



Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição
Laboratório de Bioquímica Metabólica



**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO LICOPENO E A
INFLUÊNCIA DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE PKC NA PRODUÇÃO DE
EROS EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA SK-HEP-1**

TALITA PRATO DA SILVA

Ouro Preto
Março/2015



UFOP
Universidade Federal
de Ouro Preto



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Nutrição – ENUT
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição



ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte e sete dias do mês de março de dois mil e quinze, às treze horas e trinta minutos, no Auditório da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, realizou-se a Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna **Talita Prato da Silva**. A Banca Examinadora, definida anteriormente, foi composta pelos Professores Lisandra Brandino de Oliveira (UFOP), Mauro Cesar Isoldi (UFOP), Daniela Caldeira Costa (UFOP) e Frank Silva Bezerra (UFOP). Dando início ao exame, a aluna apresentou sua dissertação de mestrado intitulada: **“Avaliação do potencial antioxidante do licopeno e a influência da via de sinalização de PKC na produção de ERO’s em células de hepatocarcinoma SkHep-1”**. Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca que avaliou o domínio do conteúdo metodológico e teórico relacionado à dissertação. Após julgamento, os membros da Banca decidiram por:



APROVAR



REPROVAR

Profa. Dra. Lisandra Brandino de Oliveira (UFOP),
Examinadora Interna.

Proa. Dr. Mauro Cesar Isoldi (UFOP),
Examinador Externo.

Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa (UFOP),
Orientadora.

Prof. Dr. Frank Silva Bezerra (UFOP),
Coorientador.

Talita Prato da Silva (UFOP),
Mestranda.



Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição
Laboratório de Bioquímica Metabólica



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO LICOPENO E A INFLUÊNCIA DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE PKC NA PRODUÇÃO DE EROS EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA SK-HEP-1

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Ouro Preto
Março/2015



Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição
Laboratório de Bioquímica Metabólica



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO LICOPENO E A INFLUÊNCIA DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE PKC NA PRODUÇÃO DE EROS EM CÉLULAS SK-HEP-1

Talita Prato da Silva

Orientadora

Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa

Co-orientador

Prof. Dr. Frank Bezerra Silva
Msc Glaucy Rodrigues Araujo

S381a Silva, Talita Prato.
Avaliação do potencial antioxidante do licopeno e a influência da via de sinalização de PKC na produção de eros em células de hepatocarcinoma SK-HEP-1 [manuscrito] / Talita Prato Silva. - 2015.
63f.: il.: color.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa.
Coorientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezerra.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Pós Graduação em Saúde e Nutrição.
Área de Concentração: Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição.

1. Estresse. 2. Espécies Reativas de Oxigênio (EROS). 3. Proteína Cinase C (PKC). I. Costa, Daniela Caldeira. II. Bezerra, Frank Silva. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 612.39:577.1

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Bioquímica Metabólica** do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, com o auxílio financeiro da *CAPES, FAPEMIG, CNPq e UFOP*.

“E eu aqui tentando achar alguma explicação pra tanta linha torta e Ele diz, sorrindo assim, ‘confia em mim””.

Bruno Camurati

Dedico este trabalho aqueles que me estimularam
a prosseguir.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Daniela Caldeira Costa pela oportunidade, pela confiança, pelos ensinamentos, pelo apoio, incentivo e exemplo de dedicação.

Agradeço à Glaucy pela paciência, pelos conselhos, por todo o tempo que foi dedicado a mim mesmo quando o tempo estava tão escasso. Somente Deus pode te recompensar por tudo.

Agradeço ao Frank pela disponibilidade e apoio de sempre.

Obrigada, Aline, Joamyr, Ana Carla, Ana Carolina, Carol e Pedro, pelas risadas que fizeram os dias pesados ficarem mais leves.

Aos demais amigos do laboratório de bioquímica metabólica por compartilharem comigo as alegrias e as dificuldades de ser um estudante de pós-graduação.

Foi um prazer e uma honra trabalhar com vocês!

