidade de sequestro do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) por diferentes concentrações da fração C do látex	40
Figura 17. Capacidade de sequestro do óxido nítrico (NO [•]) por diferentes concentrações da fração C do látex	41
Figura 18. Capacidade antioxidante total de diferentes concentrações da fração C do látex	42
Figura 19. Porcentagem de células de ovário de hamster chinês (CHO-k1) viáveis no teste de viabilidade celular (MTT)	43
Figura 20. Porcentagem de células de melanoma murino (B16F10) viáveis no teste de viabilidade celular (MTT)	44
Figura 21. <i>Score</i> de dano celular no ensaio do cometa em células de ovário de hamster chinês (CHO-k1)	45
Figura 22. <i>Score</i> de dano celular no ensaio do cometa em células de melanoma murino (B16F10)	46
Figura 23. Porcentagem de células apoptóticas da linhagem CHO-k1 após exposição de 24 h a três concentrações da fração C do látex de <i>H. brasiliensis</i> (5, 50 e 100 µg/ml)	48
Figura 24. Porcentagem de células necróticas da linhagem CHO-k1 após exposição de 24 h a três concentrações da fração C do látex de <i>H. brasiliensis</i> (5, 50 e 100 µg/ml)	48
Figura 25. Comparação entre as porcentagens de células normais, apoptóticas e necróticas da linhagem CHO-k1	49

Figura 26. Porcentagem de células apoptóticas da linhagem B16F10 após exposição de 24 h a três concentrações da fração C do látex de <i>H. brasiliensis</i> (5, 50 e 100 µg/ml).....	50
Figura 27. Porcentagem de células necróticas da linhagem B16F10 após exposição de 24 h a três concentrações da fração C do látex de <i>H. brasiliensis</i> (5, 50 e 100 µg/ml).....	51
Figura 28. Comparação entre as porcentagens de células normais, apoptóticas e necróticas da linhagem B16F10	51
Figura 29. Fração C do látex de <i>Hevea brasiliensis</i> induz morte celular em células de melanoma murino (B16F10)	52
Figura 30. Avaliação dos níveis de tiol total nas células CHO-k1	53
Figura 31. Avaliação dos níveis de tiol total nas células B16F10	54
Figura 32. Avaliação dos níveis de malonaldeído (MDA) nas células CHO-k1	55
Figura 33. Avaliação dos níveis de malonaldeído (MDA) nas células B16F10	55
Figura 34. Quantificação da atividade da catalase nos eritrócitos de animais não irradiados e irradiados	57
Figura 35. Quantificação dos níveis de glutathiona (GSH) em eritrócitos de animais não irradiados e irradiados	58
Figura 36. Capacidade antioxidante total (TRAP) em animais não irradiados e irradiados medida pelo método da quimioluminescência	60
Figura 37. Quantificação da atividade da catalase cutânea em animais não irradiados e irradiados	61
Figura 38. Quantificação dos níveis de glutathiona (GSH) em animais não irradiados e irradiados	62

Figura 39. Quantificação dos níveis de malonaldeído (MDA) em animais não irradiados e irradiados	63
Figura 40. Avaliação histopatológica das lesões induzidas por radiação UVB em camundongos SKH-1	65
Figura 41. Efeito da fração C do látex de <i>Hevea brasiliensis</i> no desenvolvimento de AK e SCC e proliferação epidérmica	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B16F10	Células de melanoma murino
CAT	Catalase
CBC	Carcinoma basocelular
CEC	Carcinoma espinocelular
CHO-k1	Células de ovário de hamster chinês
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	5-5'-ditio-bis-2-ácido-nitrobenzoico
DXR	Dorrorubicina
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GSH-Px	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO [•]	Radical hidroxil
HCT116	Adenocarcinoma colorretal humano
HeLa	Carcinoma de colo de útero
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano
Hoechst 33342	Trihidrocloreto de BisBenzimidina H33342
LMP	Baixo ponto de fusão
MDA	Malonaldeído
MED	Dose mínima eritematosa
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NO [•]	Radical óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato-salino
PI	Iodeto de propídio
RNA	Ácido ribonucleico
ROO [•]	Radical peroxil
SOD	Superóxido dismutase
SKH-1	Camundongos <i>hairless</i>

TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRAP	Capacidade antioxidante total
VC	Viabilidade celular
UV	Radiação Ultravioleta

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Abreviaturas e Siglas	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Biomateriais.....	1
1.2 Látex.....	3
1.2.1 Látex da <i>Hevea brasiliensis</i>	3
1.3 Câncer de pele.....	7
1.3.1 Radiação UV, Estresse Oxidativo e Câncer.....	9
1.3.2 Câncer de pele não melanoma.....	11
1.3.3 Câncer de pele melanoma.....	11
1.4 Estresse Oxidativo e Antioxidantes.....	12
1.4.1 Espécies reativas e Estresse Oxidativo.....	12
1.4.2 Defesas antioxidantes.....	14
1.5 Estresse Oxidativo e Câncer de Pele.....	19
1.6 Fotoprotetores.....	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivos Gerais.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Coleta do látex e obtenção da fração C.....	24
3.2 Preparo da fração C para os testes <i>in vitro</i>	24
3.3 Preparo dos cremes de fração C para os testes <i>in vivo</i>	25
3.4 Testes <i>in vitro</i> em meio sem células.....	25
3.4.1 Atividade de sequestro de radicais hidroxil (HO [•]).....	25
3.4.2 Atividade de sequestro de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	26
3.4.3 Atividade de sequestro do radical óxido nítrico (NO [•]).....	26

3.4.4 Capacidade antioxidante total.....	27
3.5 Testes <i>in vitro</i> em meio com células.....	28
3.5.1 Linhagens celulares CHO-k1 e B16F10 e Condições de Cultura.....	28
3.5.2 Doxorrubicina.....	28
3.5.3 Teste de Viabilidade Celular.....	29
3.5.4 Ensaio do Cometa.....	29
3.5.5 Detecção morfológica de células apoptóticas e necróticas.....	31
3.5.6 Parâmetros de Estresse Oxidativo.....	32
3.6 Testes <i>in vivo</i>	33
3.6.1 Animais, irradiação UVB e tratamento com o creme de fração C.....	33
3.6.2 Análise antioxidante de eritrócitos.....	35
3.6.3 Análise antioxidante da pele.....	35
3.6.4 Análise histopatológica.....	37
3.7 Análise estatística.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Testes <i>in vitro</i> em meio sem células.....	38
4.2 Testes <i>in vitro</i> em meio com células.....	42
4.3 Testes <i>in vivo</i>	56
5 CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXOS.....	88
Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 BIOMATERIAIS

Os biomateriais representam cerca de 300 mil dos produtos utilizados na área da saúde há cerca de 10 anos [1]. Dentre eles estão os dispositivos médicos (biossensores, tubos de circulação sanguínea, sistemas de hemodiálise), materiais implantáveis (como suturas, placas, substitutos ósseos, tendões, telas ou malhas, válvulas cardíacas, lentes, dentes), dispositivos para a liberação de medicamentos (na forma de filmes, implantes subdérmicos e partículas), órgãos artificiais (como coração, rim, fígado, pâncreas, pulmões, pele) e curativos, dentre outros [2].

Biomateriais podem ser definidos como dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos (incluindo fluidos biológicos), com aplicações diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas. Os biomateriais podem ser constituídos de compostos de origem sintética ou natural, assim como de materiais naturais quimicamente modificados, tanto na forma de sólidos quanto de géis, pastas ou mesmo líquidos, não sendo necessariamente fabricados, como válvulas cardíacas de porcos e retalhos de pele humana tratados para uso como implantes [2].

As características necessárias para o uso de um biomaterial são biocompatibilidade, não ser tóxico e nem carcinogênico, apresentar bioestabilidade, propriedades mecânicas adequadas, peso e densidade adequados, ter custo baixo, ser reprodutível e de fácil fabricação [3]. Os biomateriais devem também estar associados a uma determinada resposta biológica particular, disparada por sinais originados em nível molecular que incluem: correntes elétricas, distribuição eletrônica, conformação molecular, estado de agregação ou propriedades físico-químicas locais particulares, características que podem ser introduzidas por arranjos especiais de grupos funcionais sobre uma estrutura polimérica, reações de reticulação, propriedades particulares de superfície e arranjos macromoleculares [4].

Até o século XIX, a abordagem adotada no desenvolvimento e aplicação dos biomateriais era do tipo tentativa e erro. No início do uso de biomateriais de forma mais sistematizada, nas proximidades da década de 1950, o foco era o material em si, então buscava-se materiais bioinertes. Com o passar do tempo, o alvo de busca tornou-se a bioatividade dos biomateriais, e mais recentemente, o objetivo tem sido a regeneração de um tecido funcional de fato, com foco, então, no aspecto biológico [5]. Em suma, com o

passar do tempo, o objetivo de obtenção de materiais biocompatíveis, que pudessem substituir um tecido danificado e prover suporte mecânico, com mínima resposta biológica do paciente, passou para os materiais biodegradáveis, com capacidade de serem incorporados ou absorvidos pelo tecido hospedeiro, e mais recentemente o foco tornou-se os materiais biomiméticos, materiais que participam de forma ativa no processo de recuperação, atuando de forma específica, em nível celular, no hospedeiro [6].

São várias as etapas envolvidas desde a identificação da necessidade de um biomaterial até a utilização e análise final do produto. O processo se inicia com a identificação da necessidade de um biomaterial, que pode ser o tratamento de uma doença, a substituição de um órgão ou o uso meramente cosmético. A seguir, desenvolve-se o projeto e síntese do material para testes diversos e, com base na escolha dos que se mostrarem mais apropriados, encaminha-se para testes toxicológicos e de interação *in vivo* e *in vitro*. Em seguida são enfocados aspectos regulatórios relacionados à pré-aprovação no mercado, aos estudos clínicos iniciais, à triagem clínica e ao acompanhamento de longo prazo. O desenvolvimento tem sequência mesmo após a aprovação do uso clínico do material, com análise e registro de *explants* extraídos de pacientes visando o entendimento de eventuais falhas para sua correção. A Figura 1 ilustra os passos de desenvolvimento de um biomaterial.

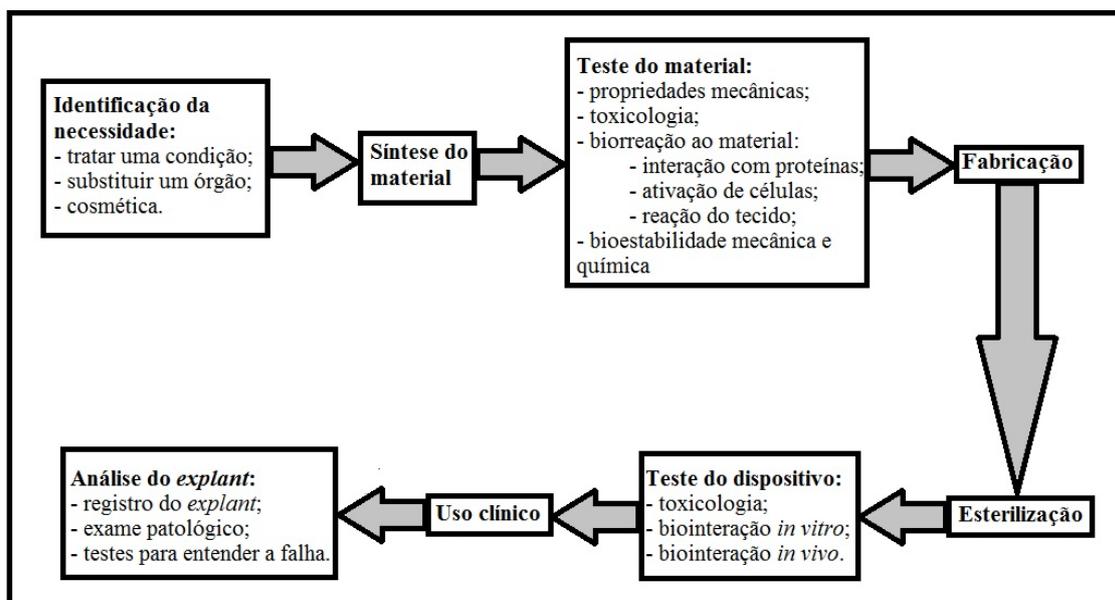


Figura 1. Etapas do ciclo de vida de um biomaterial, desde a sua concepção baseada em uma necessidade específica, até seu uso clínico e avaliação posterior (adaptada de Pires, A. L. R. et al., 2015 [2]).

1.2 LÁTEX

O látex é sintetizado numa rede de anéis laticíferos, organizados como sistemas de vasos paracirculatórios, na casca interna das plantas. O látex é o citoplasma das células laticíferas, e sua composição assemelha-se com a composição das células comuns, exceto por possuir de 30-45% de borracha natural [7].

O metabolismo dessas células praticamente consiste em transformar sacarose em *cis*-poli-isopreno, o composto químico mais abundante do látex, responsável pela formação da borracha [8]. Diferentemente das outras células vegetais, os vacúolos dos laticíferos são pequenos e apresentam pequenas vesículas lisossomais: os lutoídes, que além de apresentarem solutos orgânicos e minerais de baixo peso molecular, apresentam grandes quantidades de proteínas aniônicas e catiônicas [7]. Uma grande gama de proteínas já foi descrita nos fluídos do látex, incluindo proteínas solúveis de biossíntese da borracha, defesa da planta e de metabolismo oxidativo [9,10]. É provado que plantas laticíferas são uma rica fonte de biomoléculas ativas, e sua eficácia é frequentemente embasada pelo seu uso prévio na medicina popular [11].

O látex exsudado apresenta, além do *cis*-poli-isopreno, metabólitos secundários e proteínas, em concentrações muito maiores que nas folhas. Dentre esses metabólitos, encontram-se diversas substâncias que são biologicamente ativas, incluindo compostos que asseguram resistência a herbívoros através de efeitos tóxicos e antinutritivos. Muitos desses compostos relacionados à defesa das plantas (borracha, cisteíno-proteases, alcaloides, etc.) aparecem no látex de grupos filogeneticamente distantes, sugerindo funções comuns e evolução convergente [12].

1.2.1 Látex da *Hevea brasiliensis*

O látex da *Hevea brasiliensis* exsuda da casca quando esta é perfurada (Figura 2). A maior parte do látex colhido é coagulada para a fabricação de produtos da “borracha seca”, incluindo pneus automotivos. O látex da *H. brasiliensis* pode ser estabilizado numa forma não coagulada através da amoniação, o que permite que o látex seja utilizado para fabricação de outros produtos, como as luvas de procedimentos cirúrgicos [13].



Figura 2. O látex de *Hevea brasiliensis* ao exsudar da casca após perfuração da mesma (www.mundoeducacao.bol.uol.com.br).

Um terço do peso do látex da *H. brasiliensis* é constituído de borracha natural¹³, porém 1 a 2% do seu peso é constituído de proteínas, o que pode contabilizar centenas de proteínas [14,15]. Outros constituintes como lipídeos, quebrachitol, ácidos ribonucleicos e sais orgânicos também estão presentes [16].

Nos últimos anos, estudos têm sido publicados sobre um novo material, a biomembrana de látex da *Hevea brasiliensis*, que tem se mostrado um importante indutor de cicatrização de feridas, regeneração de parede esofágica de cachorros, e regeneração de membranas timpânicas, através de mecanismos envolvidos com o aumento da vascularização [17-19]. Esse aumento da vascularização seria induzido por fatores de crescimento vascular presentes no látex e que, através de indução angiogênica, aceleraria o fechamento de feridas através da formação de um novo epitélio de revestimento [20,21].

Além de formar as biomembranas, – que representam um coloide complexo feito de partículas de borrachas e corpos lutoides suspensos em um meio rico de proteínas e outros solutos – o látex pode ser centrifugado em alta velocidade, e separado em frações que consistem em: uma camada superior de partículas de borracha, uma fase aquosa conhecida como fração C (*Centrifuged-serum*), e uma fração de fundo, fração B (*Bottom-serum*), composta pelos corpos lutoides [22-24] (figura 3).

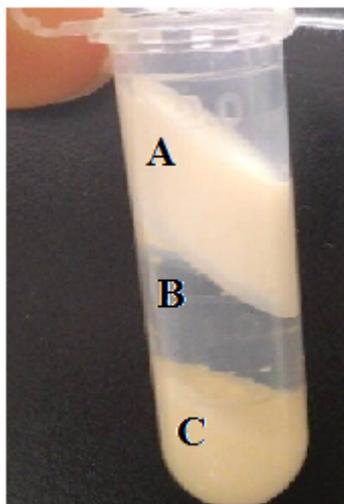


Figura 3. Frações do látex fresco obtidas após centrifugação – A: partículas de borracha, B: *Centrifuged serum* (Fração C), C: *Bottom serum* (Fração B).

As partículas de borracha constituem entre 25-45% do volume de látex fresco e apresentam um diâmetro médio de 50 Å a 3 µm, sendo as partículas normalmente esféricas [25,26]. Essas partículas são formadas por moléculas hidrofóbicas que ficam separadas do meio hidrofílico intracelular por um filme de proteínas e lipídios [27]. As principais proteínas localizadas na superfície das partículas de borracha são chamadas *Hev b 1* e *Hev b 3*, sendo a primeira encontrada nas partículas de borracha maiores (acima de 0,4 µm de diâmetro), e a última é mais abundante em partículas de borrachas menores [28-30].

A associação de proteínas com fosfolipídios foi descoberta por Bowler, em 1953 [31], e o mesmo evidenciou o fato de que esta associação confere carga negativa para a partícula de borracha, estabilizando-as como coloides [28].

Um novo modelo tem sido proposto para explicar a nanoestrutura da superfície de partículas de borracha natural, conforme evidenciado na Figura 4. Esse modelo apresentaria um núcleo hidrofóbico de partículas de borracha natural, rodeado por moléculas de proteínas e fosfolipídios com cerca de 20 nm de espessura [32].

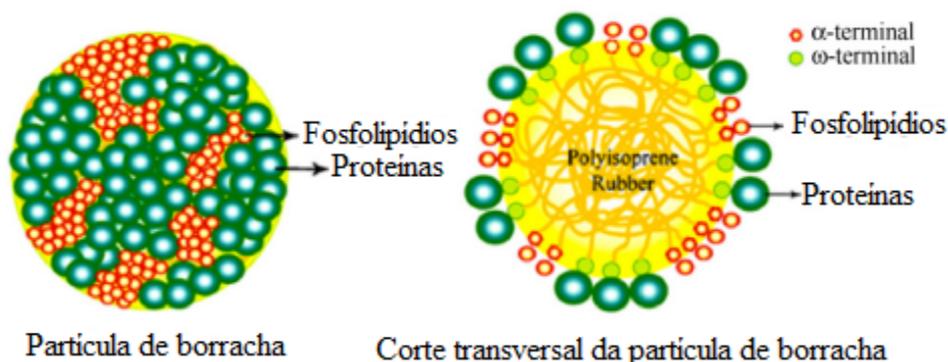


Figura 4. Partículas de borracha envolvidas por uma camada proteína-fosfolípido (adaptado de Nawamawat et al., 2011 [32]).

Esse modelo proporciona a medição direta da espessura da camada de superfície e do arranjo molecular das proteínas e dos fosfolípidios, sugerindo também a quantificação de proteínas em 84% e fosfolípidios 16% [32]. O tamanho das partículas tem sido relatado entre 0,30 e 0,70 μm [33].

A fração C do látex da *H. brasiliensis* é composta de uma solução rica em carboidratos, eletrólitos, proteínas e aminoácidos. Essa solução refere-se ao meio aquoso, no qual todas as organelas encontradas no látex estão suspensas, contendo, dessa forma, uma grande variedade de proteínas relacionadas com o metabolismo celular [29]. A quantidade de proteínas encontradas na fração C é significativa, provavelmente na casa de centenas, sendo, inclusive, as enzimas associadas com a via de biossíntese da borracha também encontradas nesse soro [28].

O principal carboidrato que compõe a fração C é o monossacarídeo quebrachitol (1-metil inositol) e não se tem uma implicação exata com a sua função no látex. Acredita-se que esse composto tenha a capacidade de sequestrar radicais peroxinitritos, tendo assim uma função protetora [34,35]. Alguns carboidratos encontrados no látex podem ser oxidados a ácidos voláteis (fórmico, acético e propiônico), sendo uma das medidas de qualidade do látex [36].

A fração C e seus constituintes têm sido implicados em diversas propriedades biológicas, como propriedades antioxidantes e antifúngicas [37,38]. Porém, a primeira aplicação do potencial terapêutico da fração C foi sugerida quando uma sub-fração da mesma mostrou propriedades anti-proliferativas específicas contra linhagens celulares de

origem maligna [39]. Lam e colaboradores (2012) [40] estudaram as sub-frações da fração C em duas linhagens celulares originadas de cânceres humanos – adenocarcinoma hepatocelular (HepG2) e adenocarcinoma colorretal (HCT116) –, e o estudo mostrou que a ação anti-proliferativa da fração C foi específica para a linhagem de carcinoma hepático, e que a morte não acontecia por via apoptótica.

A importância desse estudo está no fato de que de 10% a 20% apenas dos carcinomas hepatocelulares podem ser completamente removidos cirurgicamente [41,42]. Se a fração C do látex puder ser utilizada especificamente nas células malignas do fígado, as mesmas poderão ter o seu crescimento suprimido e até mesmo poderão ser eliminadas após a cirurgia de remoção do tumor, aumentando as chances de recuperação dos hepatócitos saudáveis [40]. Este resultado torna-se interessante por vários fatores, sendo os principais o baixo custo e a simplicidade na produção da fração C, e sua abundância em regiões produtoras de látex.

Constituindo a fração B encontram-se os lutoídes, componentes não isoprênicos mais abundantes no látex de *H. brasiliensis*. Estes são vacúolos esféricos, com diâmetros entre 0,5 e 3 μm , e que conduzem à interrupção do fluxo de látex por serem osmoticamente sensíveis e incharem dentro dos vasos laticíferos [43, 44]. No interior dos lutoídes encontram-se diversas substâncias dissolvidas, tais como ácidos orgânicos, sais minerais, proteínas, açúcares, e algumas organelas como ribossomos e retículo endoplasmático [45]. A principal proteína encontrada nesses vacúolos é a heveína [29].

O látex, em suas diferentes frações, apresenta grande potencial para uso como biomaterial. E como estudos prévios mostraram a ação específica antitumoral da fração C em células HepG2 [40] e carcinoma de colo de útero humano (HeLa) [39], testes em outros tipos de cânceres, como o câncer de pele, podem trazer resultados significativos.

1.3 CÂNCER DE PELE

O câncer de pele é a neoplasia mais comum no mundo. Vários são os fatores etiológicos envolvidos com a neoplasia cutânea, como: fenótipo da pele, localização geográfica, exposição solar [46], redução da camada de ozônio, entre outros, sendo a exposição à radiação ultravioleta (UV) o fator mais importante [47]. A radiação UV tem a capacidade de induzir mutações epigenéticas, promovendo a expansão da população de células iniciadas, além de inflamação dérmica, hiperplasia epidérmica, alteração na expressão de múltiplos genes associados com a proliferação, diferenciação e produção de

citocinas [48], além de formar dímeros de pirimidina, provocar peroxidação lipídica, e formação de espécies reativas de oxigênio (ERO).

O câncer de pele pode ser classificado em dois grandes grupos: o melanoma e o não-melanoma. O melanoma é originário dos melanócitos, e é raro se comparado ao não melanoma [49]. Porém, a incidência do melanoma tem aumentado nas últimas quatro décadas. No ano de 2011, mais de 75 mil norte-americanos foram diagnosticados com melanoma, e mais de 9 mil foram a óbito. No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), no ano de 2016, houve 5.670 novos casos de melanoma (sendo 3 mil homens e 2.670 mulheres) e em torno de 1.547 óbitos. Esse câncer apresenta a característica de se disseminar via linfática para regiões corpóreas distantes do sítio primário, possuindo alto potencial metastático, além de ser menos responsivo às terapias sistêmicas [50].

O câncer não melanoma, por sua vez, é originado a partir das células epidérmicas, variando a sua origem da camada basal da epiderme, resultando no carcinoma basocelular (CBC), ou se originando da camada espinhosa, resultando no carcinoma espinocelular (CEC) [49] (figura 5). O câncer não melanoma é o mais comum, acometendo mais de 1,2 milhão de pessoas por ano nos EUA [51,52], e esta alta incidência representa uma preocupação pública devido aos altos custos de medicamentos, à morbidade causada e aos resultados estéticos [53]. No Brasil, o acometimento deste tipo de câncer é o mais frequente em ambos os sexos, sendo que em homens a maior ocorrência se dá nas regiões Centro-Oeste, Sul e Norte, e em mulheres ocorre de forma homogênea em todas as regiões [54]. De acordo com dados do INCA, em 2016 no Brasil, 175.760 indivíduos foram diagnosticados com câncer de pele não melanoma.

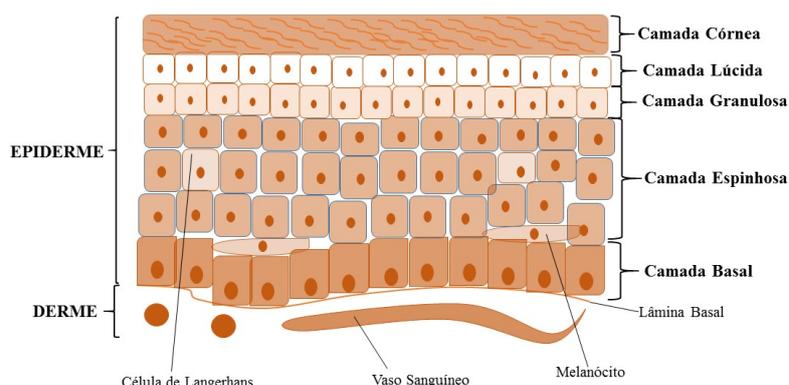


Figura 5. Esquema representativo das diferentes camadas da pele.

1.3.1 Radiação UV, Estresse Oxidativo e Câncer

A radiação ultravioleta (UV) tem a capacidade de provocar diversas reações fotoquímicas ao alcançar a pele. As ondas de radiação penetram diretamente, interagindo com as células da epiderme e da derme (figura 6). Inicialmente, esta interação pode estimular a produção de melanina, visível sob a forma de bronzeamento da pele, ou pode levar a pequenas inflamações ou graves queimaduras. A exposição crônica é considerada um dos agentes mais importantes para o desenvolvimento de doenças cutâneas malignas e o envelhecimento [55-57].