AGRADECIMENTOS

Já se passaram dois anos e meio desde a minha formatura e muita coisa mudou em mim desde então. O período do mestrado foi uma espécie de travessia a qual eu não teria completado sem a sabedoria providencial dos meus pais, o colo e os conselhos do meu irmão, o abraço e os cafunés do meu namorado, os ouvidos da Regina, da Ana Paula e da Luzia e os abraços, mordidas e lambidas do meu cachorro. Obrigada, Deus, por colocar as pessoas certas nas incertezas da minha vida.

AGRADECIMENTOS AOS COLABORADORES

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular;

Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos;

Laboratório de Imunoparasitologia;

Laboratório de Multiusuários.

Obrigada pelo suporte necessário a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Câncer e estresse oxidativo	3
2.2 A família da Proteína Cinase C e sua influência no estresse oxidativo	4
2.3 Geração de EROs através da ativação da PKC e NADPH oxidase.....	6
2.4 Proteção Antioxidante	8
2.4.1 Licopeno como possível antioxidante inibidor da PKC	8
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo geral	14
3.2 Objetivos específicos	14
4. METODOLOGIA	15
4.1 Cultivo celular	15
4.2 Contagem celular utilizando azul de Tripán	15
4.3 Preparo das soluções de licopeno	16
4.4 Ensaio de viabilidade celular MTT	16
4.5 Análise da produção de EROs por citometria de fluxo	17
4.5.1 Influência do licopeno na modulação de EROs induzida por PKC.....	18
4.5.2 Avaliação da Influência da NADPH oxidase na geração de EROs.....	19
4.6 Atividade da Superóxido Dismutase	19

4.7 Atividade da Catalase	20
4.8 Análise Estatística	20
5. RESULTADOS	22
5.1 Avaliação do Licopeno na Viabilidade Celular	22
5.2 Avaliação da Produção de EROs	22
5.3 Avaliação das influências da NADPH oxidase na geração de EROs e do licopeno na via de sinalização da PKC	23
5.4 Avaliação da viabilidade celular através do teste de exclusão por Azul de Tripan	24
5.5 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) e da Catalase (CAT)	26
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÃO	32
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•O₂⁻ – radical superóxido;

¹O₂ - oxigênio singlete

ATP – Trifosfato de Adenosina

BHT – butil-hidroxi-tolueno

Ca⁺² – Cálcio

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Carboxy-H₂DCFDA - (5-ou-6)-carboxy-2',7'dichlorodihydrofluoresceindiacetate

CAT – Catalase

CHC – Hepatocarcinoma celular

CMO1 – caroteno 15,15'-oxigenase

CMO2 – caroteno-9',10'-oxigenase

c-MYC—oncogene viral myc

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científica e Tecnológico

CO₂ – Dióxido de carbono

CYP2E1 - Citocromo P450 2E1

DAG – Diacilglicerol

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxiribonucléico

DPI - Diphenyleneiodoniumchloride

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

ERNs – Espécies reativas de Nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

GPx – Glutathione Peroxidase

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

IP3 - 1,4,5 trifosfato de inositol

LPS – Lipopolisacarídeo

MAPK – proteínas cinases ativadas por mitógenos

MFF – Max Fax Fix Solution

MTT – (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NFAT – Fator nuclear de Células T ativadas

NFκB – Fator de transcrição nuclear κB

O₃ - ozônio

OH• – radical hidroxila

PARP - poly(adenosine diphosphate-ribose)