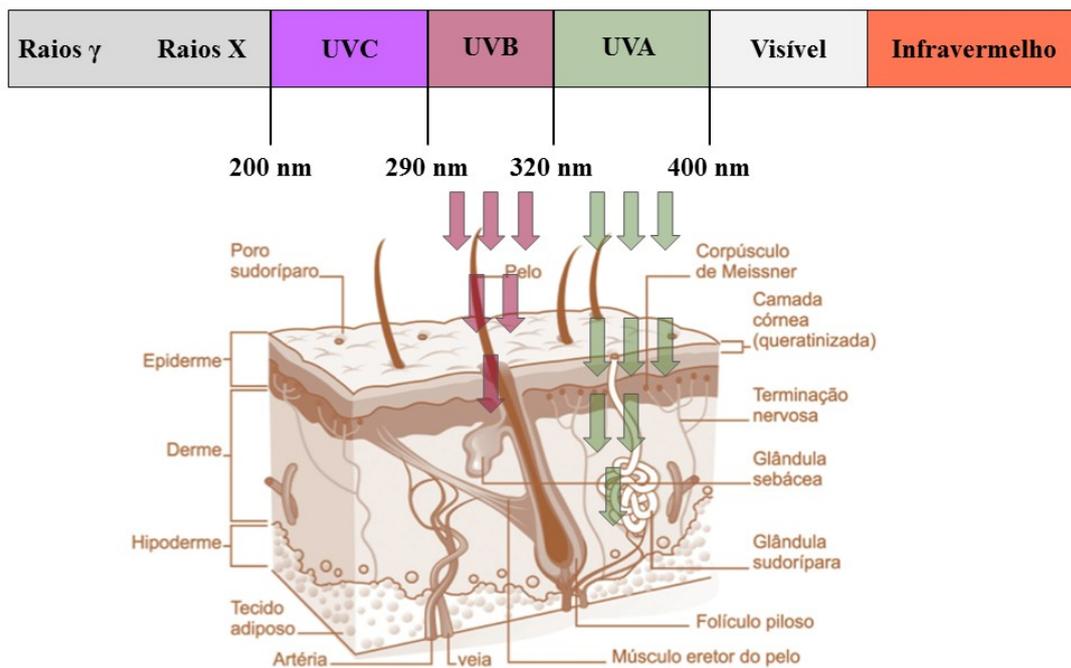


Figura 6. Penetração dos diferentes raios UV nas camadas da pele (adaptado de Birch-Marchin e Swalwell, 2010 [58]).

Os raios solares contêm a radiação UV A, B e C. Os raios UVC incidem em um comprimento de onda que varia entre 180 e 290 nm, enquanto os raios UVB incidem entre 290 e 320 nm, e os raios UVA entre 320 e 400 nm. Os raios UVA e UVB são os principais responsáveis pela maior parte das lesões cutâneas devido à excessiva exposição à radiação solar [59,60].

Embora haja muito mais radiação UVA do que UVB no espectro solar (95% : 5%), a radiação UVB é 1000 vezes mais eficaz em produzir eritema do que a UVA. A UVB requer de 2,0 a 5,0 J/cm² para produzir uma dose mínima eritematosa (1 MED),

dependendo de alguns fatores como cor da pele, por exemplo. Na pele de camundongo *hairless*, por exemplo, uma única dose de $1,5 \text{ J/cm}^2$ equivale a 1 MED [61]. Em regra geral, quanto menor for o comprimento de onda da radiação UV, maior é o efeito biológico.

A radiação UVB pode provocar algumas alterações inflamatórias, como inibir a função das células *natural killer* (NK), assim como bloquear processos de apoptose e lise celular por modificações na expressão do gene p53. Essas alterações estão diretamente correlacionadas com a carcinogênese, podendo-se dizer, portanto, que a radiação UVB é responsável pelo câncer na pele humana, como os carcinomas de células basais escamosas e os melanomas malignos [62,63].

E a pele está continuamente exposta a uma combinação de fatores, além das radiações UV, como agentes químicos, que induzem a formação excessiva de espécies reativas (figura 7) [64]. As primeiras evidências *in vitro* sugeriram que todo o espectro UV (UVA, UVB e UVC) seria capaz de gerar estresse oxidativo pelo aumento de espécies reativas, e resultar em danos no DNA [65,66]. Porém, a radiação UVB além de aumentar a formação de espécies oxidativas, atua alterando os níveis de enzimas antioxidantes intracelulares [67-69].

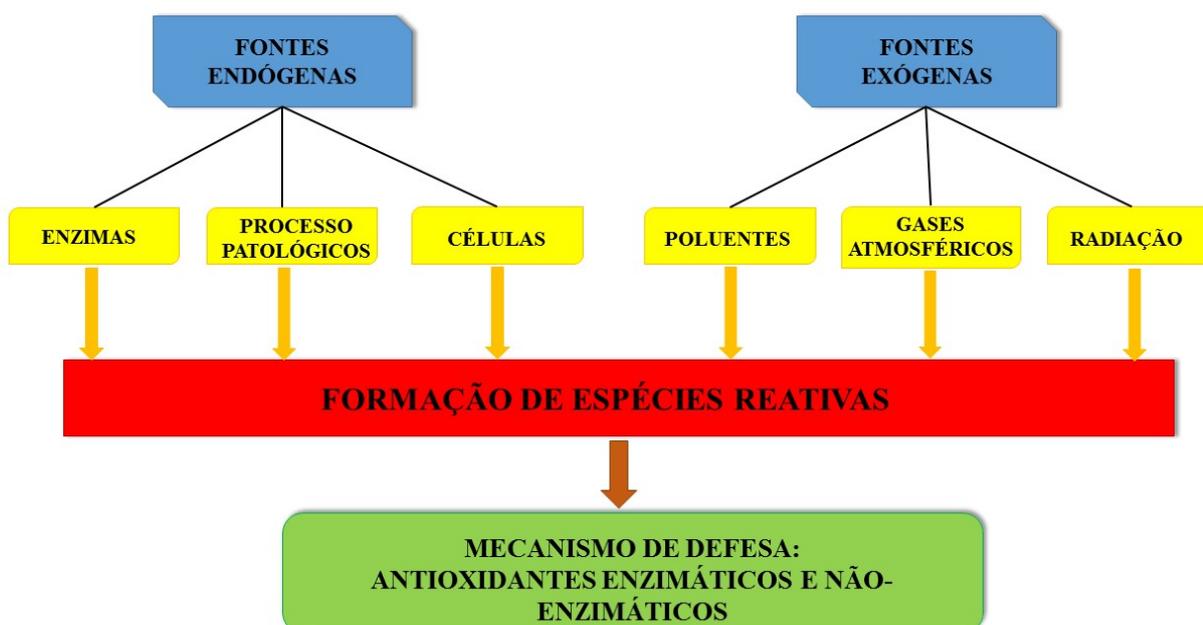


Figura 7. Fontes endógenas e exógenas de espécies reativas na pele, e mecanismos de defesa antioxidante (adaptado de Guaratini et al., 2007 [64]).

1.3.2 Câncer de Pele Não Melanoma

O carcinoma basocelular (CBC) é a neoplasia mais comum do mundo. Deriva das células tronco da camada basal da epiderme e dos folículos pilosos. Apresenta crescimento lento [70,71], e é localmente invasivo, com baixo potencial metastático, sendo facilmente tratável por excisão cirúrgica se diagnosticado precocemente [55].

A exposição à radiação UV é o fator mais representativo no aparecimento da doença, sendo que os indivíduos que sofreram exposição solar aguda até os 20 anos têm o risco aumentado em até três vezes de ser acometido por CBC [72]. Já a exposição solar crônica está mais associada ao aparecimento de carcinoma espinocelular (CEC) também conhecido como carcinoma de células escamosas (SCC). A proporção de ocorrência na população é de quatro a cinco CBC para cada um CEC. No entanto, o registo de CBC pelas entidades de saúde não é obrigatório, podendo ser a frequência ainda mais alta [71].

O CEC é a segunda neoplasia do tipo não melanoma mais comum no mundo, e é duas vezes mais comum em homens do que em mulheres, muito provavelmente devido à maior exposição solar por consequência de algumas profissões, descuido com o filtro solar, uso de cabelo mais curto e uso de roupas que não protegem muito a região do tronco e face [73,74].

Além de estar associado à exposição solar crônica, outros fatores, como exposição ao arsênio, infecções virais por HPV, tratamento com imunossupressores para transplantes de órgãos, inflamação crônica e úlceras, também contribuem para o aparecimento do CEC [74-76]. O CEC é localmente invasivo, com crescimento mais rápido e agressivo do que o CBC, com potencial para metástase e com taxa de mortalidade mais alta [70].

1.3.3 Câncer de Pele Melanoma

Os melanócitos são células dendríticas presentes na epiderme e cuja principal função é a síntese e transferência dos grânulos de melanina para os queratinócitos circunvizinhos [77]. A coloração da pele é definida por esses grânulos de melanina que podem ser compostos por eumelanina (pigmento marrom ou preto), feomelanina (pigmento amarelo ou vermelho) ou uma mistura de ambos [78].

Indivíduos expostos à radiação UV têm aumentado a quantidade de melanócitos, gerando mudanças proliferativas, e essas mudanças são classificadas de acordo com a agressividade em:

- 1 – nevo melanocítico benigno;
- 2 – nevo displásico;
- 3 – melanoma de crescimento radial;
- 4 – melanoma de crescimento vertical;
- 5 – melanoma metastático [77].

Tanto o nevo melanocítico benigno quanto o displásico são considerados marcadores para o melanoma, e sua presença aumenta o risco de desenvolvê-lo. O nevo displásico, inclusive, é considerado uma lesão precursora do melanoma [79-81].

O melanoma em si corresponde ao estágio final da carcinogênese melanocítica, na qual a instabilidade genética das células iniciadas leva a um aumento da sua capacidade proliferativa e de invasão [80]. Porém, assim como em qualquer sistema neoplásico, o melanoma pode eventualmente escapar de etapas durante o seu desenvolvimento, e aparecer mesmo na ausência de lesões intermediárias, surgindo até mesmo da transformação maligna de células precursoras [82].

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

1.4.1 Espécies Reativas e Estresse Oxidativo

A oxidação constitui-se como parte essencial da vida aeróbia e, assim, as espécies reativas são produzidas naturalmente pelo nosso organismo, envolvidas em diversos processos como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, fotossíntese e síntese de substâncias biológicas importantes. As espécies reativas dividem-se em dois grupos: as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN). As ERO distribuem-se em espécies radiculares, com elétrons desemparelhados centrados no átomo de oxigênio, como a hidroxila (HO^\bullet), o superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), a peroxila (ROO^\bullet) e a alcóxila (RO^\bullet), e não-radicalares, como o oxigênio (O_2), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HClO). Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico (NO^\bullet), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-). Algumas dessas espécies são altamente reativas no organismo, atacando apenas lipídios, outras atacam lipídios,

proteínas e o DNA [83, 84]. A figura 8, abaixo, exemplifica a formação de diferentes ERO na célula.

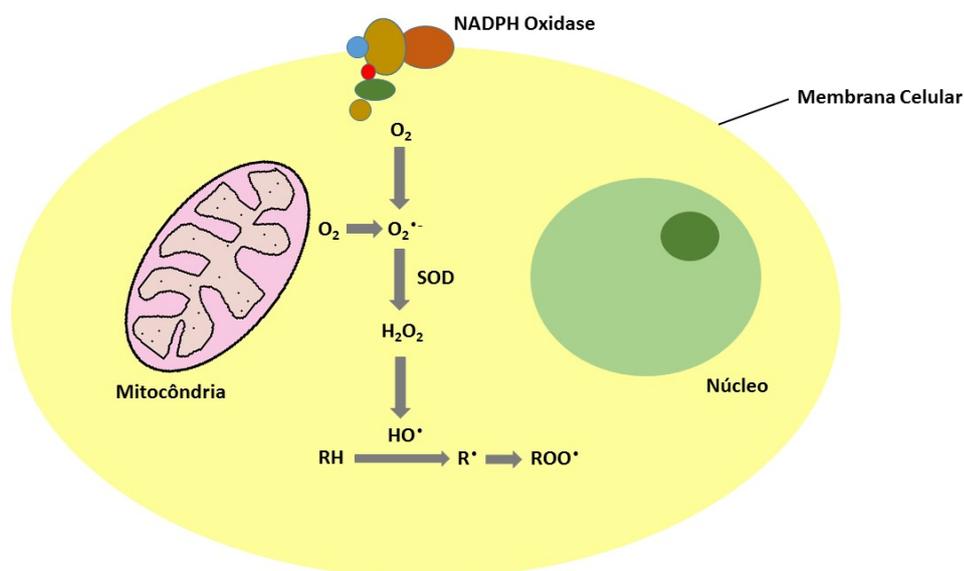
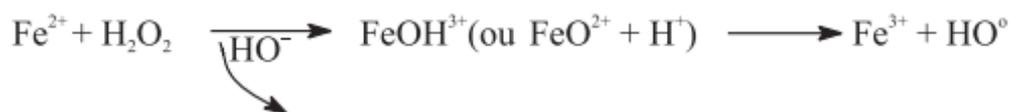


Figura 8. Modelo mostrando a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em dois sistemas na célula. O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é produzido pelo complexo enzimático NADPH oxidase (Dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato oxidase), presente nas membranas celulares, e pelas mitocôndrias durante a cadeia transportadora de elétrons. A dismutação do $O_2^{\bullet-}$ pela enzima superóxido dismutase (SOD) é acompanhada da formação de H_2O_2 e então pela formação do radical HO^{\bullet} . O HO^{\bullet} é altamente reativo, apresentando a capacidade de oxidar todos os tipos de biomoléculas, especialmente os lipídios, formando radicais ROO^{\bullet} capazes de gerar novas espécies reativas (adaptado de Pospíšil et al., 2014) [85].

O radical HO^{\bullet} é o mais deletério ao organismo, pois apresenta uma meia-vida curta, e dificilmente é sequestrado *in vivo*. Este radical frequentemente ataca as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações, e as formas de controlar a sua presença na célula são reparando os danos ou inibindo a sua formação [83]. O radical HO^{\bullet} pode ser formado por dois mecanismos principais:

- reação de Fenton, que se caracteriza pela reação do H_2O_2 com metais de transição como o Fe^{2+} e o Cu^+ , sendo que o Fe^{2+} apresenta maior relevância por sua maior biodisponibilidade [86,87]:



- homólise da água por exposição à radiação ionizante [87]:



O radical HO^\bullet causa danos aos lipídios, proteínas, membranas celulares (citoplasmática, nuclear e mitocondrial), RNA e DNA, sendo que no último ele ataca tanto as bases nitrogenadas quanto a desoxirribose. A interação com as bases nitrogenadas ocorre devido à eletrofilicidade do HO^\bullet com os sítios de alta densidade eletrônica das insaturações das mesmas. A interação com a desoxirribose ocorre pela abstração de um dos seus átomos de hidrogênio, e que leva à ruptura de fita simples ou dupla no DNA [49]. A inabilidade celular de reparar os danos que ocorrem nesse processo pode levar a célula à morte, ou provocar o aparecimento de mutações levando à carcinogênese ou ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas [88]. Nos aminoácidos e proteínas, esse radical reage com a cadeia lateral, atacando especialmente cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina. O ataque a esses aminoácidos gera danos, como quebra de ligações com a geração de fragmentos, que podem ter como resultado a perda de atividade enzimática, citólise e até a morte celular [89].

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical, porém consegue se difundir pelas membranas celulares com rapidez e tem a capacidade de gerar radicais HO^\bullet na presença de metais de transição. Na ausência dos metais de transição, é pouco reativo e somente oxida proteínas que apresentem resíduos de metionina ou grupos tiol muito reativos, como a glutathiona (GSH), por exemplo [90].

O H_2O_2 é originado *in vivo* pela dismutação do ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) durante a β -oxidação dos ácidos graxos ou pelas enzimas superóxido dismutase (SOD). Outras enzimas, como a glutathiona peroxidase (GSH-Px), também fazem a remoção do H_2O_2 das células, porém essa remoção é limitada, o que indica que praticamente todas as células de mamíferos são expostas a determinadas concentrações de H_2O_2 [90].

O radical óxido nítrico (NO^\bullet) é produzido nas células de alguns tecidos, pela ação da enzima óxido nítrico sintase a partir da arginina, oxigênio e NADPH, gerando também NADP^+ e citrulina. O radical NO^\bullet em si não é suficientemente reativo para atacar o DNA diretamente, mas pode reagir com o ânion radical $\text{O}_2^{\bullet-}$, gerando peroxinitritos (ONOO^-)

que podem sofrer reações secundárias gerando agentes capazes de nitrar aminoácidos aromáticos e bases nitrogenadas [91,92].

Muitas são as defesas antioxidantes nos organismos para lidar com as espécies reativas, e para que os danos causados pelas mesmas sejam mínimos. Quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e ERNs e a quantidade de antioxidantes atuando, com saldo em favor do primeiro, denomina-se estresse oxidativo [93, 94].

1.4.2 Defesas Antioxidantes

O estresse oxidativo é combatido por antioxidantes produzidos pelo organismo ou absorvidos da dieta. De acordo com Halliwell (2000) [95], *antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração, comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo*. Os antioxidantes endógenos, produzidos pelo próprio organismo, podem agir enzimaticamente, a exemplo da superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT), ou não enzimaticamente como o tripeptídeo glutathiona (GSH). Os antioxidantes exógenos, consumidos através da dieta, são representados, principalmente, pelo ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pró-vitamina A) e os compostos fenólicos [93].

1.4.2.1 Antioxidantes Endógenos

A SOD é um conjunto de metaloproteínas que exercem o maior papel no sistema antioxidante, catalisando a conversão do ânion radical $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 [96]. Nos mamíferos, é possível encontrar três isoformas da SOD: CuZn-SOD (SOD1), existente no citoplasma; Mn-SOD (SOD2), distribuída na matriz mitocondrial, e a SOD extracelular (SOD3), localizada nos fluidos extracelulares, como linfa, fluído sinovial, e plasma [97].

A GSH-Px apresenta papel significativo na prevenção de danos oxidativos na célula através da redução de hidroperóxidos [98]. Duas classes distintas desta enzima são conhecidas – a GSH-Px selênio dependente e a GSH-Px selênio independente, cada uma possuindo maior especificidade por um determinado substrato [99]. O primeiro tipo é capaz de reduzir o H_2O_2 e uma imensa variedade de hidroperóxidos orgânicos. O segundo tipo reduz qualquer hidroperóxido orgânico, com exceção do H_2O_2 [100].

A CAT é considerada o maior componente da defesa antioxidante primária, atuando na catálise da decomposição de H_2O_2 em água, dividindo esta função com a GSH-Px. A ação da CAT ocorre preferencialmente em altas concentrações de H_2O_2 , e estudos mostram que a atividade da CAT se encontra significativamente diminuída em tecidos tumorais em comparação com tecidos normais [101].

O tripeptídeo γ -L-glutamil-L-citeinil-glicina conhecido como glutathiona (GSH) é requerido em diversos processos celulares interconectados com a manutenção e regulação do *status* redox da célula, devido à sua capacidade de existir em diferentes formas redox [102]. Sob condições fisiológicas, a GSH reduzida é a forma encontrada em concentrações de 10 a 100 vezes maiores do que a sua forma oxidada (GSSG). A GSSG é predominantemente produzida pela ação catalítica da GSH-Px, assim como através de reações diretas da GSH com compostos eletrolíticos, como por exemplo os radicais livres [103]. E a proporção encontrada entre as formas reduzida e oxidada da GSH é um importante indicador do ambiente redox e, ao mesmo tempo, contribui para o entendimento de mecanismos moleculares como a proliferação e diferenciação celular [104].

1.4.2.2 Antioxidantes Exógenos

A vitamina C é uma vitamina hidrossolúvel, encontrada nos organismos na forma de ascorbato (figura 9). O ascorbato desempenha papéis metabólicos como agente redutor, reduzindo metais de transição (especialmente Fe^{3+} e Cu^{2+}) presentes nos sítios ativos das enzimas ou nas formas livres no organismo [105]. Por ser um bom agente redutor, o ascorbato pode ser oxidado pela maioria das espécies reativas radicalares, que chegam ou são formadas, nos compartimentos aquosos dos tecidos [83]. O ascorbato atua contra a peroxidação lipídica de duas maneiras:

- no plasma sanguíneo, doa hidrogênios para os lipídios circulantes, impedindo a sua peroxidação e posterior deposição na parede dos vasos;
- na membrana plasmática, em parceria com o α -tocoferol, também doando hidrogênios as fosfolipídios, impedindo sua peroxidação [106].

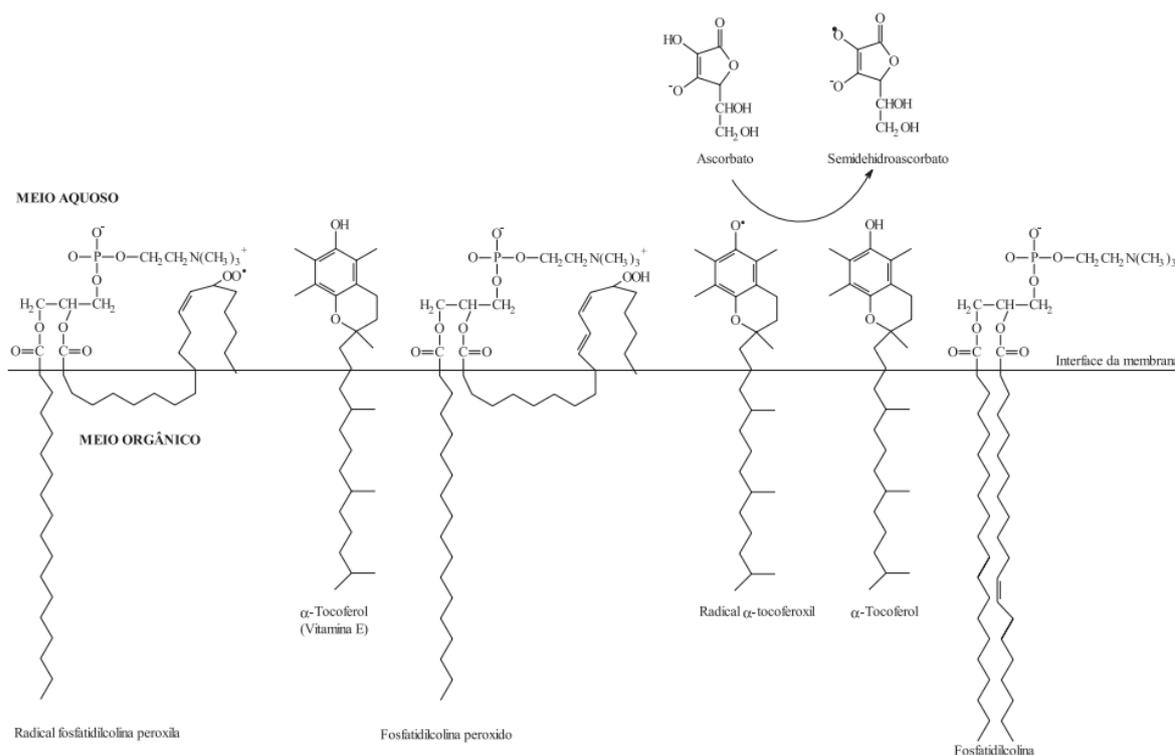


Figura 11. Proteção da peroxidação lipídica de membrana pelo α -tocoferol, e posterior regeneração do mesmo pelo ascorbato (adaptado de Barreiros et al., 2006 [83]).

Dentre os carotenoides, o β -caroteno é a mais importante fonte de vitamina A. Os carotenoides formam um tipo incomum de agentes redutores, pois funcionam em baixos níveis de oxigênio. A maior parte dos tecidos biológicos apresentam baixos níveis de oxigênio, o que faz com que os carotenoides sejam importantes antioxidantes. *In vivo*, esses antioxidantes sequestram os radicais ROO^{\bullet} , reduzindo a oxidação do DNA e dos lipídios [109].

Os polifenóis, e em particular os flavonoides, possuem estrutura ideal para o sequestro de espécies reativas, sendo antioxidantes mais efetivos que o ascorbato e o α -tocoferol. A atividade de sequestro dos flavonoides está diretamente ligada ao potencial de oxidação do mesmo e das espécies a serem sequestradas. Quanto menor for o seu potencial de oxidação, maior é sua atividade como sequestrador de espécies reativas, e esse potencial está diretamente relacionado ao número de hidroxilas dos flavonoides [110,111]. A lipofilicidade do flavonoide também influencia na sua atividade antioxidante, já que dessa atração resulta a sua interação com as membranas celulares. Os flavonoides que são assimilados pelas membranas exercem a função de moduladores de

fluidez, gerando um impedimento físico para a difusão de espécies reativas, impedindo o estresse oxidativo [112].

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO E CÂNCER DE PELE

O estresse oxidativo é importante do ponto de vista biomédico por estar relacionado com diversos tipos de doenças, como doenças neurodegenerativas (Mal de Alzheimer, Mal de Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica, etc.), doenças inflamatórias (Artrite Reumatoide), doenças cardiovasculares (distrofias musculares), alergias, disfunções do sistema imunológico, diabetes, envelhecimento e câncer. O excesso de ERO pode saturar os mecanismos de defesa celulares, e as moléculas intracelulares se tornam seriamente danificadas, afetando as células vizinhas [113].

A pele espontaneamente responde ao aumento dos níveis de ERO induzido por radiação UV ou agentes químicos e as mesmas podem promover diversos aspectos do desenvolvimento e progressão do câncer de pele, como: i) proliferação celular; ii) evasão da apoptose; iii) invasão de tecidos e metástases; e iv) angiogênese.

Proliferação celular descontrolada requer a regulação positiva de diversas vias de sinalização intracelular, incluindo cascatas envolvidas na sobrevivência, proliferação e progressão do ciclo celular. O efeito mais significativo das ERO nas vias de sinalização tem sido observado nas vias da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK/AP1) e do fator nuclear *kappa* B (NK- κ B) [114]. A indução de vias sensíveis às alterações *redox* durante a proliferação celular é necessária, já que a divisão celular exige muita energia e a produção de metabólitos da geração dessa energia deve ser tamponada para prevenir danos oxidativo e morte celular [115]. As ERO como o H_2O_2 e o ânion $O_2^{\cdot -}$ podem induzir mitose em diversos tipos celulares [116].

Uma das características-chave das células tumorais é a habilidade de sobrevivência quando comparadas às células normais. Nas células normais, as ERO podem induzir danos no DNA que iniciam o processo de tumorigênese e subsequente progressão do tumor. No entanto, nas células tumorais, as ERO podem mediar a ativação de vias de transdução de sinais que estão envolvidas com a transmissão de informação inter e intracelulares e que são críticas para dar suporte à sobrevivência [117]. Uma das enzimas envolvidas com esse suporte é a quinase serina-treonina Akt, que regula negativamente as defesas antioxidantes e promove sobrevivência tumoral [118].

As ERO estão envolvidas com o aumento da invasão tumoral e metástase pela elevação nas taxas de migração celular. Durante a transformação em carcinoma invasivo, as células epiteliais sofrem profundas alterações em sua morfologia e modo adesivo, resultando na perda da polarização normal, se transformando em uma célula altamente invasiva [117]. Um estudo prévio mostrou que altas taxas de H_2O_2 em carcinomas podem induzir a formação de metástases pulmonares [119], provavelmente por diminuir a ligação das células tumorais à lâmina basal. Por exemplo, o estresse oxidativo regula a expressão da proteína de adesão intracelular-1 (ICAM-1), uma proteína de superfície celular presente nas células epiteliais que regula a migração celular [120].

Tumores sólidos induzem uma resposta angiogênica para formar uma nova rede vascular para suprir as células tumorais com nutrientes e oxigênio [121]. As ERO têm sido apontadas como um dos fatores importantes de estímulo para a sinalização angiogênica. Um estudo mostrou que a administração de H_2O_2 ou drogas produtoras de estresse oxidativo, como a doxorrubicina, ativa a angiogênese *in vivo* [122].

As ERO estão relacionadas com o câncer de pele por corresponder a um dos efeitos mais significativos da exposição à radiação UV. O controle da formação das ERO pela radiação UV é de extrema importância para a prevenção dos efeitos deletérios da exposição solar, e automaticamente a prevenção do câncer de pele, e esse controle pode ser feito através do equilíbrio *redox* e do uso de fotoprotetores para a prevenção da formação das ERO [123].

1.6 FOTOPROTETORES

A utilização de fotoprotetores é a principal abordagem cosmética contra os efeitos nocivos da radiação UV. Vários estudos têm demonstrado que o uso contínuo de fotoprotetores reduz os casos de queratose actínica (AK), carcinomas e diminui o desenvolvimento de novos nevos, além de evitar o envelhecimento precoce da pele [124-127].

Fotoprotetores são preparações cosméticas que possuem diversas formas de apresentação. Podem ser encontrados na forma de loções hidro-alcoólicas, óleos, géis oleosos, emulsões óleo em água, emulsões água em óleo, bastões, aerossóis e outros. As loções hidro-alcoólicas em si apresentam reduzida proteção, pois o filme formado sobre a pele é irregular [128].

As formulações fotoprotetoras apresentam ação física ou química que atenua o efeito da radiação UV por mecanismos de absorção, dispersão ou reflexão da radiação. A qualidade de um fotoprotetor depende do seu FPS (Fator de Proteção Solar) à radiação UVB, da medida de proteção PPD (*Persistent Pigment Darkening*) ou UVA-PF (Fator de Proteção à radiação UVA), e das suas propriedades físico-químicas como: formação de película ideal sobre a pele, estabilidade, baixa hidrossolubilidade e hipoalergenicidade [129-131].

Muitos produtos cosméticos presentes no mercado apresentam antioxidantes incorporados visando combater os sinais de envelhecimento da pele. Diversos trabalhos investigam a ação destes antioxidantes na fotoproteção, analisando seus efeitos protetores frente aos danos moleculares gerados por estresse oxidativo induzido pela radiação UV [132,133].

Pesquisas de novas substâncias para utilização em protetores solares estão sendo extensivamente realizadas, e há um crescente interesse para o desenvolvimento de fotoprotetores baseados em produtos naturais com atividade antioxidante [134]. Dessa forma, a utilização da fração C como componente antioxidante de um fotoprotetor, associado a outras propriedades já documentadas para o látex (e.g. cicatrizante, regenerativa, angiogênica, etc.), se torna interessante.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a capacidade antioxidante da fração C do látex de *Hevea brasiliensis* em modelo experimental *in vitro* sem células, em meio *in vitro* com duas linhagens celulares e em modelo experimental *in vivo* de câncer de pele não melanoma induzido por radiação UVB.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho foram avaliar:

- a capacidade de diferentes concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis* de sequestrar espécies reativas (HO^\bullet , H_2O_2 e NO^\bullet) *in vitro* em meio sem células;
- a capacidade antioxidante total de diferentes concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis in vitro* em meio sem células através do método de redução do molibdênio;
- o efeito de diferentes concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis* sobre a viabilidade celular das linhagens CHO-k1 e B16F10 através do teste do MTT;
- a genotoxicidade de diferentes concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis* nas linhagens CHO-k1 e B16F10 através do Ensaio do Cometa;
- a indução de apoptose e necrose de diferentes concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis* sobre as linhagens CHO-k1 e B16F10, através da técnica de detecção morfológica de células apoptóticas e necróticas por dupla coloração com Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio;
- os parâmetros de estresse oxidativo, através da dosagem de glutatona (GSH) e malonaldeído (MDA), nas linhagens CHO-k1 e B16F10 tratadas com diferentes concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis*;
- a capacidade antioxidante de diferentes concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis* nos eritrócitos de camundongos *hairless* (SKH-1) após irradiação crônica com radiação UVB, através da avaliação da atividade da catalase (CAT) e dosagem de GSH;
- a capacidade antioxidante de diferentes concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis* na pele de camundongos SKH-1 após irradiação crônica com radiação

UVB, através das dosagens de MDA e GSH, através da avaliação da capacidade antioxidante total da pele (TRAP) e da atividade da CAT;

- histopatologicamente a pele de camundongos SKH-1 após tratamento com diferentes concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis* e irradiação crônica com radiação UVB.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA DO LÁTEX E OBTENÇÃO DA FRAÇÃO C

O látex foi coletado de diferentes seringueiras (*Hevea brasiliensis*) clones RRIM 600, na Fazenda Indiana localizada na região de Presidente Prudente-SP, em 25 de junho de 2013. A sangria das árvores foi realizada com uma faca em forma de U, em cortes sucessivos a partir de uma altura de 1,20m do solo.

O látex foi então levado ao laboratório, dividido em microtubos de 2,0 ml, tipo *Eppendorf*, e centrifugado a 17968g por 30 minutos em uma centrífuga da marca Fanem, tipo Microhemato, modelo 2410. A essa velocidade, o látex se separa em três partes diferentes²² (figura 3). Utilizando uma seringa, a fração aquosa intermediária, correspondente à fração C do látex, foi removida e separada em tubos de 15 ml, tipo *Falcon*. Esses tubos foram levados ao freezer a -4°C, para que as partículas de borracha remanescentes precipitassem e pudessem ser removidas posteriormente.

3.2 PREPARO DA FRAÇÃO C PARA OS TESTES *IN VITRO*

A fração C reservada nos tubos tipo *Falcon* foi filtrada sucessivamente em filtros com poros de 14 µm (Qualy, Brasil) e posteriormente em filtros com poros de 7 µm (Quanty, Brasil). A mesma foi então pesada e diluída em PBS (*Phosphate Buffer Saline*) até chegar a uma concentração de 200 µg/ml, que foi considerada a solução-mãe. Essa solução teve seu pH corrigido para 7,4, e a partir dela foram preparadas outras 9 concentrações:

- 0,02 µg/ml;
- 0,2 µg/ml;
- 1 µg/ml;
- 2 µg/ml;
- 5 µg/ml
- 10 µg/ml
- 20 µg/ml;
- 50 µg/ml; e
- 100 µg/ml.

Todas as soluções foram então filtradas para descontaminação, em fluxo laminar, em filtros com poros de 0,22 μm (Kasvi, Brasil), e estocadas em geladeira para uso posterior.

3.3 PREPARO DOS CREMES DE FRAÇÃO C PARA OS TESTES *IN VIVO*

Para a preparação dos cremes para os testes *in vivo*, foi preparado um veículo não iônico, conforme descrito por Takahashi e colaboradores (1999) [135]. Esse veículo foi preparado no Laboratório de Farmacotécnica da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), com a seguinte composição:

- Álcool cetearílico;
- Polysorbato 60;
- Estearato de Octila;
- Dispersão coloidal ácido graxo/ésteres;
- Metilparabeno;
- Propilparabeno;
- EDTA dissódico;
- Propilenoglicol;
- Aminopropanol Ultra;
- Isotiazolinona;
- Ciclopentoxalano;
- Água destilada.

Após a preparação do veículo, foi adicionada a fração C do látex até chegar à concentração final de 1%, 2% e 10%. Os cremes foram reservados em recipientes próprios para pomadas, em geladeira (4 °C), até o uso.

3.4 TESTES *IN VITRO* EM MEIO SEM CÉLULAS

3.4.1 Atividade de sequestro de radicais hidroxil (HO^\bullet)

A atividade sequestradora de radicais HO^\bullet da fração C do látex foi medida de acordo com Smirnoff e Cumbes (1989) [136], com modificações conforme Liu e colaboradores (2010) [137]. Os radicais HO^\bullet foram gerados a partir de FeSO_4 e H_2O_2 , e detectado a partir de sua habilidade de hidroxilar o salicilato.

A mistura de 2 ml continha 0,5 ml de FeSO_4 (1,5 mM), 0,35 ml de H_2O_2 (6 mM), 0,15 ml de salicilato de sódio (20 mM), e 1 ml das diferentes concentrações da fração C do látex (0,02; 0,2; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Ácido L-ascórbico (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Vitamina C, foi utilizado como controle positivo e para comparação com as diferentes concentrações da fração C.

Após incubação de 1 hora a 37 °C, a absorbância do salicilato hidroxilado foi medida espectrofotometricamente a 562 nm. A porcentagem de radicais sequestrados foi calculada assim:

$$\%HO\cdot\text{sequestrado} = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0} \right] \times 100,$$

onde A_1 é a absorbância da amostra de fração C ou do ácido ascórbico, A_0 é absorbância do controle, e A_2 é a absorbância do branco sem o salicilato de sódio.

3.4.2 Atividade de sequestro de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A capacidade de sequestro de H_2O_2 foi medida de acordo com Liu e colaboradores (2010) [137].

A mistura para as reações continha 1ml de H_2O_2 (0,1 mM) preparado na hora, 1 ml das diferentes concentrações da fração C do látex (0,02; 0,2; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 0,1 ml de molibdato de amônio (3%), 10 ml de H_2SO_4 2M, e 7 ml de KI 1,8 M. Ácido L-ascórbico (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Vitamina C, foi utilizado como controle positivo e para comparação com as diferentes concentrações da fração C.

A mistura foi titulada contra 5 mM de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ até a cor desaparecer. A atividade de sequestro foi calculada assim:

$$\%\text{H}_2\text{O}_2\text{sequestrado} = \frac{(V_0 - V_1)}{V_0} \times 100,$$

onde V_0 é o volume da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ usada para titular a mistura controle e V_1 é o volume da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ usada para titular a mistura com as amostras e ácido ascórbico.

3.4.3 Atividade de sequestro do radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$)

O $\text{NO}\cdot$ gerado a partir do nitroprussiato de sódio foi medido através do reagente Griess, pelo método de Marcocci e colaboradores (1994) [138].

A mistura com volume final de 3 ml, contendo as concentrações da fração C de látex (0,02; 0,2; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100 e 200 µg/ml) e nitroprussiato de sódio (5mM) em PBS, foi incubada a 25 °C por 150 min. Após a incubação, amostras (0,5 ml) foram removidas e diluídas com 0,5 ml de reagente de Griess (1% sulfanilamida, 2% ácido *o*-fosfórico e 0,1% naftil-etilenodiamina). A absorbância do cromóforo formado foi medida a 546 nm, e a inibição da formação de NO• foi estimada pela comparação entre os valores de absorbância da amostra com a fração C e do controle sem a fração C. Ácido L-ascórbico (1000 µg/ml), Vitamina C, foi utilizado como controle positivo e para comparação com as diferentes concentrações da fração C.

A atividade de sequestro foi calculada assim:

$$\%NO\text{'sequestrado} = \left[1 - \frac{A_1}{A_2}\right] \times 100,$$

onde A_0 é a absorbância do controle, e A_1 a absorbância da amostra contendo a fração C do látex ou ácido ascórbico.

3.4.4 Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total foi determinada de acordo com Pietro e colaboradores (1999) [139].

As concentrações da fração C do látex (0,02; 0,2; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100 e 200 µg/ml) foram adicionada em um tubo tipo *Eppendorf* e misturadas a 1 ml de uma solução reagente contendo 0,6 M de H₂SO₄, 28 mM de NaH₂PO₄, e 0,4 mM de molibdato de amônio. Os tubos foram encapados com papel alumínio e incubados a 95 °C por 90 min. A absorbância foi medida a 695 nm após as amostras esfriarem a temperatura ambiente. Ácido L-ascórbico (1000 µg/ml), Vitamina C, foi utilizado como controle positivo e para comparação com as diferentes concentrações da fração C.

A capacidade antioxidante total foi calculada assim:

$$\text{Capacidade antioxidante total (\%)} = \left[1 - \frac{A_1}{A_2}\right] \times 100,$$

onde A_1 é a absorbância da amostra ou do ácido ascórbico, e A_0 a absorbância do controle.

3.5 TESTES *IN VITRO* EM MEIO COM CÉLULAS

3.5.1 Linhagens celulares CHO-k1 e B16F10 e Condições de Cultura

As células de epitélio de ovário de hamster chinês (CHO-k1), gentilmente cedidas pela Dr.^a Dalita G. S. M. Cavalcante, foram crescidas em meio de cultura HAM-F10:DMEM (1:1), suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de mistura de penicilina/estreptomicina, todos produtos da Sigma-Aldrich, Brasil.

As células de melanoma murino (B16F10), gentilmente cedidas pela Prof.^a Dr.^a Alessandra Lourenço Cecchini da Universidade Estadual de Londrina, foram crescidas em meio DMEM *high-glucose* (Gibco[®] Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de mistura de penicilina/estreptomicina, ambos Sigma-Aldrich, Brasil.

Ambas linhagens foram mantidas em uma incubadora com atmosfera umedecida de 5% de CO₂ a 37 °C. Todos os experimentos foram realizados cultivando 10⁵ células em placas de 24 poços por 24 horas, com exceção do teste de viabilidade celular, onde as células foram cultivadas em placas de 96 poços, quando as células apresentavam 80% de confluência, no mínimo.

3.5.2 Doxorubicina

O cloridrato de doxorubicina (DXR), também conhecido como adriamicina, é um antibiótico antineoplásico do grupo das antraciclina, isolado a partir de culturas fúngicas de *Streptomyces peucetis var. caesius*, relatado como de uso recorrente em oncologia humana. Clinicamente, a DXR tem atividade significativa contra considerável número de tumores, incluindo alguns que são refratários a outros fármacos [140]. Estudos têm comprovado que o estresse oxidativo e a produção de radicais livres estão envolvidos no modo de ação da DXR, especialmente em termos da ação antitumoral [141,142].

No presente estudo, a DXR (Doxorubicin hydrochloride, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil, CAS 25316-40-9) foi dissolvida em água destilada até atingir uma concentração final de 0,75 µg/ml e foi protegida da luz.

3.5.3 Teste de Viabilidade Celular

A viabilidade das células CHO-k1 e B16F10, tratadas com as dez concentrações de fração C do látex (0,02; 0,2; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100 e 200 µg/ml), foi avaliada por meio da análise colorimétrica do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio ou MTT (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), por meio do protocolo proposto por Mosmann (1983) [143], em placa de 96 poços. Células tratadas com PBS foram consideradas como controle negativo. Foram realizadas 8 repetições em triplicata para cada tratamento.

Após o período de exposição (24h) das células aos diferentes tratamentos, o meio foi aspirado e as células incubadas por 3 horas em 200 µl de solução de MTT. Em seguida, a solução de MTT foi aspirada cuidadosamente e o formazan precipitado foi ressuspenso em 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO).

A viabilidade celular (VC) foi avaliada por espectrofotometria, no Leitor Universal de ELISA (Readwell Touch, Robonik, Índia), no comprimento de onda de 492 nm, no laboratório de Imunologia Clínica da Universidade do Oeste Paulista. As células tratadas com PBS (controle negativo) foram consideradas como apresentando 100% de VC.

A VC das células tratadas foi determinada pela seguinte fórmula:

$$VC = \left[\frac{Abs_T - Abs_{Br}}{Abs_{CT} - Abs_{Br}} \right] \times 100,$$

onde Abs_T é a absorvância das células tratadas com as diferentes concentrações da fração C de látex, Abs_{Br} é a absorvância encontrada para o branco (poços contendo apenas meio de cultura) e Abs_{CT} é a absorvância encontrada para o controle negativo.

A partir do teste de VC nas células CHO-k1, juntamente com os testes antioxidantes *in vitro* em meio sem células, foram escolhidas três concentrações com alta capacidade de sequestro de radicais livres e com alta VC para serem trabalhadas nos outros testes (5, 50 e 100 µg/ml).

3.5.4 Ensaio do Cometa

O Ensaio do Cometa foi realizado em condições alcalinas, conforme proposto por Singh e colaboradores (1988) [144], com algumas modificações, conforme descrito por Speit e Hartmann (1999) [145]. Lâminas de vidro foram previamente preparadas, onde a

agarose de ponto de fusão normal (*normal melting point* ou NMP) foi aplicada sobre as lâminas e as mesmas permaneceram horizontais, em temperatura ambiente, por 24h para secagem.

As linhagens celulares CHO-k1 e B16F10 foram expostas a três concentrações da fração C do látex (5, 50 e 100 µg/ml) por 24 h, em placa de 24 poços. A DXR (0,75 µg/ml) foi utilizada como controle positivo e o PBS foi utilizado como controle negativo. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

Após o tempo de tratamento, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e 20 µl de cada amostra foi misturada a 150 µl de agarose de baixo ponto de fusão (*low melting point* ou LMP) e a suspensão celular obtida foi transferida para duas lâminas que continham agarose NMP. Uma lamínula foi adicionada e as lâminas foram levadas à geladeira (4 °C) para solidificar por 30 minutos. A lamínula foi então cuidadosamente retirada e a lâmina foi mergulhada em uma solução lisadora alcalina (pH 10), recém preparada, contendo NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, 10% DMSO, 1 ml Triton X-100, por 1 hora a 4 °C e protegidas da luz. Ao final do período de lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese contendo um tampão altamente alcalino (pH 13) que continha NaOH 300 mM e EDTA 1 mM) e foram incubadas a 4 °C por 20 minutos, para permitir o desnovelamento do DNA. Após esse período, uma corrente de 25 V e 300 mA foi aplicada por 20 minutos na cuba e logo após as lâminas foram submergidas em um tampão neutralizador (Tris 0,4 M, pH 7,5) por 15 minutos, e deixadas para secar à temperatura ambiente. As lâminas foram estocadas a 4 °C em geladeira para posterior análise.

Para análise das lâminas foi aplicado 50 µl do corante GelRed (33%) e os nucleoides foram imediatamente evidenciados usando um microscópio de fluorescência Olympus IX51 em 400 x (filtro de excitação 420-490 nm; filtro de emissão 520 nm). Foram analisadas 100 nucleoides por lâmina, sendo 300 células por tratamento.

Em cada lâmina, as células foram visualizadas e classificadas de acordo com 4 classes, de acordo com o tamanho da calda conforme o seguinte: classe 0, quando não há calda; classe 1, quando há uma pequena calda com o comprimento menor do que o diâmetro do nucleoide; classe 2, quando a calda é até 2 vezes maior do que o diâmetro do nucleoide; e classe 3, quando a calda é mais do que 2 vezes maior do que o diâmetro do nucleoide (figura 12).

O *score* dos 300 nucleoides analisados por tratamento, foi obtido de acordo com a fórmula de Manoharan e Banerjee (1985) [146], com modificações, conforme a seguir:

$$Score = (1xn_1 + 2xn_2 + 3xn_3),$$

onde n = número de células analisado em cada classe.

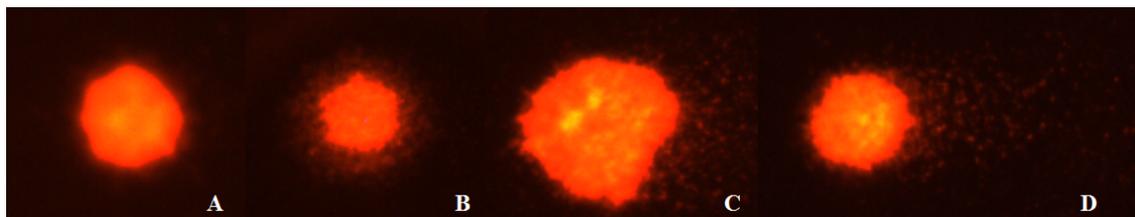


Figura 12. Classificação dos nucleoides de células B16F10 no ensaio do cometa após coloração com GelRed. A: classe zero, B: classe 1; C: classe 2; D: classe 3.

3.5.5 Detecção morfológica de células apoptóticas e necróticas

A detecção morfológica das células apoptóticas e necróticas foi realizado de acordo com o descrito por Carminati (2005) [147], com algumas modificações. As linhagens celulares CHO-k1 e B16F10 foram expostas a três concentrações da fração C do látex (5, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$) por 24 h, em placa de 24 poços. A DXR (0,75 $\mu\text{g/ml}$) foi utilizada como controle positivo e o PBS foi utilizado como controle negativo.

Para a visualização de células apoptóticas e necróticas, dois corantes fluorescentes foram empregados: o Hoechst 33342 (bisBenzimide H33342 trihydrochloride, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e o Iodeto de Propídeo (PI) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). O corante Hoechst 33342 é utilizado para corar DNA em células viáveis e o PI somente pode penetrar células com membrana celular danificada, sendo útil então para a identificação da integridade da membrana celular.

Após o tempo de tratamento, as células foram tripsinizadas e centrifugadas, e ressuspendidas em meio de cultura. Aliquotas de 100 μl da solução contendo as células foram simultaneamente incubadas com 50 μl de PI (1000 $\mu\text{g/ml}$), 25 μl de Hoechst 33342 (1000 $\mu\text{g/ml}$) e 25 μl de PBS a 37 °C por 5 minutos. 50 μl da solução total foi depositada sobre uma lâmina e a mesma coberta com lamínula, e analisada em microscópio de fluorescência Olympus IX51 em 400 x com filtro DAPI. Foram analisadas 500 células por lâmina, totalizando 1500 células por tratamento, sendo discriminadas as células apoptóticas, necróticas e normais de acordo com o seguinte critério:

- Células apoptóticas: núcleo azul com corpos apoptóticos;
- Células necróticas: núcleo vermelho íntegro ou em vesículas;

- Células normais: núcleo íntegro, corado em azul (Figura 13).

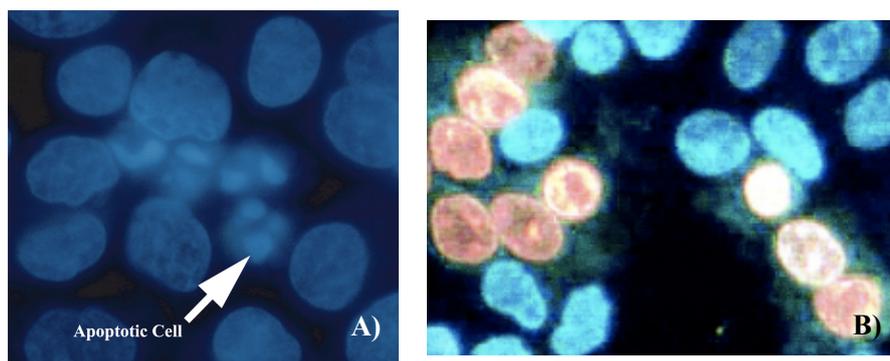


Figura 13. Classificação morfológica: (A) células apoptóticas, (B) necróticas (em vermelho) e normais (em azul), de acordo com a coloração fluorescente com Hoescht 33342 e Iodeto de Propídio.

3.5.6 Parâmetros de Estresse Oxidativo

Para a determinação dos parâmetros de estresse oxidativo, as linhagens celulares CHO-k1 e B16F10 foram expostas a três concentrações da fração C do látex (5, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$) por 24 h, em placa de 24 poços. A DXR (0,75 $\mu\text{g/ml}$) foi utilizada como controle positivo e o PBS foi utilizado como controle negativo. Esses parâmetros foram analisados no Laboratório de Patologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, sob orientação da prof.^a Dr.^a Alessandra Lourenço Cecchini.

A quantificação de tiol total foi determinada utilizando 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico, DTNB), conforme descrito por Hu (1994) [148]. A quantificação de grupos tiol total foi calculada usando uma curva de calibração preparada com GSH (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), e os resultados foram expressos em tiol $\mu\text{M/g}$ de proteína.

Aldeídos sempre são produzidos em processos de peroxidação lipídica, sendo o malonaldeído (MDA) o mais abundante. O conteúdo de MDA foi determinado por cromatografia líquida de alta performance em um sistema HPLC LC-20AT[®] (Shimadzu, Kyoto, Japan), conforme descrito por Victorino e colaboradores (2013) [149]. As suspensões celulares foram incubadas com ácido perclórico e então com 0,5 M de ácido tiobarbitúrico a 100 °C por 30 minutos. A reação foi então resfriada e centrifugada a 5000

g a 4 °C. As leituras foram tiradas a 535 nm durante 11 minutos, em uma taxa de vazão de 0,8 ml/min a 35 °C, e os resultados foram expressos em MDA nM/g de proteína.

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951) [150], modificado por Miller (1959) [151]. Albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

3.6 TESTES *IN VIVO*

Todos os testes *in vivo* foram realizados no Departamento de Patologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Alessandra Lourenço Cecchini. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Estadual de Londrina sob o no 6738.2015.40 (em anexo).

3.6.1 Animais, irradiação UVB e tratamento com o creme de fração C

Camundongos *hairless* SKH-1 machos, pesando entre 20-25 g, tiveram acesso à comida e água *ad libitum*. Todos foram tratados de acordo com as orientações do Instituto Nacional de Saúde.

A câmara de irradiação foi ajustada com uma lâmpada UVB fluorescente PHILIPS TL/12 40 W, com uma faixa de emissão entre 270 a 400 nm, com picos máximos de 313 nm. A emissão UVB foi medida usando um Radiômetro modelo IL-1700 (International Light, USA) com um sensor para UV (SED005) e UVB (SED240), que detectou que a radiação UVB constituía 73% do total de radiação emitida nas condições experimentais. A taxa de emissão da radiação UVB foi de $0,47 \times 10^{-4}$ mW/cm² e os animais foram expostos a uma dose diária de radiação UVB de 0,228 mJ/cm² (dose cumulativa = 17,1 J/cm²). A câmara de irradiação utilizada apresenta como medidas 1,30m X 0,43 m X 0,45 m, e o local para se colocar a caixa com os animais para irradiação situa-se 15 cm abaixo da lâmpada.