PBS – Solução Salina Tamponada

PIP2 - fosfatidil inositol 4,5 bifosfato

PKC – Proteína cinase C

PMA – Phorbol 12-myristate 13-acetate

Ras – proteína do vírus do sarcoma de rato

ROO· - radical peroxila

SOD – Superóxido Dismutase

THF – tetraidrofurano

TLR-4 – Toll-like receptor 4

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

VHB – Vírus da Hepatite B

VHC – Vírus da Hepatite C

α – alfa

β I – beta I

β II – beta II

γ – gama

δ – delta

ϵ – épsilon

ζ – zeta

η /L – eta

θ – teta

ι / λ – lâmbida

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sequência esquemática das isoenzimas de PKC indicando o domínio estrutural das subfamílias e seus respectivos ativadores	5
Figura 2: Estrutura do Licopeno	9
Figura 3: Absorção e transporte do licopeno	10
Figura 4: Mecanismos propostos para o papel do licopeno na prevenção de doenças crônicas.....	12
Figura 5: Avaliação da viabilidade celular da linhagem SK-Hep-1 após 12 (A), 24 (B) e 48 (C) horas de incubação com o licopeno.....	21
Figura 6: Efeito do Licopeno na produção de EROs em células SK-Hep-1.....	23
Figura 7: Efeito do licopeno na produção de EROs induzida por PMA e Ionomicina em células SK-Hep-1	24
Figura 8: Porcentagem de células vivas após a incubação por (A) 30 minutos e (B) 6 horas com diferentes concentrações de licopeno	25
Figura 9: Porcentagem de células vivas após a incubação por 30 minutos e 6 horas com diferentes concentrações de licopeno e estimuladas com PMA e ionomicina.....	25
Figura 10: Avaliação e expressão das enzimas SOD e catalase	26
Figura 11: Hipótese de atuação do licopeno em células da linhagem de hepatocarcinoma SK-Hep-1	32

RESUMO

Carcinogênese é um processo multipassos que pode ser induzido e/ou modulado por agentes químicos ou físicos, incluindo aqueles que induzem espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas espécies são geradas a partir de uma grande variedade de processos como a respiração mitocondrial e a NADPH oxidase. A produção excessiva de EROs pode oxidar biomoléculas e facilitar processos relacionados com a carcinogênese. Em baixas doses, estas moléculas podem agir como importantes mediadores do crescimento celular, adesão, diferenciação e apoptose. As EROs podem, por exemplo, modular a via da PKC. PKC é uma família de serina-treonina cinases que regulam uma variedade de funções celulares. A ativação aberrante da PKC está relacionada a doenças como o câncer e o diabetes. A PKC pode ser ativada por EROs e a produção de EROs pode requerer a ativação da PKC porque essas cinases tem um papel na ativação da NADPH oxidase. Dessa forma, a ativação da PKC e da NADPH oxidase podem elevar os níveis de EROs, causando danos celulares. Estas reações potencialmente deletérias podem ser controladas por um sistema de antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase - SOD e catalase - CAT) e não enzimáticos (flavonóides e carotenóides). O licopeno é um carotenóide de coloração vermelha que está presente em vários vegetais e frutas. Trata-se de um dos antioxidantes mais potentes e tem demonstrado desempenhar um importante papel na prevenção de vários tipos de câncer, incluindo o hepatocarcinoma. Sendo assim, este estudo objetivou investigar o potencial antioxidante do licopeno e avaliar o efeito deste carotenóide na via da PKC, em células SK-Hep-1, uma linhagem de hepatocarcinoma altamente invasiva. O potencial antioxidante do licopeno foi examinado através da quantificação celular de EROs e das atividades das enzimas SOD e CAT. O efeito do licopeno na via da PKC foi examinado pela quantificação celular de EROs após estimulação com PMA e ionomicina. O papel da NADPH oxidase foi avaliado através da sua inibição com DPI, um inibidor desta enzima. Nossos resultados mostram que o DPI inibiu a produção de EROs, demonstrando a importância da enzima NADPH oxidase na geração de EROs na linhagem celular estudada. O licopeno diminuiu a produção basal

de EROs e aumentou a atividade da SOD. Além disso, o licopeno inibiu a produção de EROs induzida por ionomicina e PMA. Estes resultados analisados em conjunto sugerem que um dos mecanismos antioxidantes do licopeno seja através da modulação da proteína cinase C. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

Palavras chave: Estresse oxidativo, Licopeno, PKC, NADPH oxidase, EROs.