Os animais foram tratados topicamente no dorso com ~50 mg dos cremes e irradiados durante 16 minutos, 5 dias na semana, por 15 semanas, conforme descrito por Burns e colaboradores (2012) [152], com modificações (figura 14). Os grupos de animais, contendo 8 camundongos cada, foram divididos em:

- Grupo controle não irradiado: os animais desse grupo não receberam irradiação e nem tratamento com o creme;

- Grupo controle irradiado: os animais receberam apenas irradiação, mas não foram tratados com o creme de fração C;
- Grupo irradiado com creme sem fração C: os animais receberam irradiação e foram tratados apenas com o veículo, sem a fração C do látex;
- Grupo irradiado com creme com fração C a 1%: os animais receberam irradiação e foram tratados com o creme contendo 1% de fração C;
- Grupo irradiado com creme com fração C a 2%: os animais receberam irradiação e foram tratados com o creme contendo 2% de fração C;
- Grupo irradiado com creme com fração C a 10%: os animais receberam irradiação e foram tratados com o creme contendo 10% de fração C.

Após a irradiação, o creme era completamente removido do dorso do animal.

Após os tratamentos, 1,5 ml de sangue total foi colhido por punção cardíaca, e 1 cm² de pele da região dorsal foi removido. 0,5 cm² da pele removida foi congelado em freezer -80 °C e o outro 0,5 cm² foi fixado em formalina tamponada 5% para posterior inclusão em parafina. Todos os parâmetros analisados foram medidos em triplicatas.



Figura 14. Camundongo SKH-1 após 15 semanas de irradiação por radiação UVB. A seta aponta as lesões encontradas no dorso do animal, provocadas pela irradiação crônica.

3.6.2 *Análise antioxidante de eritrócitos*

Os eritrócitos foram obtidos de sangue heparinizado e lavados três vezes com solução salina 0,9% a 4 °C.

A atividade da CAT foi medida conforme descrito por Aebi (1984) [153], com modificações conforme descrito por Panis e colaboradores (2012) [154]. Os eritrócitos foram diluídos a 1:80 de água destilada, e incubados em um sistema contendo 1 M de Tampão TRIS e 200 mM de solução de H₂O₂. A cinética de absorbância foi monitorada em 240 nm, em um espectrofotômetro UV-Vis modelo UV-1650 PC[®] (Shimadzu, Kyoto, Japan). Os resultados estão expressos em valores de absorbância por minuto por mililitro de amostra (Abs.min⁻¹.ml⁻¹).

Os níveis de GSH foram determinados de acordo com o descrito por Tietze (1969) [155], onde 30 µl de eritrócitos diluídos em uma proporção de 1:100 em água deionizada, e incubados com 60 µM de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico, DTNB) em 1 M de tampão TRIS foram medidos a 412 nm, e os resultados foram expressos em µg de GSH.

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951) [150], modificado por Miller (1959) [151]. Albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

3.6.3 *Análise antioxidante da pele*

3.6.3.1 Preparação do tecido

Os homogenatos da pele da região dorsal foram preparados conforme o descrito por Peres e colaboradores (2011) [156]. As peles foram homogeneizadas em um homogeneizador Ultraturrax, contendo 10 mg de tecido/ml ou 50 mg de tecido/ml em 30 mM de tampão KH₂PO₄/K₂HPO₄ e 120 mM de KCl em pH 7,4. O sobrenadante da concentração de 10 mg de tecido/ml foi utilizado para determinar a capacidade antioxidante total (TRAP). O sobrenadante da concentração de 50 mg de tecido/ml foi utilizado para determinar a atividade da catalase, os níveis de GSH e a peroxidação lipídica.

3.6.3.2 Medida da capacidade antioxidante total (TRAP)

A capacidade antioxidante total do homogenato de pele foi medido por quimioluminescência, conforme descrito por Repetto e colaboradores (1996) [157], em

uma reação contendo 20 μM de 2-azobis-(2-amidinopropano) (ABAP) e 200 μM de luminol, um sistema gerador de radicais alcóxil. Após a emissão máxima ter sido alcançada, 70 μl de trolox foi adicionado ao meio de reação. Depois, o trolox foi substituído por 100 μl do sobrenadante de tecido. O tempo que a amostra segurou a emissão dos fótons (*peak hindering time*) é comparado com o padrão trolox. Os resultados foram expressos em μM de Trolox.

3.6.3.3 Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da catalase foi determinada de acordo com Cohen e colaboradores (1970) [156], modificado por Aebi (1984) [153]. A absorvância do H_2O_2 , em 1M de tampão HCl-TRIS, pH 8,0, foi monitorada em 240 nm. Aliquotas do sobrenadante de pele (50 mg de tecido/ml) foi adicionado ao meio e a diminuição da absorvância foi monitorada por 5 minutos. Os resultados foram expressos como ABS/mg proteína/min. A decomposição do H_2O_2 está diretamente relacionada com a diminuição da absorvância.

3.6.3.4 Avaliação dos níveis de GSH

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) foram determinados pelo 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico, DTNB) evidenciados pela formação de uma coloração amarelada, de acordo com método descrito por Tietze (1969) [155]. Os resultados foram expressos em μM GSH/mg de proteína total.

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951) [150], modificado por Miller (1959) [151]. Albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

3.6.3.5 Avaliação da Peroxidação Lipídica

O malondialdeído (MDA) formado durante a peroxidação lipídica faz parte dos compostos reativos com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), gerando um composto colorido, o aducto $(\text{TBA})_2\text{-MDA}$. Após a extração desse aducto com *n*-butanol, o mesmo absorve luz no comprimento de onda de 532 nm. Os níveis de TBARS foram medidos de acordo com o descrito por Oliveira e Cecchini (2002) [159], expressos em nM/50 mg de tecido.

3.6.4 Análise histopatológica

As lesões induzidas por radiação UVB crônica de cada animal foram removidas para análise histológica. O mesmo procedimento foi realizado para os animais não irradiados. Após removidas, as lesões foram fixadas em formalina tamponada 10%, armazenadas em etanol 70% e embebidas em parafina para posterior seccionamento. Foram feitos cortes de 5 μm e os mesmos foram corados com hematoxilina e eosina (H&E).

A avaliação histopatológica de cada lâmina foi baseada no diagnóstico de queratose actínica (AK), e carcinoma de células escamosas (SCC) que é caracterizado por invasão dérmica [160-163], considerando o aparecimento destes dois eventos na mesma lâmina. As áreas de AK foram determinadas pelo *software* ImageJ (imagej.net) [164].

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism[®] 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA), obtido através de licença pela Universidade Estadual de Londrina. Todos os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão.

As médias obtidas no teste do MTT foram calculadas e avaliadas estatisticamente utilizando *One-Way* ANOVA seguida do teste de Dunnet, sob significância de 95%. Para todos os outros testes, as médias obtidas foram avaliadas estatisticamente utilizando *One-Way* ANOVA seguida do teste de Tukey para múltiplas comparações, sob significância de 95%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TESTES *IN VITRO* EM MEIO SEM CÉLULAS

A atividade antioxidante de alguns compostos em sistemas biológicos pode ser explicada através de vários mecanismos, incluindo atividade de sequestro de espécies reativas, ligação com íons de metais de transição que podem agir como agentes catalíticos, decomposição ou redução de peróxidos, abstração de hidrogênio e indução de enzimas oxidativas. No entanto, poucas pesquisas foram feitas tentando elucidar a capacidade antioxidante do látex de *Hevea brasiliensis* [165-168]. Menos pesquisas ainda foram feitas estudando a atividade antioxidante da fração C obtida do látex desta espécie. Soysuwan (2009) [169] encontrou que a fração C do látex de *H. brasiliensis* é rico em compostos contendo tiol e aminoácidos, e que esta fração possui atividade antioxidante testada pelo método de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Annuaikit e Boonme (2014) [170] também avaliaram a fração C do látex de *H. brasiliensis* pelo método de redução do DPPH e encontraram atividade antioxidante para a mesma. Siritwong e colaboradores (2015) [171] detectaram a presença de conteúdos fenólicos na fração não-borracha do látex de *H. brasiliensis* e observaram uma evidente capacidade antioxidante desta fração através dos ensaios FRAP e de redução do radical DPPH.

Em parte deste estudo objetivou-se analisar a atividade antioxidante da fração C do látex de *H. brasiliensis*, e observando-se os resultados, é possível verificar que diferentes concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis* mostraram atividade antioxidante *in vitro*, de sequestrador de radicais HO[•] (figura 14), de sequestrador de H₂O₂ (figura 15), e de sequestrador de NO[•] (figura 16). Também é possível inferir que em muitas dessas concentrações, a capacidade deste sequestro alcançou níveis significativamente similares à capacidade de sequestro encontrada para a vitamina C (1000 µg/ml), um poderoso antioxidante não enzimático, frequentemente estudado.

Substâncias que possuem atividade antioxidante são extremamente importantes, pois ajudam a prevenir ou remover danos oxidativos causados por espécies reativas, que podem causar injúria celular [172]. Entre as espécies reativas, o radical HO[•] é o mais deletério ao organismo, causando danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo mitocondrial [83].

Como mostra a Figura 15, a capacidade de diferentes concentrações da fração C do látex de sequestrar o radical HO[•] foi comparado com o ácido ascórbico (vitamina C). Todas as diferentes concentrações da fração C foram capazes de sequestrar HO[•]. O ácido ascórbico exibiu 100% de atividade de sequestro do HO[•], aproximadamente. A máxima atividade de sequestro do HO[•] aconteceu na concentração de 200 µg/ml, e correspondeu a 84,17% da atividade de sequestro do ácido ascórbico.

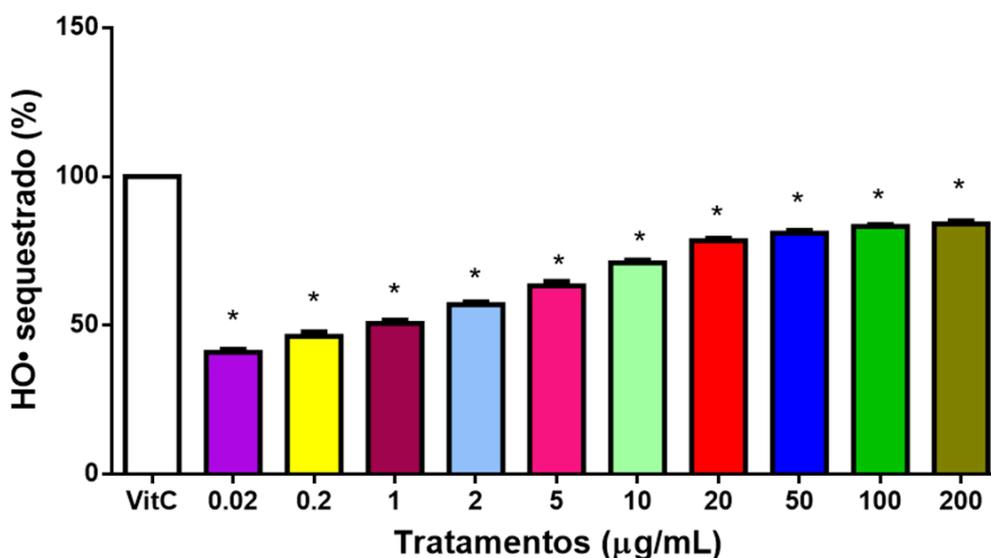


Figura 15. Capacidade de sequestro do radical hidroxil (HO[•]) por diferentes concentrações da fração C do látex. Os valores de absorvância foram convertidos em efeito de sequestro (%) e os dados plotados como os valores das médias das triplicatas dos efeitos de sequestro (%) ± o desvio padrão. *Estatisticamente diferente do controle positivo ($p < 0,05$).

O H₂O₂, por sua vez, é pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição, porém durante o estresse oxidativo é capaz de transpor as membranas celulares facilmente e gerar o radical HO[•] [83].

Como mostra a Figura 16, a capacidade de diferentes concentrações da fração C do látex de sequestrar o H₂O₂ também foi comparado com o ácido ascórbico (vitamina C). Todas as diferentes concentrações da fração C foram capazes de sequestrar H₂O₂. O ácido ascórbico exibiu 100% de atividade de sequestro do H₂O₂, aproximadamente. A atividade de sequestro da fração C foi similar à vitamina C nas concentrações de 2 µg/ml a 200 µg/ml, correspondendo a 97% na maior concentração.

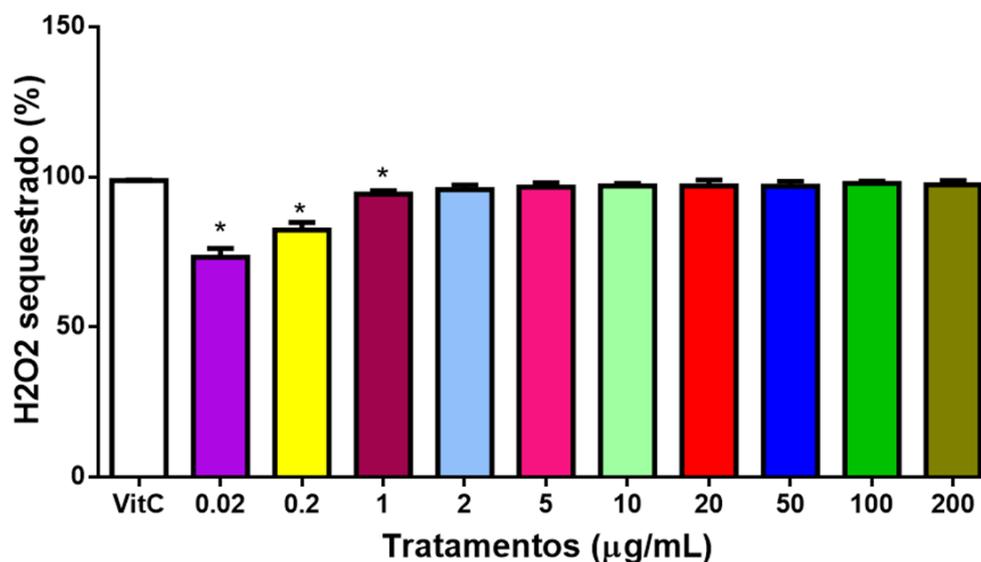


Figura 16. Capacidade de sequestro do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por diferentes concentrações da fração C do látex. Os valores de absorbância foram convertidos em efeitos de sequestro (%) e os dados plotados como os valores das médias das triplicatas dos efeitos de sequestro (%) \pm o desvio padrão. *Estatisticamente diferente do controle positivo ($p < 0,05$).

O radical NO^\bullet pode ser produzido no organismo por diversas células humanas, quando estimuladas. Este radical pode reagir com ácidos, formando o ácido nitroso (HNO_2), que pode promover a desaminação das bases do DNA que contêm grupos $-NH_2$ livres, como a citosina, a guanina e a adenina. O radical NO^\bullet sozinho não é suficientemente reativo para atacar o DNA, mas pode reagir com o ânion radical $O_2^{\bullet-}$ gerando radicais peroxinitritos ($ONOO^\bullet$), capazes de interagir com lipídios, proteínas e material genético, levando a intensas lesões oxidativas [83,173].

Como mostra a Figura 17, a capacidade de diferentes concentrações da fração C do látex de sequestrar o radical NO^\bullet foi comparado com o ácido ascórbico (vitamina C), que foi utilizado como controle positivo e exibiu aproximadamente 100% de atividade de sequestro. Todas as diferentes concentrações da fração C foram capazes de sequestrar NO^\bullet , sendo que a máxima atividade de sequestro do NO^\bullet foi alcançada na concentração de 100 $\mu g/ml$, e correspondeu a 93,71%.

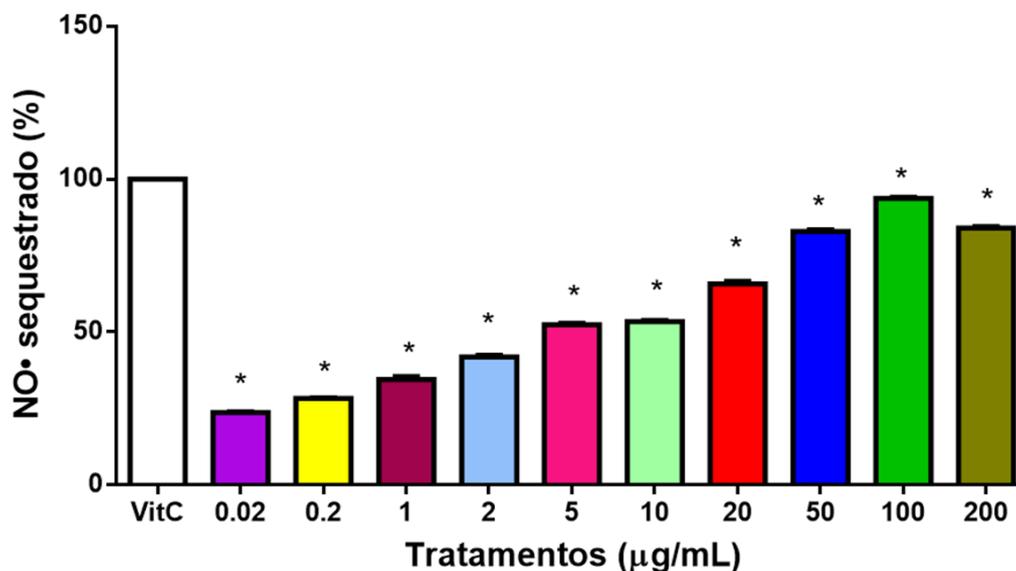


Figura 17. Capacidade de sequestro do óxido nítrico (NO[•]) por diferentes concentrações da fração C do látex. Os valores de absorbância foram convertidos em efeito de sequestro (%) e os dados plotados como os valores das médias das triplicatas dos efeitos de sequestro (%) ± o desvio padrão. * Estatisticamente diferente do controle positivo ($p < 0,05$).

Além da avaliação da capacidade antioxidante da fração C sobre espécies reativas específicas, também foi verificada a capacidade antioxidante total da fração C do látex através do método de redução do molibdênio, avaliando se a fração C seria capaz de reduzir o Mo^{+6} a Mo^{+5} [139]. As concentrações de 10 e 20 µg/ml apresentaram essa capacidade de redução bem próxima à da vitamina C (figura 18). Neste caso, todas as diferentes concentrações de fração C do látex mostraram-se altamente antioxidantes, apresentando o seu máximo com a concentração de 20 µg/ml, correspondendo a 92,67% da capacidade antioxidante do ácido ascórbico.

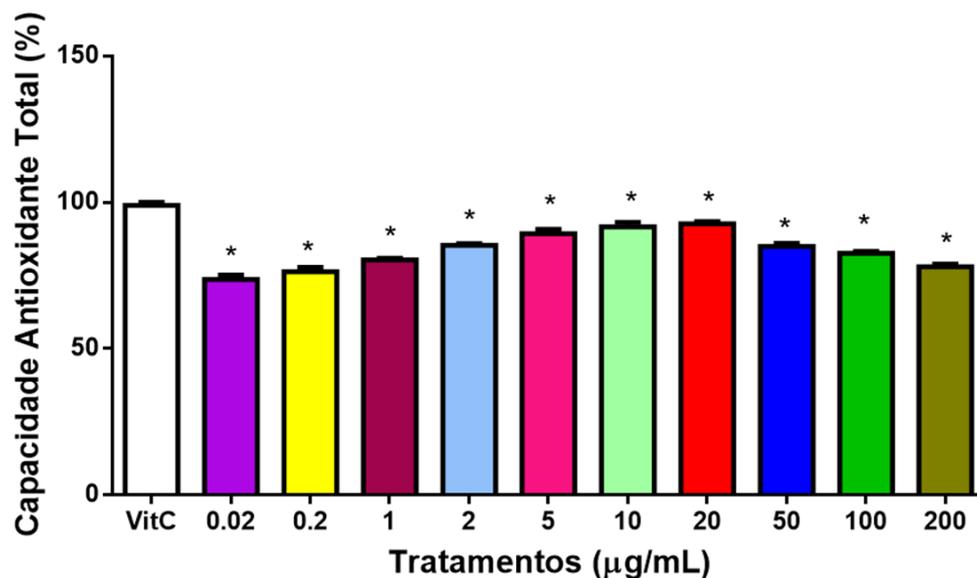


Figura 18. Capacidade antioxidante total de diferentes concentrações da fração C do látex. Os valores de absorbância foram convertidos em capacidade de redução do Molibdênio (%) e os dados plotados como os valores das médias das triplicatas \pm o desvio padrão. *Estatisticamente diferente do controle positivo ($p < 0,05$).

O mecanismo de ação da fração C do látex como antioxidante não está completamente elucidado. No entanto, como a fração C corresponde ao citoplasma das células laticíferas, antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos são encontrados em sua composição, o que garante sua ação como sequestradora de ERO.

E uma vez verificado que diferentes concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis* possuem propriedades antioxidantes, é extremamente importante para fins terapêuticos, estabelecer a sua potencial toxicidade.

4.2 TESTES *IN VITRO* EM MEIO COM CÉLULAS

4.2.1 Teste de Viabilidade Celular (VC)

O MTT, quando incubado com células vivas, é reduzido transformando-se de um composto amarelo em um composto roxo (formazan). A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória, mostrando se as células estão viáveis. Desde a descrição original do teste do MTT por Mosmann (1983) [143], ele tem sido amplamente utilizado em experimentos com células em cultura para a avaliação da viabilidade celular e o estabelecimento de concentrações teste [174].

Através do ensaio do MTT, Lam e colaboradores (2012) [40] mostraram que a viabilidade das linhagens celulares HS27 (fibroblasto normal de prepúcio) e HCT116 (células de câncer colorretal) não foram afetadas após a exposição a várias concentrações da fração C do látex de *Hevea brasiliensis* (2 a 2000 $\mu\text{g/ml}$), enquanto a viabilidade celular da linhagem celular HepG2 (hepatocarcinoma humano) foi reduzida em várias concentrações da fração C.

Os resultados do teste de viabilidade celular (VC) na linhagem celular CHO-k1 (figura 19) mostraram que apenas a concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$ diminuiu a VC em torno de 20%. Como as concentrações de 5, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ não apresentaram diminuição da VC, quando comparado com o CN, e apresentaram importante capacidade de sequestro de espécies reativas nos testes *in vitro* em meio sem células, as mesmas foram escolhidas para serem testadas nos demais testes *in vitro* com células.

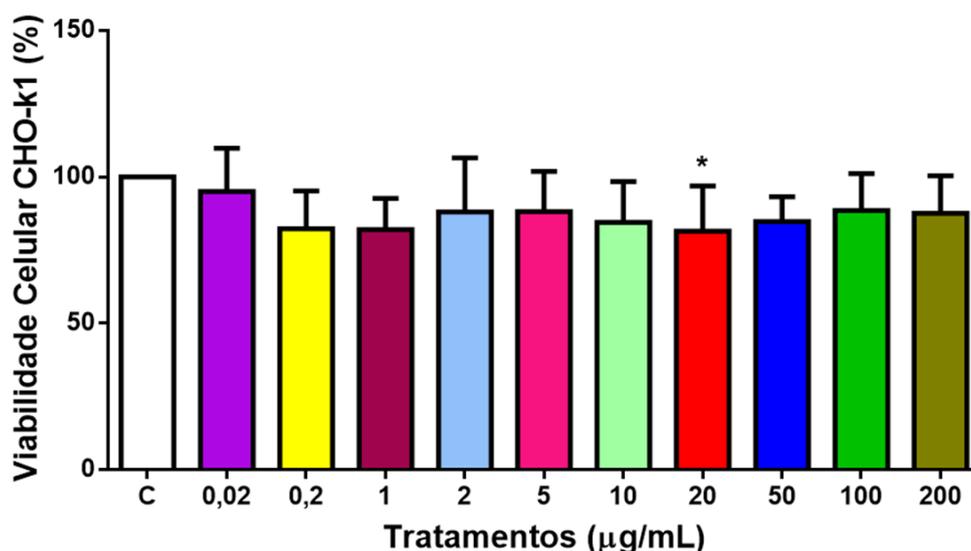


Figura 19. Porcentagem de células de ovário de hamster chinês (CHO-k1) viáveis no teste de viabilidade celular (MTT). O grupo controle negativo apresenta 100% de células viáveis. A fração C do látex foi avaliada citotoxicamente em diferentes concentrações (0,02; 0,2; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$) por 24 h. Os dados estão plotados como média \pm DP. *Estatisticamente diferente do controle negativo, *One-way* ANOVA e teste de Dunnett ($p < 0,05$). C: controle negativo, PBS.

Já os resultados de VC para a linhagem celular B16F10 (figura 20) mostraram uma redução significativa na VC dessas células nas concentrações de 10 a 200 $\mu\text{g/ml}$. Por

essa ser uma linhagem celular tumoral, os resultados corroboram com os encontrados por Lam e colaboradores [40], onde a linhagem tumoral de hepatocarcinoma humano (HepG2) também apresentou uma diminuição significativa de sua VC após exposição de 24 h, 48 h e 72 h a várias concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis* (3 a 1000 µg/ml).

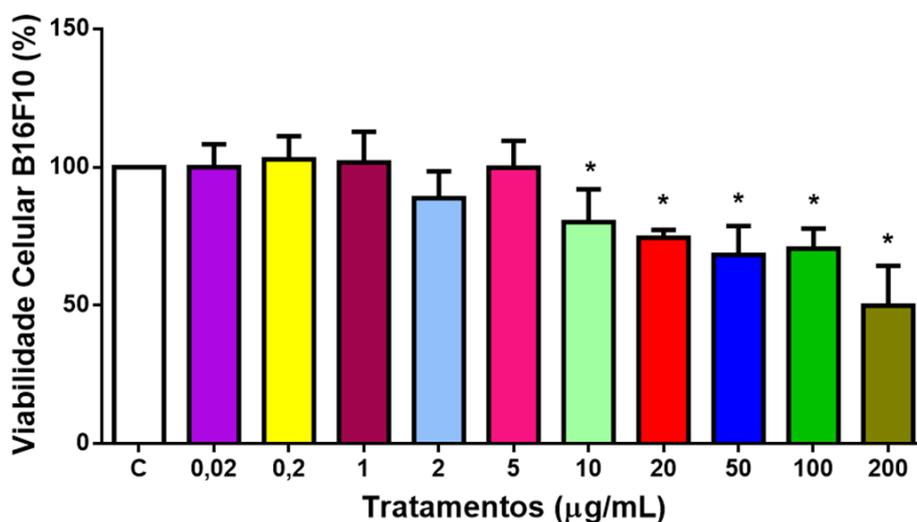


Figura 20. Porcentagem de células de melanoma murino (B16F10) viáveis no teste de viabilidade celular (MTT). O grupo controle negativo apresenta 100% de células viáveis. A fração C do látex foi avaliada citotoxicamente em diferentes concentrações (0,02; 0,2; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100 e 200 µg/ml) por 24 h. Os dados estão plotados como média ± DP. *Estatisticamente diferente do controle negativo, *One-way* ANOVA e teste de Dunnett ($p < 0,05$). C: controle negativo, PBS.