ABSTRACT

Carcinogenesis is a multistep process which can be induced and/ or modulated by chemical and physical agents, including those that induce reactive oxygen species (ROS). These species are generated by a wide variety of processes like mitochondrial respiration and NADPH oxidase. The excessive generation of ROS might oxidize cellular biomolecules and facilitate carcinogenesis-related processes. In lower doses, these molecules can act as important mediators of cell growth, adhesion, differentiation and apoptosis. ROS can, for example, modulate the PKC pathway. PKC is a family of serine/threonine kinases that regulates a variety of cell functions. Aberrant PKC activation is related to diseases such as cancer and diabetes. PKC can be activated by ROS and ROS production can require PKC activation because these kinases have a role in NADPH oxidase activation. On this way, the PKC and NADPH oxidase activation might elevate intracellular levels of ROS causing damage. These potentially deleterious reactions can be controlled by a system of enzymatic (SOD and CAT) and nonenzymatic antioxidants (flavonoids and carotenoids). Lycopene is a red colored carotenoid present in many vegetables and fruits. It's one of the most potent antioxidants and has been shown to play an important role in preventing from various types of cancer, including hepatoma. This study aimed to investigate the antioxidant potential of lycopene and evaluate the effect of this carotenoid on PKC pathway, in SK-Hep-1 cells, a highly invasive hepatoma cell line. The antioxidant potential of lycopene was examined by quantification of cellular ROS and of SOD and CAT activities. The effect of lycopene on PKC pathway was examined by quantification of cellular ROS after stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin. The role of NADPH oxidase was examined by its inhibition with DPI, an NADPH oxidase inhibitor. Our results show that DPI inhibited ROS production, demonstrating the importance of NADPH oxidase in ROS generation in SK-Hep-1 cell. Lycopene decreased basal ROS production and increased SOD activity. Furthermore, lycopene inhibit ROS by ionomycin and PMA-induced. Taken together, these results suggest lycopene antioxidant mechanisms are through

modulation of protein kinase C. However, more studies are needed to confirm this hypothesis.

Key words: Oxidative stress, Lycopene, PKC, NADPH oxidase, ROS.

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e a sua desintoxicação por sistemas biológicos antioxidantes. A produção excessiva de EROs é capaz de oxidar biomoléculas como carboidratos e o DNA facilitando a ocorrência de processos relacionados com a carcinogênese (DURACKOVA, 2010 e TREJO-SOLÍS et al., 2013). Apesar dos efeitos negativos, as EROs são produtos naturais do metabolismo celular e atuam como estímulos para importantes vias de sinalização, como a via da PKC.

A família PKC é formada por serina-treonina cinases, muitas das quais são ativadas por co-fatores como fosfatidilserina e diacilglicerol (DAG). Quando ativada, a PKC fosforila uma grande quantidade de alvos intracelulares e, como consequência disso, apresenta papéis centrais na regulação de muitas vias de sinalização celular (LI et al., 2006). É sabido que a PKC induz a produção de EROs e, recentemente, tem sido mostrado que a ativação da PKC dependente de NADPH oxidase é responsável, em parte, pelo aumento do estresse oxidativo em doenças como o diabetes e pela sinalização na migração celular em células de hepatocarcinoma (LEE et al., 2004 e WU, 2006).

Para se proteger dos efeitos deletérios do estresse oxidativo, o organismo lança mão de sistemas antioxidantes, os quais podem ser divididos em sistemas enzimáticos e não enzimáticos (NORDBERG e ARNÉR, 2001). O licopeno é um dos mais potentes antioxidantes não enzimáticos, apresentando uma habilidade duas vezes maior que o β -caroteno de sequestrar o oxigênio singlete e 10 vezes maior que o α -tocoferol (DI MASCIO et al., 1989). Estudos sugerem que o licopeno reduz o risco de diversas doenças crônicas como o câncer (GIOVANNUCCI, 1999) e que pode modular os níveis de EROs (PALOZZA et al., 2010). Recentemente, foi proposto que o licopeno pode ser responsável pela regulação de funções celulares ao modular diversas vias de sinalização redox-sensíveis que são alteradas pelo câncer (PALOZZA et al., 2011).