Esses resultados mostram a especificidade da fração C por linhagens tumorais. E como o melanoma é um tipo de tumor agressivo e metastático, a fração C poderia reduzir o crescimento dessas células malignas em diferentes sítios no organismo.

Para saber se a redução na viabilidade celular nas células tumorais provocada pela fração C do látex de *H. brasiliensis* está associada com uma redução na proliferação ou aumento de morte celular, outros testes foram realizados.

4.2.2 Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa (*single-cell gel electrophoresis*) é um método simples e sensível para estudar danos e reparos no DNA. Nesta técnica de eletroforese em microgel, um pequeno número de células suspensas em uma fina camada de gel de agarose sobre uma lâmina de vidro é lisada, sofre o processo de migração em uma solução eletrizada, e é corado com um corante fluorescente que se liga ao DNA. Células com grandes danos no DNA apresentam maior migração do núcleo para o ânodo, o que a faz ter o formato de um cometa [175] (figura 12). A sensibilidade do método permite a detecção de danos no DNA de células individuais, e medir também o potencial genotóxico de diversas substâncias.

As três concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis* mostraram ausência de efeito genotóxico em células CHO-k1 após tratamento de 24 h com três concentrações da fração C do látex (5, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$), isto porque os *scores* obtidos para cada tratamento foram semelhantes ao controle negativo (figura 21). Esse protocolo empregado fornece ainda mais evidências sobre as propriedades antioxidantes da fração C na linhagem CHO-k1.

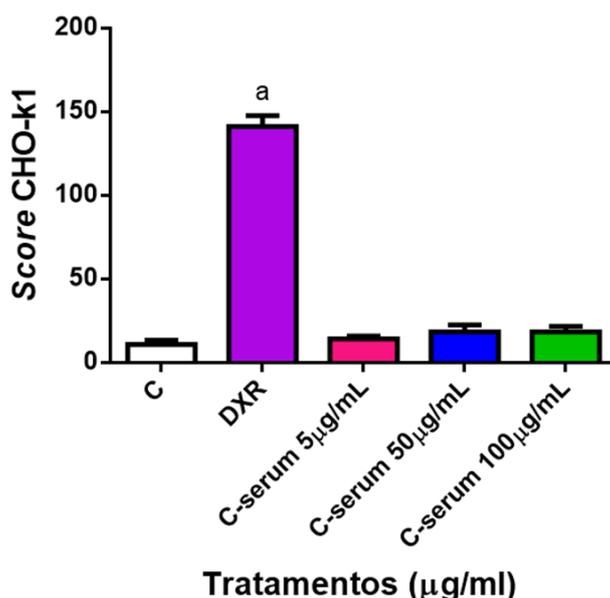


Figura 21. *Score* de dano celular no ensaio do cometa em células de ovário de hamster chinês (CHO-k1). Avaliação da genotoxicidade da fração C do látex de *Hevea brasiliensis* em três diferentes concentrações (5, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$) por 24 h. Os dados estão plotados como média \pm DP. ^a Estatisticamente diferente do controle negativo, *One-way* ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). C: controle negativo, PBS. DXR: doxorubicina.

Há poucos relatos na literatura de testes de genotoxicidade envolvendo o látex de *H. brasiliensis*. Floriano e colaboradores (2014) [176] avaliaram as membranas de borracha natural de látex quanto à genotoxicidade em fibroblastos de camundongo (NIH3T3), através do Ensaio do Cometa, após 72 h de contato dos fibroblastos com a membrana diretamente. A membrana de borracha natural feita a partir do látex de *H. brasiliensis* RRIM 600 mostrou-se não genotóxica.

No entanto, a fração C do látex de *H. brasiliensis* aumentou as lesões no DNA nas células B16F10 nas três concentrações testadas (5, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$) (figura 22). O padrão de migração do DNA ainda foi menor quando comparado com a DXR, porém foi estatisticamente diferente do controle negativo. Esse aumento no padrão de migração da cauda de DNA mostra que a toxicidade da fração C nas células B16F10 não está envolvida com a formação de *crosslinks* proteína-DNA e *crosslinks* intracadeia e intercadeias de DNA, já que os *crosslinks* reduzem a capacidade do DNA de migrar no gel de agarose [177].

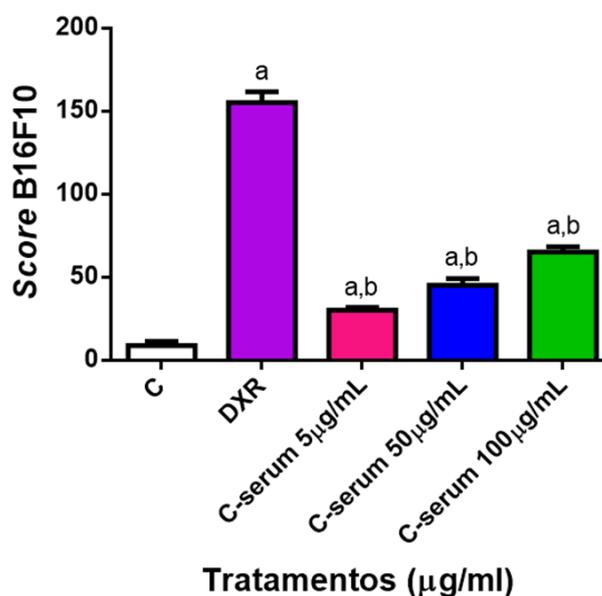


Figura 22. Score de dano celular no ensaio do cometa em células de melanoma murino (B16F10). Avaliação da genotoxicidade da fração C do látex de *Hevea brasiliensis* em três diferentes concentrações (5, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$) por 24 h. Os dados estão plotados como média \pm DP. ^a Estatisticamente diferente do controle negativo, ^b estatisticamente diferente do controle positivo, *One-way* ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). C: controle negativo, PBS. DXR: doxorubicina.

4.2.3 Detecção morfológica de células apoptóticas e necróticas

A integridade do DNA genômico está constantemente sob ameaça, mesmo em células perfeitamente saudáveis. Os danos no DNA podem resultar da ação de espécies reativas ou de erros estocásticos na duplicação ou recombinação, bem como de genotoxinas ambientais ou terapêuticas. Enquanto os organismos unicelulares respondem à presença de lesões no DNA, ativando mecanismos de *checkpoints* e reparo, os organismos multicelulares têm a possibilidade adicional de eliminar as células danificadas por meio da ativação de mecanismos de morte celular programada [178].

A morte celular está envolvida no ciclo normal de desenvolvimento e maturação das células, sendo componente de muitas respostas dos tecidos vivos a agentes xenobióticos e a modulações ambientais. A apoptose é uma forma típica de morte celular programada que resulta na formação dos corpos apoptóticos que rapidamente são fagocitados e digeridos por macrófagos ou por células vizinhas. A apoptose desempenha um importante papel para a manutenção da função celular normal, e uma perturbação neste balanço leva as células tumorais a escaparem da apoptose [179,180].

Um outro tipo de morte celular é a necrose, que difere do processo de apoptose pelo fato de que as células incham e se rompem, liberando o material citoplasmático e atraindo linfócitos, o que frequentemente desenvolve uma resposta inflamatória. Sabe-se que o processo de necrose é causado por injúria resultando na morte de grupos de células em um tecido, contrastando com a apoptose que resulta em morte de células individuais [181,182].

A detecção morfológica de apoptose e necrose foi verificada para as células de ovário de hamster chinês (CHO-k1) depois de 24 h de exposição a três concentrações da fração C de látex (5, 50 e 100 µg/ml), através da coloração com dois corantes, Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio (PI). Doxorrubicina (DXR) e PBS foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

Os corantes empregados mostraram que, para a linhagem CHO-k1, não houve aumento significativo na proporção de mortes por apoptose ou necrose após a exposição de 24 h às diferentes concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis*, com relação ao controle negativo (figuras 23, 24 e 25). Na figura 22, inclusive, pode-se verificar uma diminuição significativa na proporção de células apoptóticas após a exposição à fração C nas concentrações de 50 e 100 µg/ml.

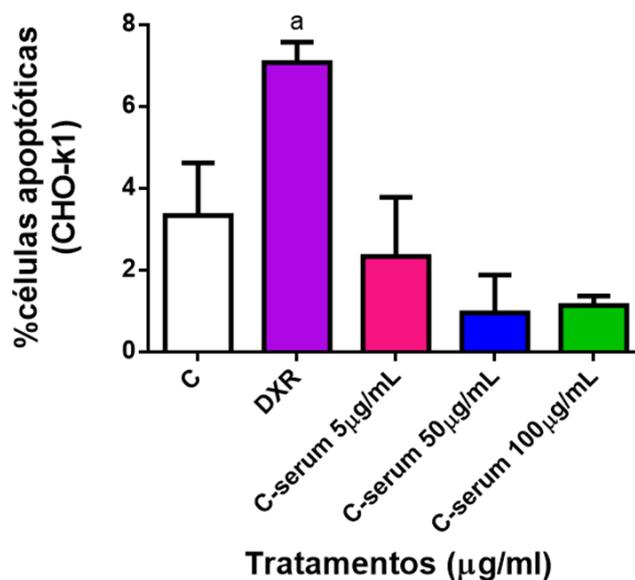


Figura 23. Porcentagem de células apoptóticas da linhagem CHO-k1 após exposição de 24 h a três concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis* (5, 50 e 100 µg/ml). Os resultados foram obtidos após o emprego de dois corantes, Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio (PI). Foram analisadas 500 células por experimento, em triplicata. Os dados estão plotados como média ± DP. ^a Estatisticamente diferente do controle negativo, *One-way* ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). C: controle negativo, PBS. DXR: doxorubicina.

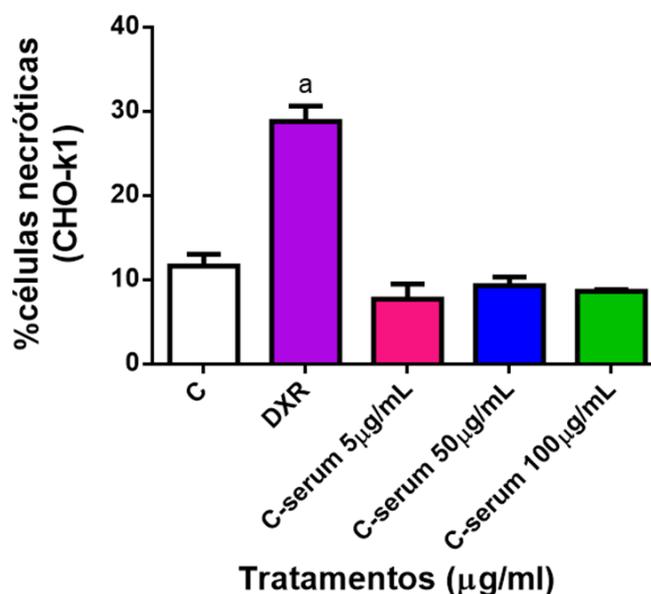


Figura 24. Porcentagem de células necróticas da linhagem CHO-k1 após exposição de 24 h a três concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis* (5, 50 e 100 µg/ml). Os resultados foram obtidos após o emprego de dois corantes, Hoechst 33342 e Iodeto de

Propídio (PI). Foram analisadas 500 células por experimento, em triplicata. Os dados estão plotados como média \pm DP. ^a Estatisticamente diferente do controle negativo, *One-way* ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). C: controle negativo, PBS. DXR: doxorubicina.

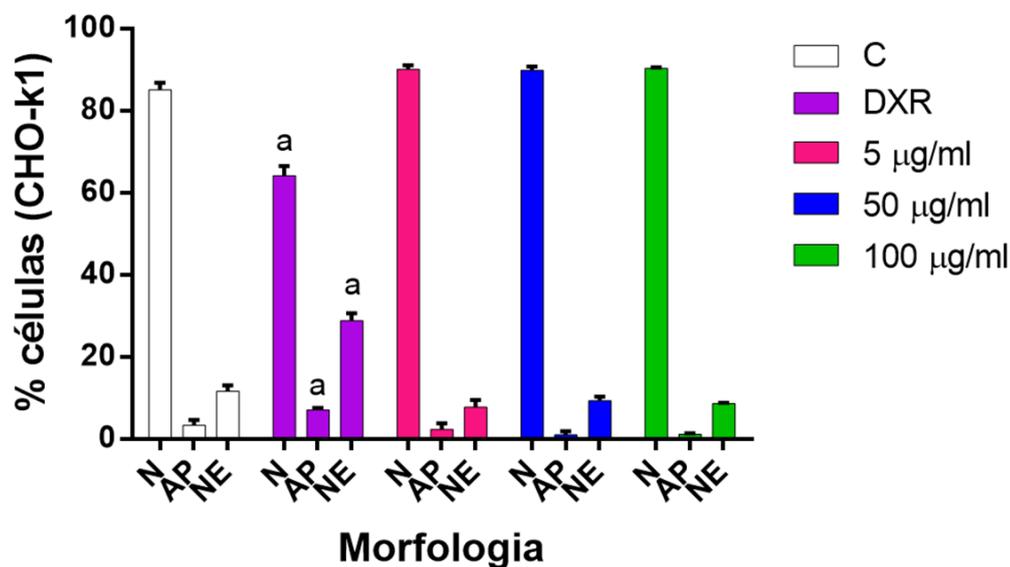


Figura 25. Comparação entre as porcentagens de células normais, apoptóticas e necróticas da linhagem CHO-k1 após exposição de 24 h a três concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis* (5, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$). Os resultados foram obtidos após o emprego de dois corantes, Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio (PI). N = células normais, AP = células apoptóticas, NE = células necróticas. Foram analisadas 500 células por experimento, em triplicata. Os dados estão plotados como média \pm DP. ^a Estatisticamente diferente do controle negativo, *One-way* ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). C: controle negativo, PBS. DXR: doxorubicina.

Vários agentes genotóxicos são capazes de induzir danos no material genético e provocar respostas como o bloqueio do ciclo celular, o reparo do DNA, a senescência prematura induzida por estresse, apoptose ou necrose. Para a linhagem CHO-k1, a fração C do látex não reduziu a sobrevivência das células através da indução de vias de morte, corroborando com os resultados do teste de viabilidade celular (figura 19).

Uma questão importante com relação às respostas celulares ao dano no material genético é como a extensão da lesão é reconhecida como excessiva pelas células, acionando a mudança do reparo para apoptose. A baixa proporção de apoptose e necrose induzida pela fração C nas células CHO-k1 também corrobora com os resultados da

avaliação de genotoxicidade através do ensaio do cometa, que mostrou ausência de genotoxicidade nessa linhagem celular (figura 21).

Para a linhagem B16F10, no entanto, a coloração com Hoechst 33342 e PI mostrou que o tratamento com a fração C do látex aumentou a taxa de apoptose e necrose nessas células (figuras 26, 27, 28 e 29).

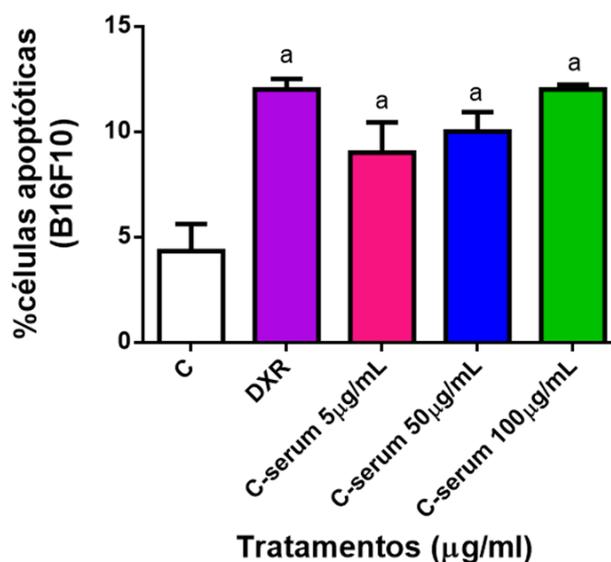


Figura 26. Porcentagem de células apoptóticas da linhagem B16F10 após exposição de 24 h a três concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis* (5, 50 e 100 µg/ml). Os resultados foram obtidos após o emprego de dois corantes, Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio (PI). Foram analisadas 500 células por experimento, em triplicata. Os dados estão plotados como média ± DP. ^a Estatisticamente diferente do controle negativo, *One-way* ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). C: controle negativo, PBS. DXR: doxorubicina.

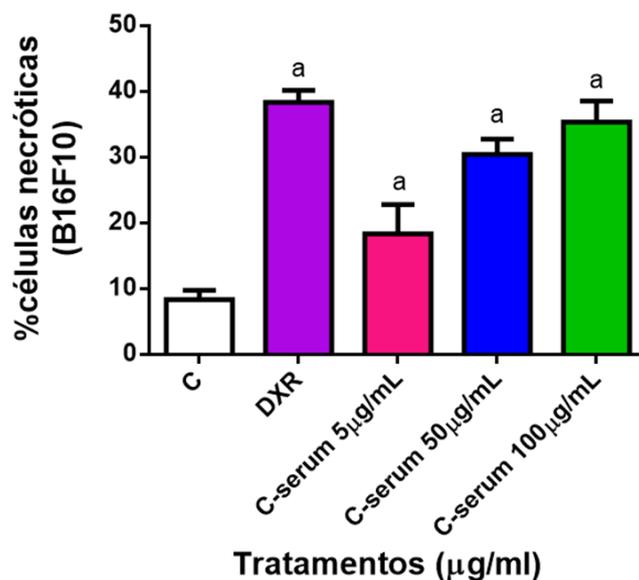


Figura 27. Porcentagem de células necróticas da linhagem B16F10 após exposição de 24 h a três concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis* (5, 50 e 100 µg/ml). Os resultados foram obtidos após o emprego de dois corantes, Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio (PI). Foram analisadas 500 células por experimento, em triplicata. Os dados estão plotados como média ± DP. ^a Estatisticamente diferente do controle negativo, *One-way* ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). C: controle negativo, PBS. DXR: doxorubicina.

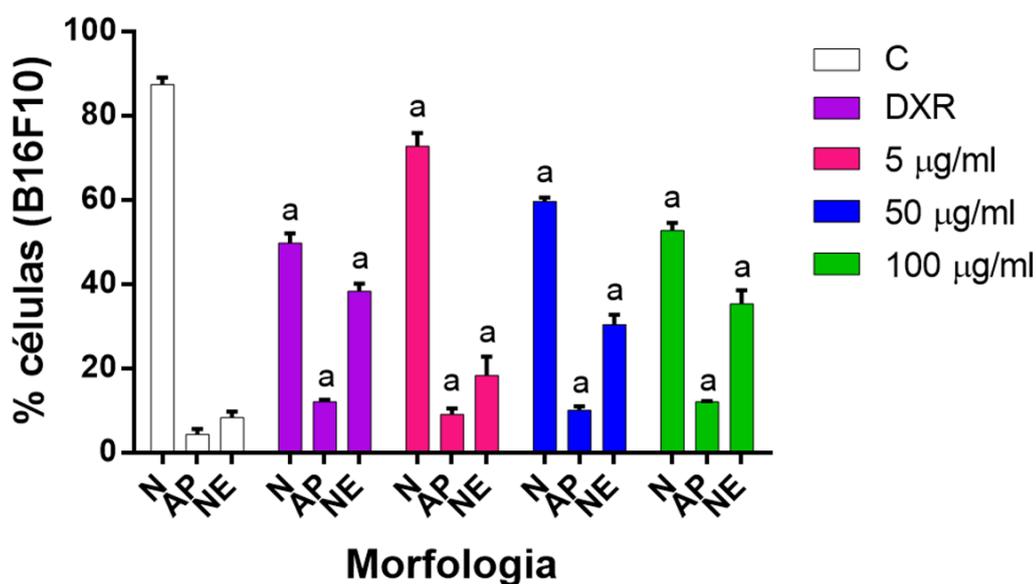


Figura 28. Comparação entre as porcentagens de células normais, apoptóticas e necróticas da linhagem B16F10 após exposição de 24 h a três concentrações da fração C do látex de *H. brasiliensis* (5, 50 e 100 µg/ml). Os resultados foram obtidos após o emprego de dois corantes, Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio (PI). N = células normais,

AP = células apoptóticas, NE = células necróticas. Foram analisadas 500 células por experimento, em triplicata. Os dados estão plotados como média \pm DP. ^a Estatisticamente diferente do controle negativo, *One-way* ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). C: controle negativo, PBS. DXR: doxorubicina.

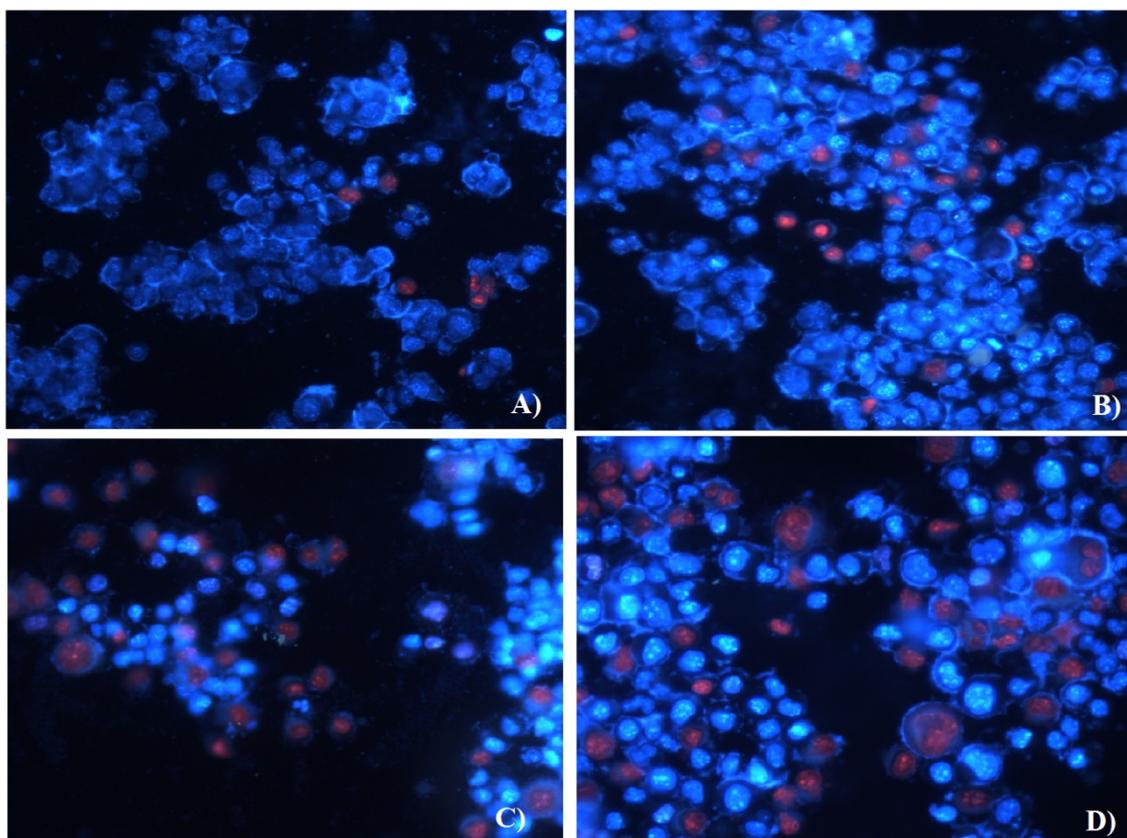


Figura 29. Fração C do látex de *Hevea brasiliensis* induz morte celular em células de melanoma murino (B16F10). Avaliação de padrão de morte celular por coloração com Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio (PI) nas células B16F10 expostas a três diferentes concentrações (5, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$) da fração C por 24 h. A) Controle negativo, PBS; B) Controle Positivo, DXR. C) Fração C a 50 $\mu\text{g/ml}$; D) Fração C a 100 $\mu\text{g/ml}$. Núcleos azuis significam células viáveis e núcleos vermelhos significam células necróticas.

Inúmeros fatores podem promover a seletividade da fração C do látex em células tumorais, e um destes fatores é a presença de inibidores de proteases presentes na fração C [24]. Os efeitos antitumorais desses inibidores de proteases têm sido atribuídos às suas múltiplas atividades regulatórias que incluem a regulação positiva da conexina 43 e da MAPK fosfatase 1, e a regulação negativa da EGF/TGF- α e ativador plasminogênico de uroquinase, marcadores valiosos em estados de malignidade. Com muitas outras

atividades regulatórias, os inibidores suprimem a carcinogênese em diferentes estágios, incluindo iniciação, promoção e progressão [183,184].

4.2.4 Parâmetros de Estresse Oxidativo

A quantificação dos níveis de tiol total demonstrou que as concentrações testadas da fração C do látex (5, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$) não reduziram as defesas antioxidantes nas células CHO-k1 (figura 30). No entanto, a exposição à fração C nas células B16F0 nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ diminuiu as defesas antioxidantes nessas células (figura 31).

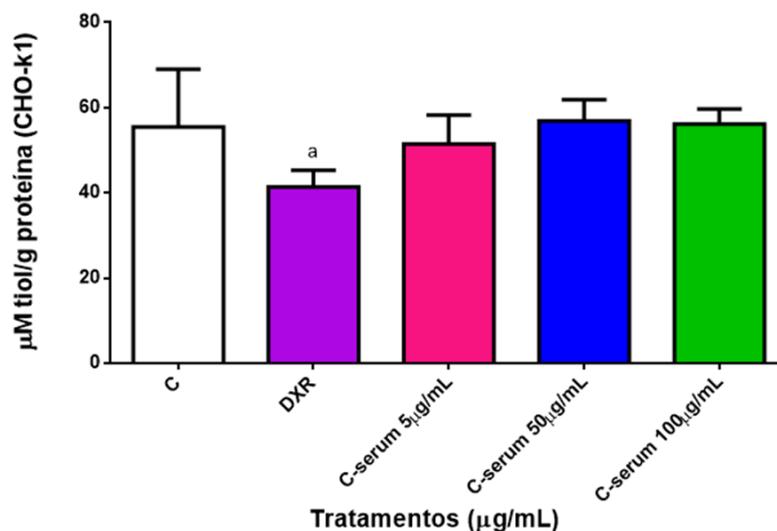


Figura 30. Avaliação dos níveis de tiol total nas células CHO-k1 expostas a três concentrações da fração C do látex de *Hevea brasiliensis* (5, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$) por 24 h. Os dados estão plotados como média \pm DP. ^a Estatisticamente diferente do controle negativo, *One-way* ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). C: controle negativo, PBS. DXR: doxorubicina.

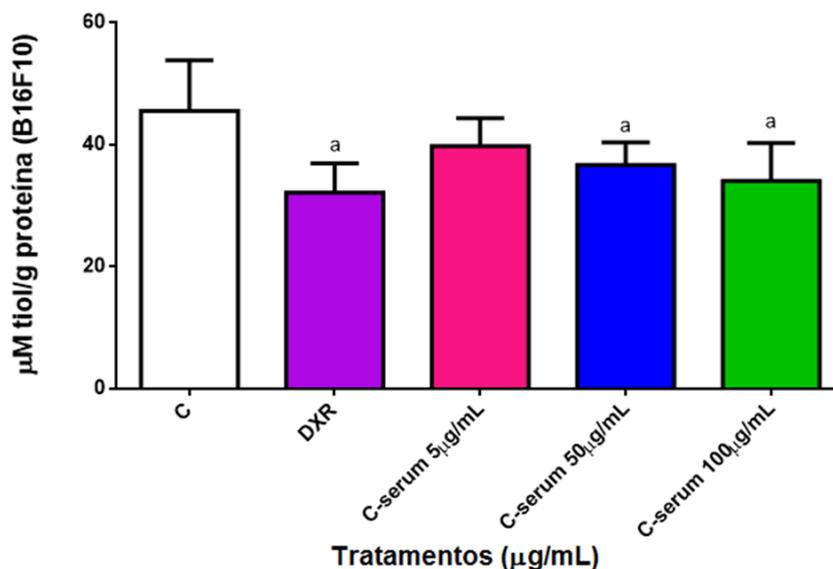


Figura 31. Avaliação dos níveis de tiol total nas células B16F10 expostas a três concentrações da fração C do látex de *Hevea brasiliensis* (5, 50 e 100 µg/ml) por 24 h. Os dados estão plotados como média ± DP. ^a Estatisticamente diferente do controle negativo, *One-way* ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). C: controle negativo, PBS. DXR: doxorubicina.

A própria célula laticífera apresenta um sistema rico em enzimas que sequestram ERO e que já foi bem documentado [185-187]. Os dois principais antioxidantes presentes no látex é o ascorbato e o tocotrienol [188], e a presença dessas substâncias antioxidantes no látex, comprovada pelos resultados *in vitro* em meio sem células, provavelmente manteve os níveis de tiol elevados nas células CHO-k1 após a exposição à fração C.

As mesmas substâncias antioxidantes podem funcionar como pró-oxidantes, dependendo do meio, e promover a formação de H_2O_2 , por exemplo. Como as células tumorais são particularmente suscetíveis à exposição ao H_2O_2 [189], a exposição à fração C diminuiu os níveis de tiol total nas células B16F10 após a exposição à fração C do látex.

A quantificação de malonaldeído (MDA) mostrou que na linhagem celular CHO-k1, a exposição à fração C do látex reduziu as concentrações de MDA em uma forma dose dependente (figura 32). Para a linhagem B16F10, o aumento nas concentrações de MDA também ocorreu em uma forma dose dependente (figura 33).

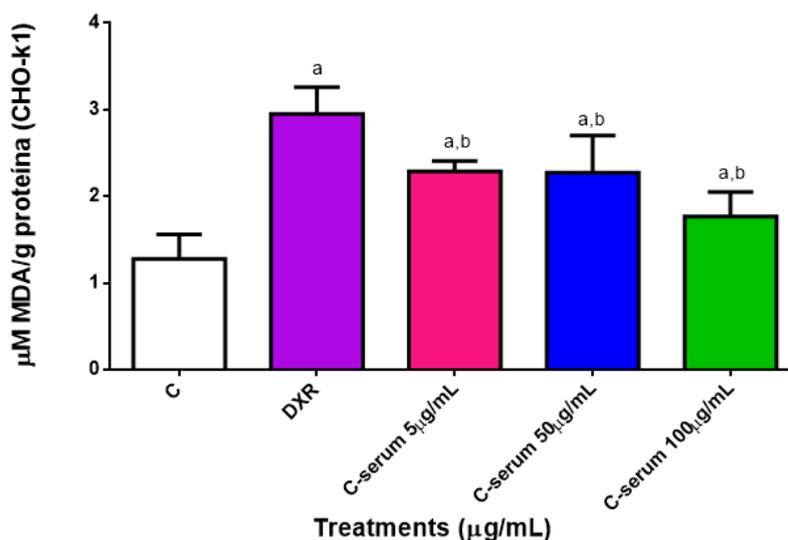


Figura 32. Avaliação dos níveis de malonaldeído (MDA) nas células CHO-k1 expostas a três concentrações da fração C do látex de *Hevea brasiliensis* (5, 50 e 100 µg/ml) por 24 h. Os dados estão plotados como média ± DP. ^a Estatisticamente diferente do controle negativo, ^b estatisticamente diferente do controle positivo, *One-way* ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). C: controle negativo, PBS. DXR: doxorubicina.

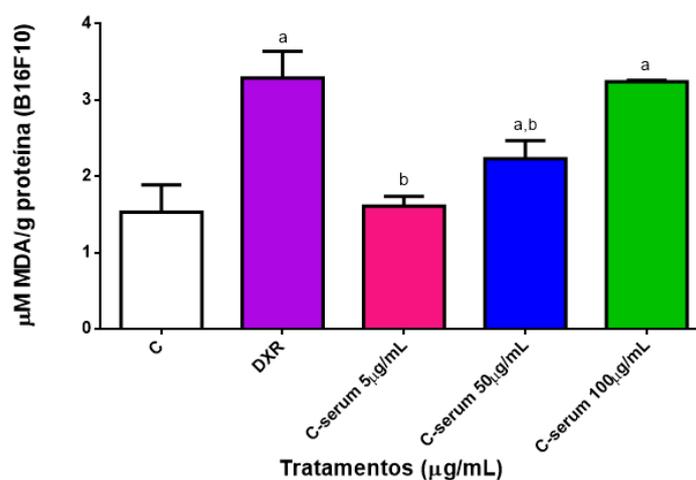


Figura 33. Avaliação dos níveis de malonaldeído (MDA) nas células B16F10 expostas a três concentrações da fração C do látex de *Hevea brasiliensis* (5, 50 e 100 µg/ml) por 24 h. Os dados estão plotados como média ± DP. ^a Estatisticamente diferente do controle negativo, ^b estatisticamente diferente do controle positivo, *One-way* ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). C: controle negativo, PBS. DXR: doxorubicina.

Os resultados *in vitro* com as células CHO-k1 e B16F10 mostraram a ação seletiva da fração C com a linhagem tumoral. As três concentrações utilizadas (5, 50 e 100 µg/ml) não alteraram a viabilidade celular, não apresentaram efeitos genotóxicos, não induziram morte celular programada, não reduziram os níveis de tiol total e nem aumentaram os níveis de MDA na linhagem CHO-k1. No entanto, a fração C foi capaz de induzir diminuição da viabilidade celular, induzir genotoxicidade, elevar o número de células apoptóticas e necróticas, e alterar os níveis de tiol total e MDA na linhagem B16F10.

4.3 TESTES *IN VIVO*

4.3.1 *Análise antioxidante de eritrócitos*

O sangue humano é uma excelente fonte de marcadores *in vivo* de estresse oxidativo, uma vez que nele são transportados e redistribuídos antioxidantes e endobióticos modificados por ação de espécies reativas [190].

Em condições fisiológicas normais, o eritrócito é uma célula com um período de vida de aproximadamente 120 dias. É, todavia, uma célula com capacidade biosintética limitada, que sofre e acumula agressões físicas e químicas, as quais sendo intensas e prolongadas determinam a aceleração do processo de envelhecimento e, por consequência, a remoção prematura da célula [191]. E pelas suas características únicas e a sua sensibilidade ao estresse oxidativo, o eritrócito é um modelo importante de estudo de estresse oxidativo sistêmico.

Já é muito bem estabelecido que a exposição à radiação UV resulta em depleção nas capacidades antioxidantes do organismo. Os animais do grupo controle irradiado foram expostos à radiação UVB por 15 semanas e tiveram uma redução significativa da atividade da catalase nos eritrócitos (figura 34). No entanto, os animais irradiados tratados com creme + 1% da fração C do látex apresentaram um aumento na atividade da catalase, estatisticamente semelhante ao controle não irradiado. É possível que a menor concentração tenha tido seus componentes antioxidantes melhor absorvidos com maior atividade sistêmica.

Provavelmente, o efeito pró-inflamatório provocado pela irradiação prolongada, com influxo de neutrófilos e geração de espécies reativas, tenha colaborado com a depleção da catalase por consumo da mesma nos eritrócitos. E estudos já comprovaram que a catalase é a enzima antioxidante mais afetada pós radiação UVB [192-195].

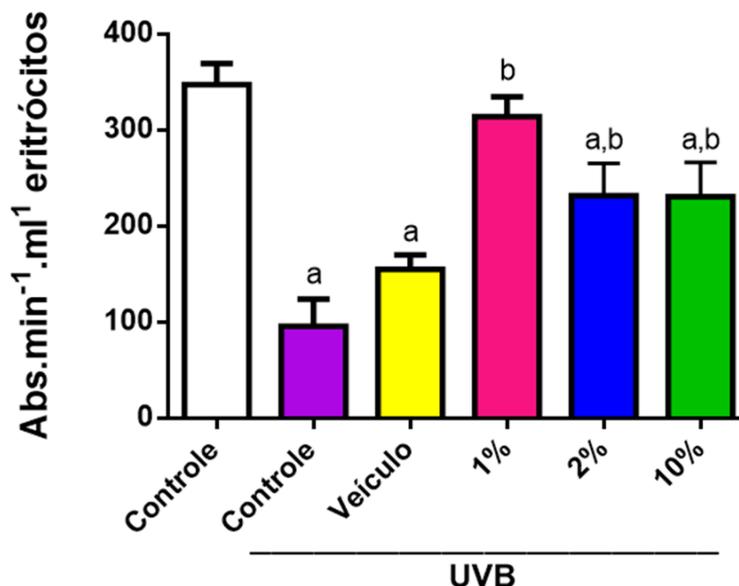


Figura 34. Quantificação da atividade da catalase nos eritrócitos de animais não irradiados e irradiados. Os resultados estão apresentados na forma de média \pm DP. ^a Estatisticamente diferente do controle não irradiado. ^b Estatisticamente diferente do controle irradiado. ($p < 0,05$).

Na corrente sanguínea, 99,5% da GSH encontram-se no interior dos eritrócitos, já que a geração e a ação de radicais livres são abundantes nessas células.

Os animais controle irradiados apresentaram uma intensa diminuição na quantidade de GSH total nos eritrócitos (figura 35). Em contrapartida, os animais irradiados tratados com creme + fração C (1%, 2% e 10%) do látex de *H. brasiliensis* tiveram seus níveis de GSH elevados.

De alguma forma, ainda não estabelecida por não se conhecer exatamente a composição da fração C do látex de *Hevea brasiliensis*, a fração C em suas diferentes concentrações apresentou propriedades antioxidantes, mantendo elevadas as concentrações de GSH nos eritrócitos dos animais irradiados. Esses resultados também corroboram com os resultados encontrados *in vitro* com a linhagem CHO-k1 e outros resultados *in vivo* nesse trabalho.

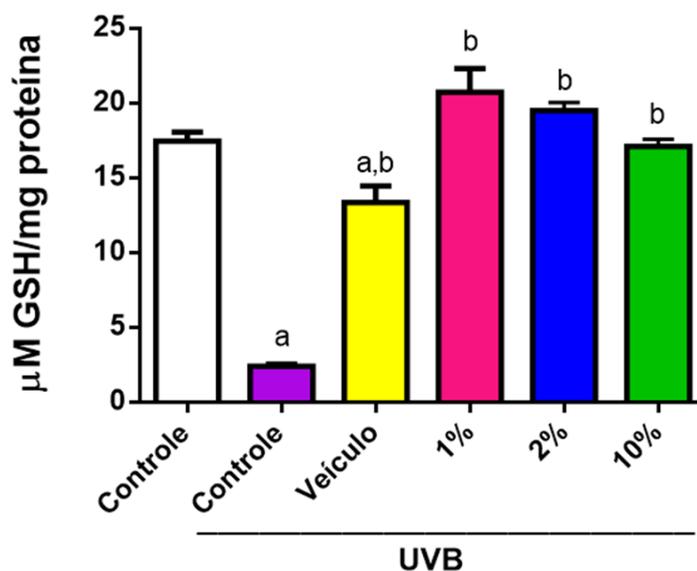


Figura 35. Quantificação dos níveis de glutathiona (GSH) em eritrócitos de animais não irradiados e irradiados. Os resultados estão apresentados na forma de média \pm DP. ^a Estatisticamente diferente do controle não irradiado. ^b Estatisticamente diferente do controle irradiado. ($p < 0,05$).

4.3.2 Análise antioxidante da pele

Na pele, a irradiação UVB é capaz de induzir uma dramática cascata de eventos celulares em resposta aos danos, através de diferentes vias de sinalização, que levam as células à sobrevivência ou morte via necrose ou apoptose [196]. Os principais efeitos deste tipo de irradiação na pele estão associados com a capacidade de afetar os queratinócitos e as células de Langerhans (figura 5), praticamente através da geração de fotossensibilização endógena e da formação de espécies reativas [197]. Estas espécies reativas se formam através de reações redox envolvendo transferências de grupos eletrônicos, durante o transporte mitocondrial de elétrons [198]. Como consequência, acontece a produção de ânions superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ou oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que atuam como segundos mensageiros, associados com outras funções como crescimento e diferenciação [199]. Neutrófilos também são estimulados, levando a um aumento na atividade da mieloperoxidase, uma enzima que também aumenta a geração de espécies reativas [200]. Esse aumento nas espécies reativas leva a danos nos lipídios celulares, proteínas e DNA, levando a modificações, e posterior destruição, das estruturas da pele. Como consequência, as funções regulares da pele podem ser inibidas [201].

Além do aumento nas espécies reativas, a radiação UV também induz a atividade das metaloproteases da matriz extracelular (MMPs), apontadas como os primeiros mediadores de danos nos tecidos conjuntivos da pele e causadoras de envelhecimento precoce [202]. Após exposição à radiação UV, uma rede de citocinas, incluindo a interleucina (IL)-1 β , responsável pela inflamação cutânea, são ativadas e liberadas. Estas moléculas promovem vasodilatação, aumentando o espaço entre as células endoteliais, levando à perda de fluidos no interstício e posterior edema [203,204].

A medida do TRAP (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*) descrita por Repetto e colaboradores (1996) [157] avalia os níveis de antioxidantes totais de um tecido, principalmente antioxidantes de baixa massa molecular, fornecendo uma informação mais relevante do que a determinação da concentração isolada de um determinado antioxidante [203]. Neste método, o 2-azobis-(2-amidinopropano) (ABAP), um sistema gerador de radical alcooxil por decomposição térmica, produz fótons que são amplificados pelo luminol e medidos em um luminômetro. A reação é inibida por análogos da vitamina E ou outros lipossolúveis e hidrossolúveis existentes na amostra de pele. O sistema é calibrado com um análogo hidrossolúvel da vitamina E (Trolox).

O TRAP dos animais irradiados (grupo controle irradiado, grupo com creme sem fração C, grupo com creme + 1% de fração C e grupo com creme + 2% de fração C) foi significativamente menor do que dos animais não irradiados. No entanto, o TRAP dos animais tratados com creme + 10% de fração C do látex de *H. brasiliensis* mostrou-se estatisticamente semelhante ao dos animais não irradiados, indicando um restabelecimento nas defesas antioxidantes após 15 semanas de irradiação (figura 36).

Andrade (2012) [205] estudando uma fração do látex de *H. brasiliensis* separada por cromatografia em ratos diabéticos e com feridas, encontrou, através do método de TRAP em homogenato de pele das úlceras tratadas topicamente com um gel contendo o látex, que o látex presente no gel utilizado sobre as feridas dos ratos diabéticos não aumentou a capacidade antioxidante no local. Isso pode, no entanto, estar relacionado ao fato de que animais diabéticos apresentam maior influxo de células inflamatórias, especialmente neutrófilos, com aumento considerável do estresse oxidativo [206].

Após a exposição à radiação UVB também acontece um processo inflamatório, caracterizado por edemas e eritemas e pelo aumento nos níveis de prostaglandinas. Células especializadas (especialmente os neutrófilos), então, são recrutadas e estimuladas, seguido da ativação do sistema NAD(P)H oxidase, gerando uma série de

espécies reativas. Essa geração intensa de espécies reativas pode ser caracterizada na Figura 28, pela diminuição do TRAP no controle irradiado [206].

Considerando, então, esse processo, pode-se dizer que o creme + 10% da fração C do látex ou estimulou um aumento significativo de substâncias antioxidantes, ou apresenta em sua composição substâncias antioxidantes que foram percebidas pelo método do TRAP, corroborando com os testes *in vitro* em meio sem células.

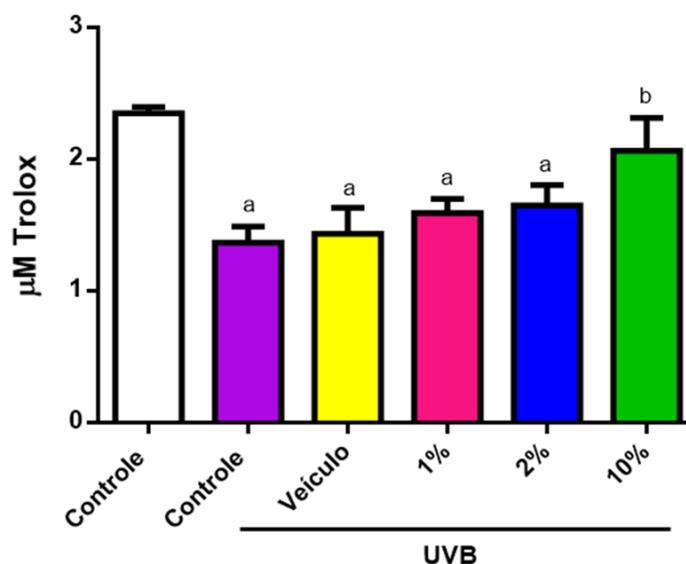


Figura 36. Capacidade antioxidante total (TRAP) em animais não irradiados e irradiados medida pelo método da quimioluminescência. Os resultados estão apresentados na forma de média \pm DP. ^a Estatisticamente diferente do controle não irradiado. ^b Estatisticamente diferente do controle irradiado. ($p < 0,05$).

O sistema antioxidante cutâneo é formado por substâncias enzimáticas e não-enzimáticas. Dentre os antioxidantes enzimáticos, a catalase (CAT) está entre as que se destacam [207]. A CAT, encontrada nos peroxissomos, é a principal responsável pela remoção imediata de H_2O_2 , através da catálise da decomposição específica de H_2O_2 gerando moléculas de água e oxigênio [208].

A atividade da catalase diminuiu significativamente no grupo controle irradiado e nos grupos tratados com creme + 1% de fração C do látex, e com creme + 2% de fração C do látex (figura 37). Porém, no grupo tratado com creme + 10% de fração C do látex, a atividade da catalase foi restabelecida a níveis significativamente semelhantes ao controle não irradiado.

Parte da atividade da catalase é inibida após irradiação com UVB [209], o que é demonstrado pelos níveis tão baixos de catalase encontrados no controle irradiado. Além desse fator da inibição induzida pela radiação UVB, o processo inflamatório provocado pela irradiação em si eleva a produção de ânions $O_2^{\cdot-}$, aumentando a formação de H_2O_2 , aumentando o consumo da CAT pela pele. Desta forma, o restabelecimento da atividade da catalase, a níveis significativamente semelhantes ao controle não irradiado no grupo tratado com creme + 10% da fração C do látex, pode indicar que a atividade antioxidante da fração C em si estaria diminuindo o consumo da catalase, corroborando com os dados encontrados *in vitro* para sequestro de H_2O_2 (figura 15).

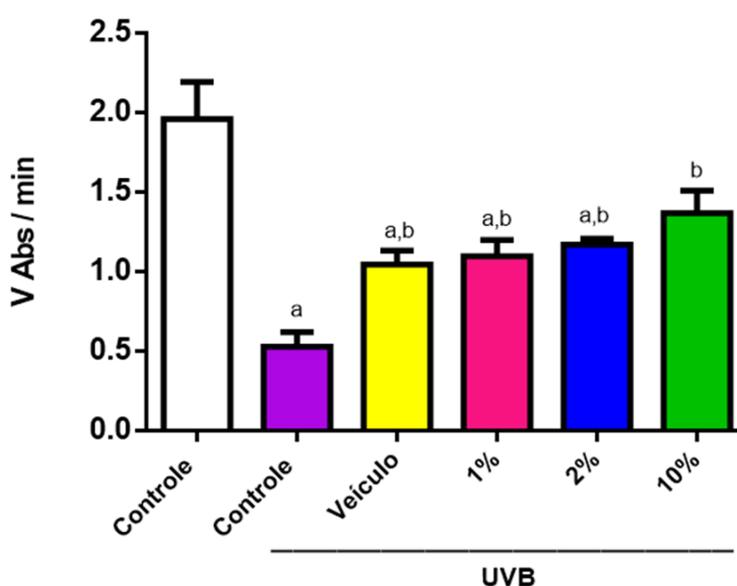


Figura 37. Quantificação da atividade da catalase cutânea em animais não irradiados e irradiados. Os resultados estão apresentados na forma de média \pm DP. ^a Estatisticamente diferente do controle não irradiado. ^b Estatisticamente diferente do controle irradiado. ($p < 0,05$).

A GSH é o mais abundante tiol celular de baixa massa molecular, encontrado intracelularmente em altas concentrações nos organismos aeróbios. Muitas das reações da GSH envolvem o grupo sulfidril (SH), altamente polarizável, tornando-o um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos, fazendo da GSH um bom redutor [210].

A atividade protetora da GSH se dá pela sua oxidação na forma de glutatona dissulfeto (GSSG) durante o ciclo catalítico da glutatona peroxidase (GSH-Px) e da

glutathione oxidase (GSH-Ox). E para que essa atividade protetora seja mantida, é necessário regenerar a GSH, processo realizado pela glutathione reductase (GSH-Rd) [210].

A figura 38 mostra que os níveis de GSH diminuíram significativamente após a irradiação crônica de UVB. No entanto, os animais tratados com o creme com a fração C antes da irradiação tiveram seus níveis de GSH similares ao grupo controle não irradiado.

Alguns autores já sugeriram a diminuição dos níveis de GSH como um mecanismo fotoprotetor [202, 211-213], já que além de interromper a ação de espécies reativas de forma direta, a GSH participa da regeneração do ascorbato (vitamina C) e dos tocoferóis (vitamina E) [200,214]. Dessa forma, os resultados aqui encontrados demonstram que provavelmente a atividade antioxidante da fração C do látex de *Hevea brasiliensis* diminuiu o consumo de GSH, mantendo assim sua concentração elevada na pele dos animais irradiados, mesmo frente a um intenso estresse oxidativo, corroborando com os resultados *in vitro* em meio sem células e outros resultados *in vivo* encontrados nesse trabalho.

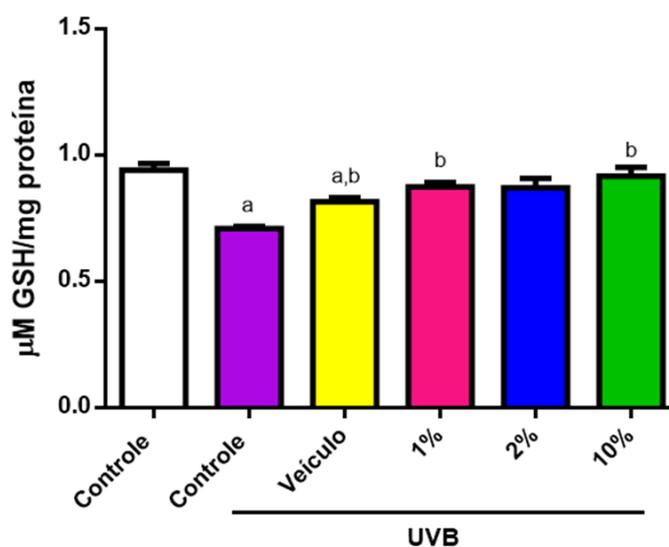


Figura 38. Quantificação dos níveis de glutathione (GSH) em animais não irradiados e irradiados. Os resultados estão apresentados na forma de média \pm DP. ^a Estatisticamente diferente do controle não irradiado. ^b Estatisticamente diferente do controle irradiado. ($p < 0,05$).

Neste trabalho, a peroxidação lipídica no tecido cutâneo foi avaliada pelo teste colorimétrico clássico (TBARS) que quantifica a presença de aldeídos de baixa massa

molecular como o malonaldeído (MDA), que ocorre após a formação de hidroperóxidos lipídicos [215], sendo o MDA o principal indicador de danos oxidativo em lipídios.

A quantificação da lesão acumulativa através da técnica de TBARS mostrou-se significativamente diminuída conforme aumentou-se a concentração de fração C do látex de *H. brasiliensis* no creme dos animais tratados e irradiados. Mostrando, assim, que a peroxidação lipídica foi menor nos animais irradiados e tratados com creme + 10% da fração C de látex, estatisticamente semelhante aos animais não irradiados (figura 39).

Há poucos relatos na literatura de avaliação de estresse oxidativo com látex de *H. brasiliensis*, porém os látex de outras espécies, como *Calotropis procera* [216] e *Euphorbia heliscopia* [217], já foram comprovados como eficientemente antioxidantes. Tinu e colaboradores (2012) [218] avaliaram vários parâmetros de estresse oxidativo em tecido subcutâneo de animais que receberam implantes feitos com látex de *H. brasiliensis* RRIM 600, e também encontraram baixos níveis de MDA, mostrando que o material não elevou o estresse oxidativo ou atuou diretamente como antioxidante no local.