O estresse oxidativo tem um importante papel na carcinogênese do fígado. O hepatocarcinoma é um dos tipos de câncer mais comuns e letais no mundo, totalizando cerca de 750,000 novos casos e aproximadamente 700,000 mortes por ano (JEMAL et al., 2011). Estudos têm demonstrado o poder preditivo que os biomarcadores do estresse oxidativo podem ter no desenvolvimento do hepatocarcinoma (TANAKA et al., 2011 e LI et al.,2012).

Com base no que foi exposto, percebe-se que a investigação do efeito do licopeno na produção de espécies reativas de oxigênio bem como a avaliação da sua capacidade antioxidante em células de hepatocarcinoma SK-HEP-1 pode trazer novas perspectivas quanto ao efeito deste carotenóide na modulação do estresse oxidativo característico do hepatocarcinoma.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Câncer e Estresse Oxidativo

O câncer pode ser definido como uma doença que se inicia a partir de mudanças genéticas e epigenéticas que ocorrem em uma célula normal (PITOT, 1993). O seu desenvolvimento é gradual e pode ser dividido em três estágios: iniciação, promoção e progressão. A iniciação é um processo rápido e irreversível causado pela exposição a carcinógenos endógenos ou exógenos. É caracterizada por alterações genômicas dentro da “célula cancerosa” tais como mutações pontuais, deleção de gene, amplificação e rearranjos cromossômicos. A promoção é um processo reversível caracterizado pela expansão clonal das células pré-neoplásicas iniciadas. A progressão consiste no crescimento do tumor e ou potencial invasão e metástase (PITOT, 1993; KINZLER et al., 1996 e RAKOFF-NAHOUM, 2006).

Um dos fatores que pode, eventualmente, desencadear a iniciação e a progressão da carcinogênese é o estresse oxidativo (ISHIKAWA, et al., 2008 e KLAUNING, et al., 2004). O estresse oxidativo representa um processo natural derivado das funções vitais das quais dependem o oxigênio e ocorre quando a geração de EROs e/ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs) é maior que a capacidade celular de desintoxicar essas espécies com antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos (PALOZZA et al., 2011).

As EROs incluem moléculas com variados graus de reatividade. Como exemplos dessas moléculas, pode-se citar os radicais superóxido (O_2^-), o hidroxila ($OH\cdot$) e peróxila ($ROO\cdot$), além de espécies não radicais como o oxigênio singlete (1O_2), o ozônio (O_3), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estas espécies químicas altamente tóxicas são geradas por fontes como NADPH oxidase, respiração mitocondrial, xantina oxidase, citocromo P450, entre outras (HAUSLADEN e STAMLER, 1999 e LEUNG et al., 2013). Dentre estas, a família NADPH oxidase e a respiração mitocondrial se destacam como as principais produtoras de EROs.

A produção excessiva dessas espécies pode levar à oxidação celular de biomoléculas, incluindo carboidratos, lipídeos, proteínas e o DNA, facilitando a ocorrência de processos relacionados com a carcinogênese como alterações genéticas, epigenéticas, instabilidade genética e alterações celulares (TREJO-SOLÍS et al., 2013). Além disso, o estresse oxidativo pode induzir lesões em membranas celulares e desencadear uma série de reações que prejudicam a homeostase celular e que constituem importante fator causal no desenvolvimento e na progressão de várias doenças crônicas, como as doenças cardiovasculares (PALOZZA et al., 2011).

Paradoxalmente, as EROs também atuam como importantes moléculas de sinalização mediando várias respostas relacionadas ao crescimento, o que torna a sua presença importante para o metabolismo celular (WEYEMI et al., 2013). As EROs podem, por exemplo, modular a via da proteína cinase c (PKC) (GOMES et al., 2012).

2.2A Família da Proteína Cinase C e sua influência no estresse oxidativo

A proteína PKC faz parte de uma família composta por serina-treonina cinases que estão envolvidas na regulação de diversas funções celulares tais como o crescimento celular, organização do citoesqueleto, diferenciação e apoptose (CARTER et al., 2004).