Os resultados sugerem, portanto, uma diminuição na formação de lipoperóxidos após tratamento com a fração C do látex, provavelmente por conta das propriedades antioxidantes da mesma, corroborando com os outros resultados *in vitro* e *in vivo* neste estudo.

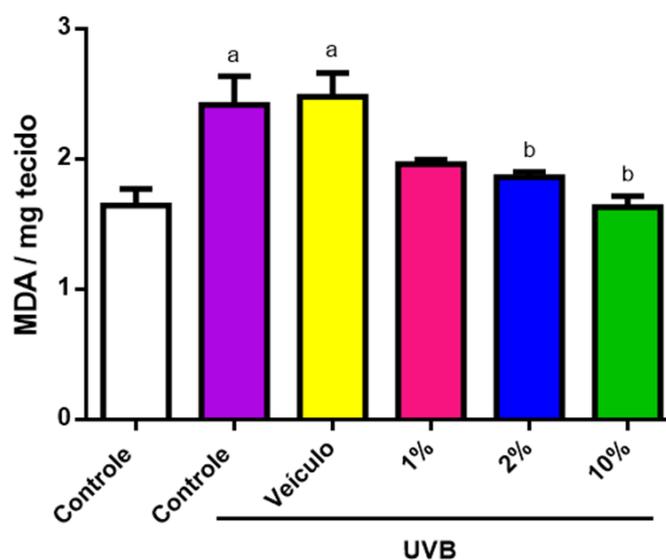


Figura 39. Quantificação dos níveis de malonaldeído (MDA) em animais não irradiados e irradiados. Os resultados estão apresentados na forma de média \pm DP. ^a Estatisticamente diferente do controle não irradiado. ^b Estatisticamente diferente do controle irradiado. ($p < 0,05$).

Em todos os resultados encontrados, pode-se verificar que o veículo também apresentou um determinado grau de proteção contra os efeitos da radiação UV em relação ao estresse oxidativo. Provavelmente, essa proteção aconteceu pela formação de um filme sobre a pele, que pode ter absorvido ou refletido a radiação UV, diminuindo os danos provocados pela irradiação crônica.

Pedrochi (2008) [219] utilizou o mesmo veículo para estudo da penetração de fitofármacos na pele através da espectroscopia fotoacústica, e encontrou que a absorção deste veículo é muito pequena, porém existente. A reflexão do veículo, no entanto, foi semelhante ao de fotoprotetores comerciais.

4.3.3 Análise histopatológica

A radiação UV induz diversas respostas aos danos promovidos pela mesma na pele, como eritema, hiperplasia, queimadura solar, envelhecimento precoce e câncer de pele [220]. Os fótons UVB são mil vezes mais capazes de provocar queimadura solar do que os fótons UVA [221], e a radiação UVB induz a produção de ERO, como HO[•] e ROO[•], já que a energia eletromagnética é transferida da radiação UVB para o oxigênio molecular [218]. A radiação UVB pode ainda permear através da epiderme até a derme, contribuindo com o desenvolvimento de cânceres de pele [222,223].

Na pele, a exposição cumulativa à radiação UV é o fator de risco primário para o desenvolvimento da queratose actínica (AK), a lesão pré-cancerosa derivada de queratinócitos mais comum [224,225]. AK normalmente progride para o carcinoma de células escamosas (SCC), o segundo tipo de câncer de pele não melanoma mais comum [226].

Neste trabalho, os animais que foram cronicamente expostos à radiação UVB desenvolveram AK e/ou SCC. No grupo dos controles não irradiados (figura 40A) é possível observar uma fina camada de epiderme, com a presença de folículos pilosos primitivos. Por outro lado, no grupo dos controles irradiados (figura 40B) e no grupo dos irradiados que foram tratados topicamente apenas com o veículo (figura 40C), a camada epidérmica é bem mais espessa e é possível observar a presença de pontos invasivos, que caracterizam o SCC. O creme de fração C foi capaz de prevenir o desenvolvimento do SCC em todas as concentrações (figuras 40D, 40E e 40F).

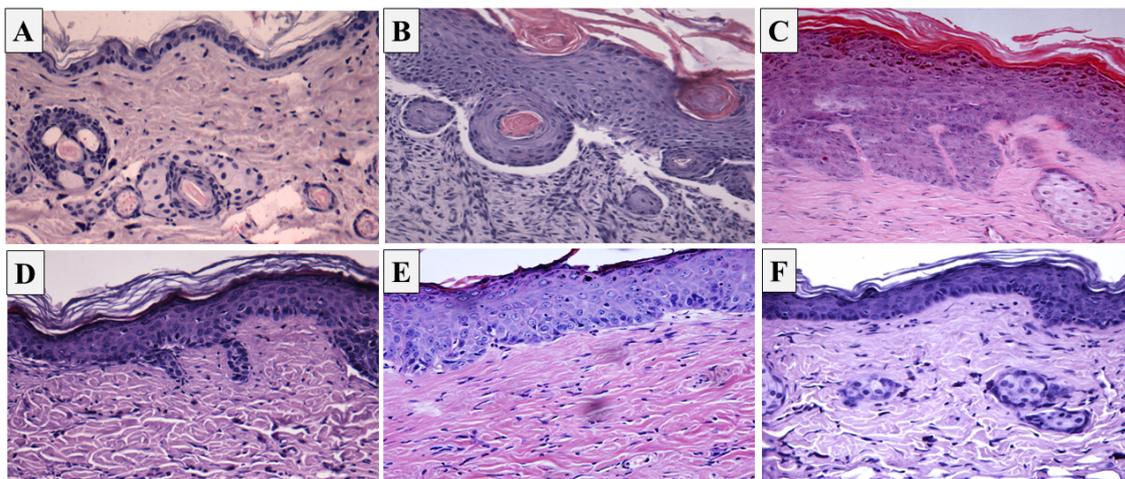


Figura 40. Avaliação histopatológica das lesões induzidas por radiação UVB em camundongos SKH-1. (A) Controle não irradiado, mostrando uma pele normal composta de derme e epiderme formada por uma fina camada. (B) Controle irradiado e (C) grupo tratado com o veículo, mostrando invasão dérmica que caracteriza o carcinoma de células escamosas (SCC). (D) Creme de Fração C 1%, (E) Creme de Fração C 2% e (F) Creme de Fração C 10%, apresentando queratose actínica (AK) com hiperqueratose e células atípicas somente na parte da epiderme em contato com a membrana basal. Coloração H&E. 200x. Os animais foram expostos a $0,228 \text{ mJ/cm}^2$ de radiação UVB por 16 min, 5 dias/semana, por 15 semanas (dose cumulativa = $17,1 \text{ J/cm}^2$).

Os animais do grupo controle irradiado e do grupo dos que foram tratados apenas com o veículo não apresentaram alteração na porcentagem de área com AK (figura 41A), mas apresentaram elevada porcentagem de incidência de SCC (figura 41B) e aumento da espessura epidermal (figura 41C). O tratamento com as diferentes concentrações da fração C do látex da *H. brasiliensis* não preveniu a formação da AK, mas foi capaz de reduzir a espessura da epiderme em todas as concentrações utilizadas, especialmente na concentração de 10%, sugerindo redução na proliferação celular, diminuindo as chances de transformação maligna nessas células [227].

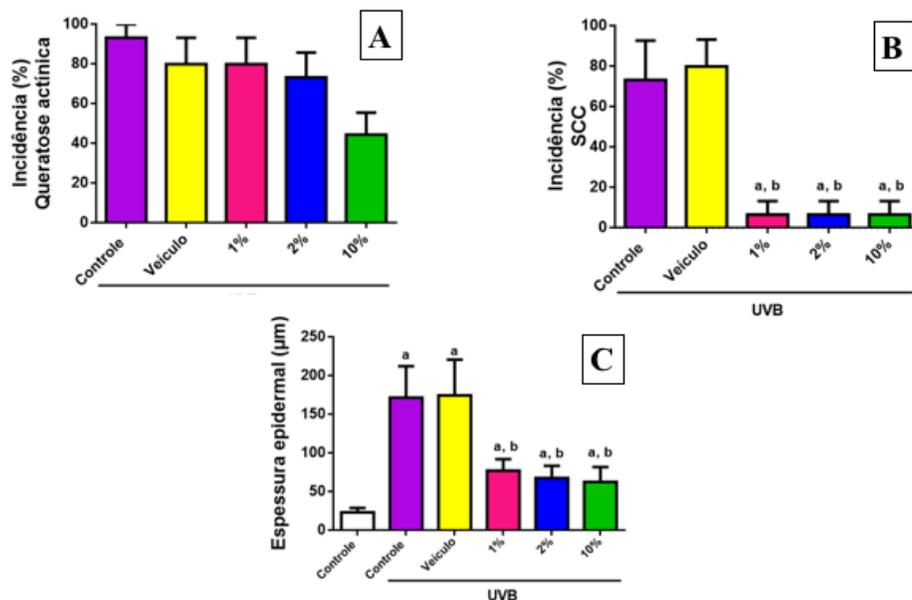


Figura 41. Efeito da fração C do látex de *Hevea brasiliensis* no desenvolvimento de AK e SCC e proliferação epidérmica. (A) Incidência em % de AK e (B) SCC por grupo. (C) Medida da espessura epidérmica de áreas de AK. Os resultados estão como médias \pm DP. ^a Estatisticamente diferente do grupo controle não irradiado e ^b Estatisticamente diferente do grupo controle irradiado. ($p < 0,05$).

E a análise histopatológica mostra que, apesar do veículo apresentar um determinado grau de proteção contra os danos do estresse oxidativo induzidos pela radiação UVB, o mesmo sozinho não foi capaz de prevenir a formação de AK e nem de SCC. Mostrando assim que a maior parte dos efeitos protetores aconteceu devido à fração C do látex de *Hevea brasiliensis*.

5 CONCLUSÕES

Os resultados *in vitro* em meio sem células mostraram que a fração C do látex de *Hevea brasiliensis* é antioxidante, apresentando a capacidade de sequestrar radicais HO[•] e NO[•], e H₂O₂, e apresentando alta capacidade antioxidante total.

Os resultados *in vitro* com as linhagens de células de ovário de hamster chinês (CHO-k1) e células de melanoma murino (B16F10) mostraram que a fração C do látex apresenta seletividade pela linhagem tumoral, reduzindo a proliferação celular e aumentando as taxas de apoptose e necrose nessas células.

Os resultados *in vivo* reafirmaram a capacidade antioxidante da fração C e mostraram que em todas as concentrações a fração C foi capaz de reduzir a queratose actínica (AK) e impedir a formação de carcinoma de células escamosas (SCC) nos animais que foram cronicamente expostos à radiação UVB.

Esses resultados mostram as propriedades terapêuticas da fração C do látex como composto altamente antioxidante e antitumoral, e possível biomaterial componente de um fotoprotetor.

REFERÊNCIAS

- [1] http://www.redetec.org.br/publique/media/tr10_biomateriais.pdf, acessado em 05/02/2016.
- [2] Pires, A. L. R., Bierhalz, A. C. K., Moraes, A. M. 2015. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Química Nova*, 38 (7), 957-971.
- [3] Park, J. B. 1980. *Biomaterials: and introduction*. New York: Plenum Press.
- [4] Tureg, S. L. 1991. *Ortopedia, princípios e aplicações*. Flórida, Manole.
- [5] Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. J. *Biomaterials Science – An Introduction to Materials in Medicine*. Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E., eds, Elsevier: Oxford, 2013, cap. Biomaterials Science: An evolving, Multidisciplinary Endeavor.
- [6] Holzapfel, B. M., Reichert, J. C., Schantz, J. –T., Gbureck, U., Rackwitz, L., Nöth, U. et al. 2013. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (4), 581-603.
- [7] Jacob, J. L., Auzac, J., Prevôt, J. L. 1993. The composition of natural latex from *Hevea brasiliensis*. *Clinical Review in Allergies*, 11, 325-337.
- [8] Yeang, H. Y., Arif, S. A. M., Yusof, F., Sunderasan, E. 2002. Allergenic proteins of natural rubber latex. *Methods*. 27, 32-45.
- [9] Azarkan, M., Amrani, A., Nijs, M., Vandermeers, A., Zerhouni, S., Smolders, N., Looze, Y. 1997. *Carica papaya* latex is a rich source of a class II chitinase. *Phytochemistry*, 46 (8), 1319-1325.
- [10] Nallamsetty, S., Kundu, S., Jagannandham, M. V. 2003. Purification and biochemical characterization of a highly active cysteine proteinase Ervatamin A from latex of *Eryvatamia coronaria*. *Journal of Protein Chemistry*, 22, 1-13.
- [11] Oliveira, J. S., Bezerra, D. P., Freitas, C. D. T., Marinho Filho, J. D. B., Moraes, M. O., Pessoa, C., et al. 2007. *In vitro* cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. *Toxicology in vitro*, 21 (8), 1563-1573.
- [12] Agrawal, A. A., Konno, K. 2009. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology and evolution of plant defense against herbivory. *The annual review of ecology, evolution and systematics*, 40, 311-331.
- [13] Arif, S. A. M., Hamilton, R. G., Yusof, F., Chew, N. P., Loke, Y. H., Nimkar, S. 2004. Isolation and characterization of the early nodule-specific protein homologue (Hev

- b 13), an allergenic lipolytic esterase from *Hevea brasiliensis* latex. The Journal of Biological Chemistry, 279 (3), 23933-23941.
- [14] Archer, B. L., Barnard, D., Cockbain, E. G., Dickenson, P. B., McMullen, A. I. 1963. The chemistry and physics of rubber-like substances. MacLaren & Sons, 43-72.
- [15] Tata, S. J. 1980. Distribution of proteins between the fractions of *Hevea* latex separated by ultracentrifugation. Journal of Rubber Research of Institute of Malaysia, 28 (2), 77-85.
- [16] Bealing, F. J. 1981. Quebrachitol synthesis in *Hevea brasiliensis*. Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia, 29, 111-112.
- [17] Mrué, F. 2000. Neoformação tecidual induzida por biomembranas de latex natural com poli-lisina. Aplicabilidade na neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental com cães. Tese (Doutorado em Medicina, Área: Cirurgia), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 111f.
- [18] Oliveira, J. A. A., Hyppolito, M. A., Coutinho-Netto, J., Mrué, F. 2003. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia, 69, 649-655.
- [19] Mrué, F., Coutinho-Netto, J., Lachat, J. J., Thomazini, J. A., Tambelini, H. 2004. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. Materials Research, 7 (2), 277-283.
- [20] Frade, M. A., Valverde, R. V., de Assis, R. V., Coutinho-Netto, J., Foss, N. T. 2001. Chronic phlebopatic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. International Journal of Dermatology, 40 (3), 238-240.
- [21] Frade, M. A. 2003. Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico do reparo tecidual na presença de biomembranas de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*. Tese (Doutorado em Medicina, Área: Dermatologia), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 164f.
- [22] Moir, G. F. J. 1959. Ultracentrifugation and staining of *Hevea* látex. Nature, 184, 1626-1628.
- [23] Yeang, H. Y. 1988. Characterisation of rubber particle destabilization by B-serum and Bark Sap of *Hevea brasiliensis*. Journal of Natural Rubber Research, 4 (1), 47-55.
- [24] Sunderasan, E., Rahman, N. A. B. D., Lam, K. L., Yang, K. L., Ong, M. T. 2015. Proteins of dialysed C-serum supernatant sub-fractions elicit anti-proliferative activity on human cancer-origin cells. Journal of Rubber Research, 18 (1), 49-59.

- [25] Gomez, J. B., Moir, G. K. J. 1979. The ultracytology of látex vessels in *Hevea brasiliensis*. Monograph No. 4. Malaysian Rubber Research and Development Board, Koala Lumpur.
- [26] Schoon, T. H. G. F., Phoa, K. L. 1956. Morphology of the rubber particles in natural lattices. Archives van der Rubberc 33, 195.
- [27] Ho, C. C., Subramaniam, A., Yong, Y. M. 1976. Lipids associated with the particles in *Hevea* látex. International Rubber Conference, Kuala Lumpur, Vol. II, 441-456.
- [28] Rolland, J. M., O'Hehir, R. E., 2008. Latex allergy: a model for therapy. Clinical and Experimental Allergy, 38, 898-912.
- [29] Yeang, H. Y. 2002. Allergenic proteins of natural rubber latex. Methods, 27, 32-45.
- [30] Yeang, H. Y., Cheong, K. F., Sunderasan, E., Hamzah, S., Chew, N. P., Hamid, S. et al. 1996. The 14.6 kd rubber elongation factor (Hev b 1) and 24 kd (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 98 (3), 628-639.
- [31] Bowler, W. W. 1953. Electrophoretic mobility of fresh *Hevea* latex. Industrial & Engineering Chemistry Research, 45, 1790.
- [32] Nawamawat, K., Sakdapipanich, J. T., Ho, C. C., Ma, Y., Vancso, J. G. 2011, Surface nanostructure of *Hevea brasiliensis* natural rubber latex particles. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 390, 157-166.
- [33] Pendle, T. D., Swinyard, P. E. 1991. The particle size of natural rubber latex concentrates by Photon Correlation Spectroscopy. Journal of Natural Rubber Research, 6 (1), 1-11.
- [34] Kim, A. R., Zou, Y. N., Park, T. H., Shim, K. H., Kim, M. S., Kim, N. D. 2004. Active components from *Artemisia iwayomogi* displaying ONOO⁻ scavenging activity. Phytotherapy Research, 18, 1-7.
- [35] Moharam, B. A., Jantam, I., Jalil, J., Shaari, K. 2010. Inhibitory effect of Phylligenin and Quebrachitol isolated from *Mitrephora vulpine* on platelet activating factor receptor binding and platelet aggregation. Molecules, 15, 7840-7848.
- [36] Rippel, M. M., Lee, L. T., Leite, C. A. P., Galembeck, F. 2003. Skim and cream natural rubber particles: colloidal properties, coalescence and film formation. Journal of Colloid and Interface Science, 268 (2), 330-340.
- [37] Das, G., Alam, B., Raj, S., Dey, S. K., Sethuraj, M. R., Sem-Mandi, S. 2002. Over-exploitation associated changes in free radical and its scavengers in *Hevea brasiliensis*. Journal of Rubber Research, 5 (1), 28-40.

- [38] Daruliza, K. M. A., Lam, K. L., Yang, K. L., Priscilla, J. T., Sunderasan, E., Ong, M. T. 2011. Anti-fungal effect of *Hevea brasiliensis* latex C-serum on *Aspergillus niger*. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 15 (9), 1027-1033.
- [39] Ong, M. T., Yang, K. L., Lam, K. L., Ong, G. A., Sunderasan, E. 2009. Susceptibility of HeLa (cancer origin) cells to a sub-fraction of latex B serum. Journal of Rubber Research, 12, 117-124.
- [40] Lam, K. L., Yang, K. L., Sunderasan, E., Ong, M. T. 2012. Latex C-serum from *Hevea brasiliensis* induces non-apoptotic cell death in hepatocellular carcinoma cell line (HepG2). Cell Proliferation, 45, 577-585.
- [41] Bosch, F. X., Ribes, J., Díaz, M., Cléries, R. 2004. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. Gastroenterology, 127 (5), S5-S16.
- [42] Shao, W., Sui, C., Liu, Z., Yang, J., Zhou, Y. 2011. Surgical outcome of hepatocellular carcinoma patients with biliary tumor thrombi. World Journal of Surgical Oncology, 9, 2-6.
- [43] Southorn, W. A. 1960. Complex particles in *Hevea* latex. Nature, 188, 165-166.
- [44] Dickenson, P. B. 1969. Electron microscopical studies of latex vessel system of *Hevea brasiliensis*. Journal of Rubber Research Institute of Malaysia, 21, 543-559.
- [45] Hamzah, S., Gomez, J. B. 1983. Electron microscopy of ultracentrifuged fractions of *Hevea* latex. II. Bottom fractions. Journal of Rubber Research Institute of Malaysia, 31 (2), 117-129.
- [46] Scherer, D., Kumar, R. 2010. Genetics of pigmentation in skin cancer – a review. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 705 (2), 141-153.
- [47] Payette, M. J., Qhalen, J., Grant-Kels, M. 2010. Nutrition and nonmelanoma skin cancers. Clinics in Dermatology, 28, 650-662.
- [48] Wölfle, U., Esser, P., Simon-Haarhaus, B., Martin, S. F., Lademann, J., Schempp, C. M. 2011. UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin *in vitro* and *in vivo*. Free Radical Biology and Medicine, 50 (9), 1081-1093.
- [49] Junqueira, L. C., Carneiro, J. 2008. Histologia Básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 364.
- [50] Monzon, J. G., Dancy, J. 2012. Targeted agents for the treatment of metastatic melanoma. Journal of OncoTargets and Therapy, 5, 31-46.
- [51] Liang, C. H., Wang, G. H., Chou, T. H., Wang, S. H., Lin, R. J., Chan, L. P. et al. 2012. 5-epi-Sinuleptolide induces cell cycle arrest and apoptosis through tumor necrosis

- factor/mitochondria-mediated caspase signaling pathway in human skin cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, 1820 (7), 1149-1157.
- [52] Athar, M., Walsh, S. B., Kopelovich, L., Elmet, C. A. 2011. Pathogenesis of nonmelanoma skin cancers in organ transplant recipients. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 508 (2), 159-163.
- [53] Gilmour, S. K. 2007. Polyamines and nonmelanoma skin cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 224, 249-256.
- [54] Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2011.
- [55] Harris, M. I. C., 2005. *Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento*. 2 ed. São Paulo: SENAC.
- [56] Kvam, E., Dahle, J. 2003. Pigmented melanocytes are protected against ultraviolet-A-induced membrane damage. *Journal of Investigative Dermatology*, 121, 564-569.
- [57] Peres, P. S., Terra, V. A., Guarnier, R., Cecchini, R., Cecchini, A. L. 2011. Photoaging and chronological aging profile: understanding oxidation of the skin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 103, 93-97.
- [58] Birch-Machin, M. A., Swalwell, H. 2010. How mitochondria record the effects of UV exposure and oxidative stress using human skin as a model of tissue. *Mutagenese*, 25 (2), 101-107.
- [59] Podda, M., Traber, M. G., Weber, C., Yan, L. J., Packer, L. 1998. UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. *Free Radical Biology and Medicine*, 24 (1), 55-65.
- [60] Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Pasquale, A. de, Uccella, N., Barbuzzi, T. et al. 2000. *In vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *International Journal of Pharmaceutics*, 199 (1), 39-47.
- [61] Moore, J. O., Palep, S. R., Saladl, R. N., Gao, D., Wang, Y., Phelps, R. G. et al., 2004. Effects of ultraviolet B exposure on the expression of proliferating cell nuclear antigen in murine skin. *Photochemistry and Photobiology*, 80 (3), 587-595.
- [62] Clydesdale, G. J., Dandie, G. W., Muller, H. K. 2001. Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. *Immunology and Cell Biology*, 79 (6), 547-568.
- [63] Armstrong, B. K., Kricger, A. 2001. The epidemiology of UV induced skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology B*, 63, 8-18.

- [64] Guaratini, T., Medeiros, M. H. G., Colepicolo, P. 2007. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. *Química Nova*, 30, 206-213.
- [65] Wei, H., Cai, Q., Rahn, R., Xueshu, Z. 1997. Singlet oxygen involvement in ultravioleta (254 nm) radiation-induced formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 23 (1), 148-154.
- [66] Zhang, X., Rosenstein, B. S., Wang, Y., Lebwohl, M., Mitchell, D. M., Wei, H. 1997. Induction of 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by ultraviolet radiation in calf thymus DNA and HeLa cells. *Photochemistry and Photobiology*, 65 (1), 119-124.
- [67] Kohen, R. 1999. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress – New approaches for their evaluation. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 53, 181-192.
- [68] Kohen, R., Gati, I. 2000. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. *Toxicology*, 148, 149-157.
- [69] Bickers, D. R., Athar, M. 2006. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *Journal of Investigative Dermatology*, 126, 2565-2575.
- [70] Bäckvall, H., Asplund, A., Gustafsson, A., Sivertsson, Å., Lundeberg, J., Ponten, F. 2005. Genetic tumor archeology: microdissection and genetic heterogeneity in squamous and basal cell carcinoma. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571, 65-79.
- [71] Chinem, V. P., Miot, H. A. 2011. Epidemiology of basal cell carcinoma. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86 (2), 292-305.
- [72] Byekova, Y. A., Herrmann, J. L., Xu, J., Elmets, C. A., Athar, M. 2011. Liver kinase B1 (LKB1) in the pathogenesis of UVB-induced murine basal cell carcinoma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 508 (2), 204-211.
- [73] Arora, A., Attwood, J. 2009. Common skin cancers and their precursors. *Surgical Clinics of North America*, 89 (3), 703-712.
- [74] Tsatsou, F., Trakatelli, M., Patsatsi, A., Kalokasidis, K., Sotiriadis, D. 2012. Extrinsic aging: UV-mediated skin carcinogenesis. *Dermato-Endocrinology*, 4 (3), 285-297.
- [75] McGuire, J. F., Ge, N. N., Dyson, S. 2009. Nonmelanoma skin cancer of the head and neck: histopathology and clinical behavior. *American Journal of Otolaryngology*, 30 (2), 121-133.
- [76] Garcia-Zuazaga, J., Olbricht, S. M. 2008. Cutaneous squamous cell carcinoma. *Advances in dermatology*, 24, 33-57.

-
- [77] Slominski, A., Ross, J., Mihm, M. C. 1995. Cutaneous melanoma: pathology, relevant prognostic indicators and progression. *British Medical Bulletin*, 51, 548-569.
- [78] Jimbow, K., Quevedo, W. C., Fitzpatrick, T. B., Szabó, G. 1993. Biology of melanocytes. In: Fitzpatrick, T. B. et al., editors. *Dermatology in general medicina*. 4th ed. New York: MacGraw-Hill, p. 261-289.
- [79] Ellison, D. W., Beal, M. F., Martin, J. B. 1987. Phosphoethanolamine and ethanolamine are decreased in Alzheimer's disease and Huntington's disease. *Brain Research*, 417, 389-392.
- [80] Balch, C. M., Buzaid, A. C., Soong, S. J. 2001. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 19, 3635-3648.
- [81] Elder, D. 1999. Tumor progression, early diagnosis and prognosis of melanoma. *Acta Oncologica*, 38, 535-547.
- [82] Meier, F., Satyamoorthy, K., Nesbit, M., Hsu, M. Y., Schitteck, B., Garbe, C., Herlyn, M. 1998. Molecular events in melanoma development and progression. *Frontiers in Bioscience*, 15, 1005-1010.
- [83] Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., David, J. P. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29 (1), 113-123.
- [84] Halliwell, B. 1999. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and effects of nutrition. *Mutation Research*, 443 (1-2), 37-52.
- [85] Pospíšil, P., Prasad, A., Rác, M. 2014. Role of reactive oxygen species in ultra-weak photon emission in biological systems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 139, 11-23.
- [86] Fanjul-Moles, M. L., López-Riquelme, G. O. 2016. Relationship between oxidative stress, circadian rhythms, and AMD. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-18.
- [87] Halliwell, B., Gutteridge, J. M., Cross, C. E. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119 (6), 598-620.
- [88] Evans, M. D., Dizdaroglu, M., Cooke, M. S. 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 567 (1), 1-61.