É constituída de duas subunidades: a regulatória e a catalítica. A subunidade regulatória apresenta os domínios C1 e C2, sendo aquele responsável pela ligação com o éster de forbol (PMA) e com o diacilglicerol (DAG) e este pela ligação com o cálcio. A subunidade catalítica apresenta os domínios C3, responsável pela ligação do ATP, e C4, responsável pela ligação do substrato (CUNHA, 2006).

Tendo como base suas características estruturais e de ativação, a família PKC pode ser classificada em três subfamílias: convencional, nova e atípica (STEIMBERG, 2008) (figura 1). A classe convencional inclui as isoenzimas α (alfa), γ (gama) e, alternativamente, β I (beta I) e β II (beta II); apresenta em sua estrutura sítios de ligação

para o PMA e para o cálcio e requer como ativador primário o DAG e, como co-fatores de ativação fosfatidilserina e cálcio (Ca^{2+}). A classe nova inclui as isoenzimas δ (delta), ϵ (épsilon), η/L (neta) e θ (teta) e também são reguladas por DAG, mas independem de cálcio e fosfatidilserina para sua ativação. A classe atípica é composta pelas isoenzimas ζ (zeta) e ι/λ (lâmbda). Estas isoenzimas são cálcio independentes e apresentam um domínio C1 modificado que impede a interação com o DAG e não dispõe de sítio de ligação para o PMA; sua ativação é estimulada apenas pela fosfatidilserina (STEINBERG, 2008 e CUNHA, 2006).

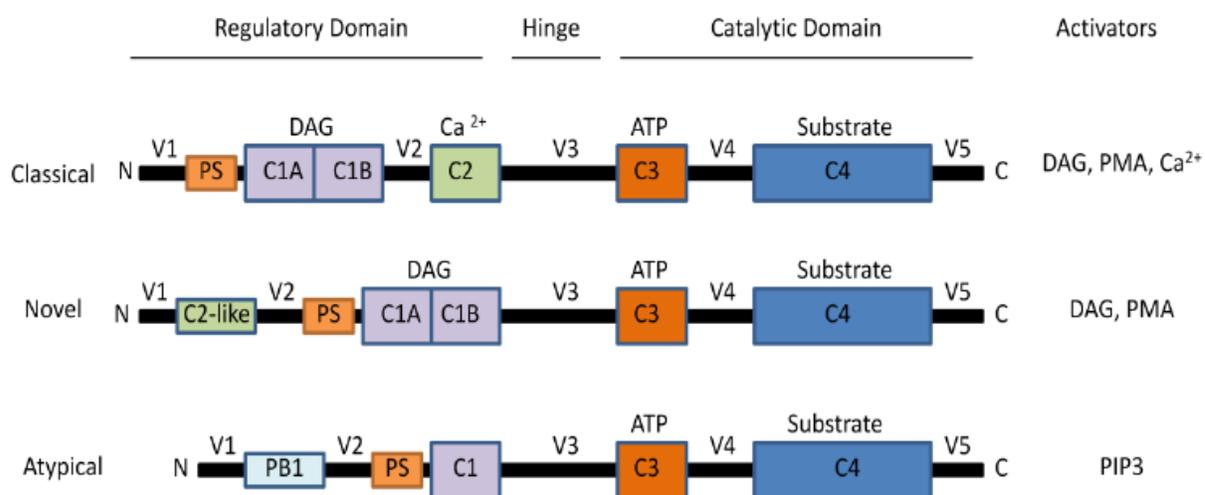


Figura 1: Sequência esquemática das isoenzimas de PKC indicando o domínio estrutural das subfamílias e seus respectivos ativadores. Fonte: (GOMES et al, 2012).

Pertencendo a uma subfamília distinta de PKCs encontram-se a PKC- μ (mu) ou proteína cinase D (PKD) e a PKC- ν . A PKD é ativada por diacilglicerol e fosfolípidios, mas apresenta diferenças estruturais quando comparada a outras PKCs. A PKC- ν apresenta sequências semelhantes à PKC- μ e só foi descoberta na última década. (CARTER et al., 2004).