- [89] Berger, P., Leitner, N. K. V., Dore, M., Legube, B. 1999. Ozone and hydroxyl radicals induced oxidation of glycine. *Water Research*, 33 (2), 433-441.
- [90] Halliwell, B., Clement, M. V., Long, L. H. 2000. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, 486, 10-13.
- [91] Tamir, S., Tannenbaum, S. R. 1996. The role of nitric oxide (NO[•]) in the carcinogenic process. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1288, F31-F36.
- [92] Eiserich, J. P., Cross, C. E., Jones, A. D., Halliwell, B., Vliet, A. van der. 1996. Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 19199-19208.
- [93] Halliwell, B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1147-1150.
- [94] Sies, H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 30 (91), 31S-38S.
- [95] Halliwell, B. 2000. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovascular Research*, 47, 410-418.
- [96] Okado-Matsumoto, A., Fridovich, I. 2001. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver. Cu, Zn-SOD in mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (42), 38388-38393.
- [97] Watanabe, K., Shibuya, S., Ozawa, Y., Nojiri, H., Izuo, N., Yokote, K., Shimizu, T. 2014. Superoxide dismutase 1 loss disturbs intracellular redox signaling, resulting in global age-related pathological changes. *BioMed Research International*, 1-10.
- [98] Arai, T., Sugawara, M., Sako, T., Motoyoshi, S., Shimura, T., Tsutsui, N., Konno, T. 1994. Glutathione peroxidase activity in tissues of chickens supplemented with dietary selenium. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 107A, 245-248.
- [99] Daun, C., Akesson, B. 2004. Comparison of glutathione peroxidase activity, and of total and soluble selenium content in two muscles from chicken, turkey, duck, ostrich and lamb. *Food Chemistry*, 85, 295-303.
- [100] Stagsted, J. 2006. Absence of both glutathione peroxidase activity and glutathione in bovine milk. *International Dairy Journal*, 16, 662-668.
- [101] Chung-Man, H. J., Zheng, S., Comhair, S. A., Farver, C., Erzurum, S. C. 2001. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Research*, 61, 8578-8585.
- [102] Forman, H. J., Zhang, H., Rinna, A. 2009. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30, 1-12.

- [103] Aquilano, K., Baldelli, S., Ciriolo, M. R. 2014. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 1-12.
- [104] Dickinson, D. A., Forman, H. J. 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 64, 1019-1026.
- [105] Halliwell, B. 1999. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? *Trends in Biochemical Sciences*, 24 (7), 255-259.
- [106] Buettner, G. R. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300 (2), 535-543.
- [107] Theriault, A., Chao, J. T., Wang, Q., Gapor, A., Adeli, K. 1999. Tocotrienol: a review of its therapeutic potential. *Clinical Biochemistry*, 32 (5), 309-319.
- [108] Jacob, R. A. 1995. The integrated antioxidant system. *Nutrition Research*, 15 (5), 755-766.
- [109] Burri, B. J. 1997. Beta-carotene and human health: a review of current research. *Nutrition Research*, 17, 547-580.
- [110] Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2 (4), 152-159.
- [111] Cao, G., Sofic, E., Prior, R. 1997. Antioxidant and Prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22 (5), 749-760.
- [112] Arora, A., Byrem, T. M., Nair, M. G., Strasburg, G. M. 2000. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373 (1), 102-109.
- [113] Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., LLeonart, M. E. 2013. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Research Reviews*, 12, 376-390.
- [114] Muller, J. M., Cahill, M. A., Rupec, R. A., Baeuerle, P. A., Nordheim, A. 1997. Antioxidants as well as oxidants activate c-fos via Ras-dependent activation of extracellular-signal-regulated kinase 2 and Elk-1. *European Journal of Biochemistry*, 244, 45-52.
- [115] Pennington, J. D., Wang, T. J., Nguyen, P., Sun, L., Bisht, K., Smart, D., Gius, D. 2005. Redox-sensitive signaling factors as a novel molecular targets for cancer therapy. *Drug Resistance Updates*, 8, 322-330.
- [116] D'Souza, R. J., Phillips, H. M., Jones, P. W., Strange, R. C., Aber, G. M. 1993. Interactions of hydrogen peroxide with interleukin-6 and platelet-derived growth factor

in determining mesangial cell growth: effect of repeated oxidant stress. *Clinical Science*, 85, 747-751.

[117] Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., Aggarwal, B. B. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology & Medicine* 49, 1603-1616.

[118] Los, M., Maddika, S. Erb, B., Schulze-Osthoff, K. 2009. Switching Akt: from survival signaling to deadly response. *Bioessays*, 31, 492-495.

[119] Kundu, N., Zhang, S., Fulton, A. M. 1995. Sublethal oxidative stress inhibits tumor cell adhesion and enhances experimental metastasis of murine mammary carcinoma. *Clinical and Experimental Metastasis*, 13, 16-22.

[120] Roebuck, K. A. 1999. Oxidative stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NK-kappaB (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 4, 223-230.

[121] Folkman, J. 1985. Tumor angiogenesis. *Advances in Cancer Research*, 43, 175-203.

[122] Monte, M., Davel, L. E., Sacerdote de Lusting, E. 1997. Hydrogen peroxide is involved in lymphocyte activation mechanisms to induce angiogenesis. *European Journal of Cancer*, 33, 676-682.

[123] Guaratini, T., Callejon, D. R., Pires, D. C., Lopes, J. N. C., Lima, L. M., Gianella Neto, D. et al. 2009. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de Mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. *Química Nova*, 32, 717-721.

[124] Palm, M. D., O'donoghue, M. N. 2007. Update on photoprotection. *Dermatologic Therapy*, 20, 360-376.

[125] González, S., Fernández-Iorente, M., Gilaberte-Calzada, Y. 2008. The latest on skin photoprotection. *Clinics in Dermatology*, 26, 614-626.

[126] Lautenschlager, S., Wulf, H. C., Pittelkow, M. R. 2007. Photoprotection. *The Lancet*, 370, 528-537.

[127] Baron, E. D., Kirkland, E. B., Domingo, D. S. 2008. Advances in Photoprotection. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 20, 265-272.

[128] Balogh, T. S., Velasco, M. V. R., Pedriali, C. A., Kaneko, T. M., Baby, A. R. 2011. Proteção à radiação ultraviolet: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86 (4), 732-742.

- [129] Chorilli, M., Udo, M. S., Rodrigues, L. A. P., Cavallini, M. E., Leonardi, G. R. 2009. Avaliação sensorial de formulações fotoprotetoras contendo filtro solar de amplo espectro. *Latin American Journal of Pharmacy*, 28 (3), p. 383-392.
- [130] Tofetti, M. H. F. C., Oliveira, V. R. 2006. A importância do uso de filtro solar na prevenção do fotoenvelhecimento e do câncer de pele. *Revista Científica da Universidade de Franca*, 6, 59-66.
- [131] Milesi, S. S., Guterres, S. S. 2002. Fatores determinantes da eficácia de fotoprotetores. *Caderno de Farmácia*, 18, 81-87.
- [132] Gálvez, M. V. 2010. Antioxidantes en fotoprotección, realmente funcionan? *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 101, 197-200.
- [133] Wang, S. Q., Balagula, Y., Osterwalder, U. 2010. Photoprotection: a review of the current and future technologies. *Dermatologic Therapy*, 23, 31-47.
- [134] Guaratini, T., Vessecchi, R. L., Lavarda, F. C., Maia Campos, P. M. B. G., Naal, Z., Gates, P. J., Lopes, N. P. 2004. New chemical evidence for the ability to generate radical molecular ions of polyenes from ESI and HR-MALDI mass spectrometry. *Analyst*, 129, 1223-1226.
- [135] Takahashi, T., Yokoo, Y., Inoue, T., Ishii, A. 1999. Toxicological studies on Procyanidin B-2 for external application as a hair growing agent. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 545-554.
- [136] Smirnoff, N., Cumbes, Q. J. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28 (4), 1057-1060.
- [137] Liu, W., Wang, H., Pang, X., Yao, W., Gao, X. 2010. Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 451-457.
- [138] Marcocci, L., Maguire, J. J., Droy-Lefaix, M. T., Parker, L. 1994. The nitric oxide radical scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Radiation Physics and Chemistry*, 59, 387-392.
- [139] Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337-341.
- [140] Suzanek, S. J. 1983. Doxorubicin therapy in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 182, 70-72.

- [141] Gewirtz, D. A. 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics Adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 57, 727-741.
- [142] Singal, P. K., Iliskovic, N. 1998. Adriamycin cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*, 339, 900-905.
- [143] Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- [144] Singh, N. P., McCoy, M. T. Tice, R. R., Schneider, E. L. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.
- [145] Speit, G., Hatmann, A. 1999. The comet assay (single cell gel test) – a sensitive genotoxicity test for detection of DNA damage and repair. In: *Methods in Molecular Biology* (Henderson, D. S. eds), 113 DNA-repair protocols: eukaryotic systems. Human Press Inc., 203-212.
- [146] Manoharan, K.; Banerjee, M. R. 1985. β -carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biology International Reports*, 9, 783-789.
- [147] Carminati, P. O. 2005. Respostas celulares aos danos causados pelo antitumoral cisplatina em linhagens de fibroblastos humanos normais (MRC-5) e astrocítica (U343 MG-a). Dissertação (Mestrado em Ciências, área: Genética), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 74f.
- [148] Hu, M. L. 1994. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods in Enzymology*, 233, 380-385.
- [149] Victorino, V. J., Panis, C., Campos, F. C., Cayres, R. C., Colado-Simão, A. N., Oliveira, S. R., et al. 2013. Decreased oxidant profile and increased antioxidante capacity in naturally postmenopausal woman. *AGE*, 35, 1411-1421.
- [150] Lowry, O. H., Rosenbrought, N. S., Farr, A. L. et al. 1951. Protein measurement with folin plenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- [151] Miller, G. L. 1959. Protein determination for large number of samples. *Analytical Chemistry*, 31, 964.
- [152] Burns, E. M., Tober, K. L., Riggenbach, J. A., Schick, J. S., Lamping, K. N., Kusewitt, D. F. et al. 2012. Preventative topical diclofenac treatment differentially

decreases tumor burden in male and female Skh-1 mice in a model of UVB-induced cutaneous squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 34 (2), 370-377.

[153] Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.

[154] Panis, C., Herrera, A., Victorino, V. J., Campos, F. C., Freitas, L. F., Rossi, T. de et al. 2012. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast cancer research and treatment*, 133, 89-97.

[155] Tietze, F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical biochemistry*, 27 (3), 502-522.

[156] Peres, P. S., Terra, V. A., Guarnier, F. A., Cecchini, R., Cecchini, A. L. 2011. Photoaging and chronological aging profile: understanding oxidation of the skin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 103, 93-97.

[157] Repetto, M., Reides, C., Carretero, M. L. G., Costa, M., Griemberg, G., Llesuy, S. 1996. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clinica Chimica Acta*, 255, 107-117.

[158] Cohen, G., Dembiec, D., Marcus, J. 1970. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 34, 30-38.

[159] Oliveira, F. J. A., Cecchini, R. 2002. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) chagasi*. *Journal of Parasitology*, 86 (5), 1067-1072.

[160] Koyuncuer, A. 2014. Histopathological evaluation of nonmelanoma skin cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 12, 159.

[161] McGuire, J. F., Norman, G., Dyson, S. 2009. Nonmelanoma skin cancer of the head and neck I: histopathology and clinical behavior. *American Journal of Otolaryngology*, 30, 121-133.

[162] Kraf, S., Granter, S. R. 2014. Molecular pathology of skin neoplasms of the head and neck. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 138, 759-787.

[163] Dodds, A., Chia, A., Schumack, S. 2014. Actinic keratosis: rationale and management. *Dermatology and Therapy*, 4, 11-31.

[164] Siroerol, J. A., Feddi F., Mena, S., et al. 2015. Topical treatment with pterostilbene, a natural phytoalexin, effectively protects hairless mice against UVB radiation-induced skin damage and carcinogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 85, 1-11.

[165] Altman, R. F. 1948. Natural vulcanization accelerator in *Hevea* latex. *Rubber Chemistry and Technology*, 21 (4), 853-859.

- [166] Bevilacqua, E. M. 1954. Natural antioxidants of *Hevea* latex. *Science*, 120, 1106.
- [167] Nadarajah, M., Tirimanne, A. S. L., Coomarasamy, A., Kasinathan, S. 1971. Some naturally occurring antioxidants in *Hevea brasiliensis* latex. *Quarterly Journal Rubber Research Institute of Ceylon*, 48, 202-211.
- [168] Musigamart, N., Liengprayoon, S., Sriroth, K., Dubreucq, E., Lecomte, J., Vaysse, L. 2014. A rapid quantitative analysis of native antioxidants in natural rubber (*Hevea brasiliensis*) during maturation. *Advanced Materials Research*, 844, 410-416.
- [169] Soysuwan, W. 2009. Antioxidant from *Hevea brasiliensis* latex serum. Dissertação de Mestrado, Prince of Songkla University, Tailândia, 65f.
- [170] Amnuakit, T., Boonme, P. 2014. Encapsulating *Hevea brasiliensis* for improved antioxidant penetration. *Cosmetics and Toiletries*, 129 (3), 38-42.
- [171] Siritwong, S., Rungvichaniwat, A., Klinpituksa, P., Musa, K. H., Abdullah, A. 2015. Quantitative analysis of total phenolic contents and antioxidant activity of fresh field natural rubber latex. *Macromolecular Symposia*, 354, 265-272.
- [172] Gupta, J., Gupta, A., Gupta, A. K. 2015. Extraction and identification of flavonoid natural antioxidant in the leaves of *Rauwolfia serpentina*. *International Journal of Chemical Studies*, 3 (1), 35-37.
- [173] Pacher, P., Beckman, J. S., Liaudet, L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87 (1), 315-424.
- [174] Serpeloni, J. M. 2012. Atividade antígeno-tóxica de compostos da dieta e sua influência na expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo. Tese (Doutorado em Ciências, Área: Toxicologia), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 127f.
- [175] Speit, G.; Rothfuss, A. 2012. The Comet Assay: A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *DNA Repair Protocols, Methods in Molecular Biology*, 920, 79-90.
- [176] Floriano, J. F., Mota, L. S. L. S., Furtado, E. L., Rossetto, V. J. V., Fraeff, C. F. O. 2014. Biocompatibility studies of natural rubber latex from different tree clones and collection methods. *Journal of Materials Science*, 25, 461-470.
- [177] Tice, R. R., Strauss, G. H. 1995. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells*, 13, 207-214.
- [178] Norbury, C. J., Zhivotovsky, B. 2004. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, 23 (16), 2797-2808.

- [179] Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R., Sinigaglia, E., Sinha, A. A., Natale, C. et al. 2002. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *International Journal of Oncology*, 21 (1), 165-170.
- [180] Bohm, I., Schild, H. 2003. Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Molecular Imaging and Biology*, 5 (1), 2-14.
- [181] Zimmermann, K. C., Green, D. R. 2001. How cells die: apoptosis pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108 (4 Suppl), S99-S103.
- [182] Ziegler, U., Groscurth, P. 2004. Morphological features of cell death. *News in Physiological Science*, 19, 124-128.
- [183] Keppler, D. 2006. Towards novel strategies based on cystatin function. *Cancer Letters*, 235, 159-176.
- [184] De Mejia, E. G., Dia, V. P. 2010. The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis and metastasis of cancer cells. *Cancer and Metastasis Review*, 29, 511-528.
- [185] de Haan-Homans, L. 1950. Oxidation process in latex of *Hevea brasiliensis*. *Rubber Chemistry and Technology*, 23, 858-873.
- [186] Tata, S. J., Edwin, E. E. 1970. *Hevea* latex enzymes detected by zymogram technique after starch gel electrophoresis. *Journal of Rubber Research Institute of Malaysia*, 23, 12.
- [187] Coupé, M., Pujarnisclé, S., d'Auzac, J. 1972. Compartimentation de diverses oxydo-réductases (peroxidase, o-diphenol-oxydase et malate dehydrogenase) dans le latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth) Muell Arg. *Physiologie Végétale*, 10, 459-464.
- [188] Zhang, Y., Leclercq, J., Montoro, P. 2016. Reactive oxygen species in *Hevea brasiliensis* latex and relevance to Tapping Panel Dryness. *Tree Physiology* 00, 1-9.
- [189] Michels, A., Yu, D., Frei, B. 2016. Selective delivery of copper enhances cytotoxicity of millimolar concentrations of ascorbate towards cancer cells. *The FASEB Journal*, 29.
- [190] Jacobs, J. M., Adkins, J. N., Qian, W. J., Liu, T., Shen, Y., Camp, D. G. 2nd, Smith, R. D. 2005. Utilizing human blood plasma for proteomic biomarker discovery. *Journal of Proteome Research*, 4 (4), 1073-1085.
- [191] Martins, M. A. S. S. 1995. O eritrócito como indicador de stress *in vivo* no exercício físico e nas doenças cardiovasculares. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Farmácia), Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto – Portugal, 236f.

- [192] Shindo, Y., Witt, E., Han, D., Packer, L. 1994. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 102, 470-475.
- [193] Rhie, G. E., Seo, J. Y., Chung, J. H. 2001. Modulation of catalase in human skin *in vivo* by acute and chronic UV radiation. *Molecules and Cells*, 11, 399-404.
- [194] Svobodová Rajnochová, A., Galandáková, A., Šianská, J., Doležal, D., Ulrichová, J., Vostálová, J. 2011. Acute exposure to solar simulated ultraviolet radiation affects oxidative stress-related biomarkers in skin, liver and blood of hairless mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34, 471-479.
- [195] Svobodová Rajnochová, A., Galandáková, A., Palíková, I., Doležal, D., Kylarová, D., Ulrichová, J., Vostálová, J. 2013. Effects of oral administration of *Lonicera caerulea* berries on UVB-induced damage in SKH-1 mice. A pilot study. *Photochemical & Photobiological Science*, 12, 1830-1841.
- [196] Gonzales Maglio, D. H., Paz, M. L., Ferrari, A., Weill, F. S., Czerniczyniec, A., Leoni, J., Bustamante, J. 2005. Skin damage and mitochondrial dysfunction after acute ultraviolet B irradiation: relationship with nitric oxide production. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 21, 311-317.
- [197] Foote, S. C. 1982. Light, oxygen and toxicity. In: Autor, A, ed. *Pathology of oxygen*. San Diego: Academic Press, 1982, 21-44.
- [198] Heck, D. E., Vetrano, A. M., Mariano, T. M., Laskin, J. D. 2003. UVB light stimulates production of reactive oxygen species. Unexpected role for catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 22432-22436.
- [199] Martin, J. P., Burch, P. 1990. Production of oxygen radicals by photosensitization. *Methods in Enzymology*, 186, 635-645.
- [200] Jantschko, W., Furtmüller, P. G., Zederbauer, M., Neugschwandtner, K., Lehner, I., Jakopitsch, C. et al. 2005. Exploitation of the unusual thermodynamic properties of human myeloperoxidase in inhibitor design. *Biochemical Pharmacology*, 69, 1149-1157.
- [201] Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.
- [202] Fonseca, Y. M., Catini, C. D., Vicentini, F. T. M. C., Cardoso, J. C., Albuquerque Junior, R. L. C. 2011. Efficacy of marigold extract-loaded formulations against UV-induced oxidative stress. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100 (6), 2182-2193.

- [203] Widyarini, S., Spinks, N., Husband, A. J., Reeve, V. E. 2001. Isoflavonoid compounds from red clover (*Trifolium pratense*) protect from inflammation and immune suppression induced by UV radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 74, 465-470.
- [204] Kvietys, P. R., Granger, D. N. 2012. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radical Biology & Medicine*, 52, 556-592.
- [205] Andrade, T. A. M. 2012. Modificações teciduais e mecanismos de ação da fração F1 do latex da seringueira *Hevea brasiliensis* na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos diabéticos. Tese (Doutorado em Ciências Médicas, Área: Investigação Biomédica), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 185f.
- [206] Guaratini, T., Medeiros, M. H. G., Colepicolo. 2007. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. *Química Nova*, 30, 206-213.
- [207] Kohen, R., Fanberstein, D., Tirosh, O. 1997. Reducing equivalents in the aging process. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 24 (2), 103-123.
- [208] Fridovich, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology*, 201, 1203-1208.
- [209] Sullivan, N. J., Tober, K. L., Burns, E. M., Schick, J. S., Riggenbach, J. A., Mace, T. A. et al. 2012. Ultraviolet Light B-Mediated inhibition of skin catalase activity promotes Gr-1⁺CD11b⁺ Myeloid cell expansion. *Journal of Investigative Dermatology*, 123, 695-702.
- [210] Huber, P. C., Almeida, W. P., Fátima, A. 2008. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31 (5), 1170-1179.
- [211] Lee, S. C., Lee, J. W., Jung, J. E., Lee, H. W., Chun, S. D., Kang, I. L. et al. 2000. Protective role of nitric oxide-mediated inflammatory response against lipid peroxidation in ultraviolet B-irradiated skin. *British Journal of Dermatology*, 142, 653-659.
- [212] Wheeler, L. A., Aswad, A., Connor, M. J., Lowe, N. 1986. Depletion of cutaneous glutathione and the induction of inflammation by 8-methoxypsoralen plus UVA radiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 87, 658-662.
- [213] Hanada, K., Gange, R. W., Connor, M. J. 1991. Effect of glutathione depletion on sunburn cell formation in the hairless mouse. *Journal of Investigative Dermatology*, 96, 838-840.

- [214] Carini, M., Aldini, G., Piccone, M., Facino, R. M. 2000. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. *Il Farmaco*, 55, 526-534.
- [215] Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 2007. *Free Radicals in biology and medicine*. 4 ed. New York: Oxford.
- [216] Padhy, B. M., Srivastava, A., Kumar, V. L. 2007. *Calotropis procera* affords protection against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 1480-1485.
- [217] Saleem, U., Ahmad, B., Ahmad, M., Hussain, K., Bukhari, N. I. 2014. Investigation of *in vivo* antioxidant activity of *Euphorbia helioscopia* and leaves methanol extract: a target against oxidative stress induced toxicity. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7, 369-375.
- [218] Tinu, S. K., Anjana Vaman, V. S., Arun, M., Geetha, C. S., Mohanan, P. V. 2012. Effect of latex material on antioxidant enzymes, lipid peroxidation, DNA damage, and chromosomal aberration. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94 (4), 713-731.
- [219] Pedrochi, F. 2008. Aplicação de técnicas fototérmicas no estudo de biomateriais. Tese (Doutorado em Física), Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 113f.
- [220] Hu, Y., Ma, Y., Wu, S., et al. 2016. Protective effect of Cyanidin-3-O-Glucoside against ultraviolet B radiation-induced cell damage in human HaCat keratinocytes. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 301.
- [221] Svobodova, A., Psotova, J., Walterova, D. 2003. Natural phenolic in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czechoslovakia Republic*, 147, 137-145.
- [222] Amaral, S., Redmann, K., Sanchez, V., et al. 2013. UVB irradiation as a tool to assess ROS-induced damage in human spermatozoa. *Andrology*, 1, 707-714.
- [223] Lee, C. H., Wu, S. B., Hong, C. H., et al. 2013. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis and its effects on skin residential cells: the implication in UV-based phototherapy. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 6414-6435.
- [224] Rogers, H. W., Weinstock M. A., Harris, A. R., et al. 2010. Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer in the United States, 2006. *Archives of Dermatology* 146, 283-287.
- [225] Salasche, S. J. 2000. Epidemiology of actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42, 4-7.

-
- [226] Ratushny, V., Gober, M. D., Hick, R., et al. 2012. From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Investigation*, 122, 464-472.
- [227] Czifra, G., Szöllösi, A., Nagy, Z., et al. 2015. Protein C δ promotes proliferation and induces malignant transformation in skeletal muscle. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19, 396-407.

ANEXOS



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 139/2015

Londrina, 21 de Julho de 2015.

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UEL reunida em 19 de Maio de 2015 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Modelo experimental de carcinoma espinocelular de pele: Screening biológico de substâncias quimioprotetoras e perfil oxidativo local/sistêmico**", registrado sob o processo CEUA nº6738.2015.40, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 112 camundongos Hairless (56 machos e 56 fêmeas), com idade entre 8 e 20 semanas, pesando de 20 a 30 g e provenientes da Universidade de São Paulo - USP. O projeto tem como objetivo avaliar *in vivo* o efeito quimioprotetor do citral e da metformina na promoção do câncer de pele não melanoma. Para tanto, os animais serão divididos em grupos e tratados com uma dose diária de metformina (40mg/ mL, 50µL, intraperitoneal) ou PBS (50µL, i.p.) antes da irradiação, assim como nos dias remanescentes da semana, durante as 15 semanas. Os camundongos serão submetidos à irradiação UVB para o desenvolvimento de câncer de pele não-melanoma para a caracterização de biomarcadores oxidativos no sangue e de crescimento celular no tecido tumoral. As análises serão realizadas na pele e no sangue dos animais expostos à irradiação, as lesões com margem serão analisadas por histopatologia e processadas para pesquisa de estresse oxidativo e nitrosativo e a análise de 3-nitrotirosina será feita por imunohistoquímica do tecido tumoral e da margem normal do tecido para verificar a participação de espécies reativas de oxigênio *in situ*. Os protocolos experimentais estão aprovados com previsão para execução em 10 meses.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Waldiceu Ap. Verrini Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verrini Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani

Coordenadora do Projeto
Departamento de Ciências Patológicas
Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Sra. Edilamar dos Anjos (Chefe da DCA/PROPPG), Chefe do Departamento de Ciências Patológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas.

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380 - Fone (043) 3371-4000 FAX - Fone 3328-4440 - Caixa Postal 10.011 - CEP 86057-970 - Internet <http://www.uel.br>
LONDRINA - PARANÁ - BRASIL