Muitos estudos têm explorado a ativação, os mecanismos e as funções das isoenzimas da PKC no desenvolvimento de muitas doenças (KANG, 2014). Uma forma

de ativação da PKC se dá através da via da Proteína G. Uma vez ativada, esta proteína degrada o fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂) presente na membrana em 1,4,5 trifosfato de inositol (IP₃) e 1,2 diacilglicerol (DAG). O IP₃, por ser hidrossolúvel, migra pelo citosol e se liga a receptores específicos no retículo endoplasmático e mitocôndrias, liberando Ca⁺² no citosol aumentando a sua concentração e provocando a translocação da PKC para a membrana (MOURA e VIDAL, 2011 e NEWTON, 1995). Por ser hidrofóbico, o DAG fica associado à membrana plasmática e media a ativação da PKC e de proteínas da família Ras-MAPK. Somadas, essas vias levarão à ativação de diversos fatores de transcrição, como NFκB, NFAT e c-MYC, que, ao alterar o padrão de expressão gênica das células ativadas, provocam a sua proliferação e diferenciação (WU, 2006).

Experimentalmente, a via da PKC pode ser ativada através da utilização do PMA e da ionomicina. Isso acontece porque o PMA mimetiza o DAG e a ionomicina promove o aumento da concentração de cálcio favorecendo a ativação da via.

Modificações oxidativas também podem ativar a via da PKC. O domínio regulatório N-terminal da PKC contém anéis de zinco, ricos em resíduos de cisteína que são importantes alvos da oxidação por peróxido. Quando oxidada, a função autoinibitória do domínio regulatório fica comprometida, o que estimula a ativação da PKC e a sinalização para o crescimento celular e a promoção tumoral (GOPALAKRISHNA E JAKEN, 2000).

A ativação da PKC pode se tornar aberrante diante de alterações do ambiente celular, tais como as que ocorrem na presença de doenças, lesões ou exposição a pró-oxidantes (INOGUCHI et al., 2003).

2.3. Geração de EROs através da ativação da PKC e NADPH oxidase

A família NADPH oxidase consiste em um complexo multiprotéico que está presente em diversas células de origem mesodermal. Em células em repouso, fica

inativa e seus componentes ficam distribuídos entre o citosol e membrana. O principal componente de membranas, citocromo b_{558} , é composto de duas subunidades ($gp91^{phox}$ e $gp22^{phox}$); os componentes citosólicos são compostos por quatro proteínas principais ($p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ e a proteína G Rac) (BABIOR, 1999 e FORMAN et al, 2001). Quando as células são estimuladas os componentes citosólicos são fosforilados e migram para a membrana, formando com os componentes membranares um complexo ativo. Este complexo catalisa a transferência de elétrons do NADPH para o O_2 produzindo O_2^- o qual é utilizado na produção de uma grande variedade de EROs (BABIOR, 1999).

O complexo NADPH oxidase pode ser ativado por uma grande variedade de estímulos, entre os quais pode se citar a ativação da via da PKC. Várias isoenzimas da PKC são capazes de fosforilar os resíduos de serina da subunidade $p47^{phox}$, um passo crítico na ativação da NADPH oxidase. A fosforilação da $p47^{phox}$ permite que esta se ligue à fosfolipídeos de membrana, interaja com a $p22^{phox}$ e ainda atraia a $p67^{phox}$ para formar um complexo. A $p67^{phox}$, por sua vez, propicia a ligação e estabilização do complexo com a GTPase Rac, completando a formação do complexo NADPH oxidase capaz de gerar radicais superóxido (SLOW et al., 2006).

Estudos recentes mostraram que a $PKC\beta II$ induz a ativação da NADPH oxidase através da fosforilação da $p47^{phox}$ e da $p67^{phox}$ em monócitos. Quando tratada com zimosan opsonizado (um ativador da NADPH oxidase) a $PKC\delta$ fosforila a $p67^{phox}$ em monócitos (SLOW, et al., 2006 e ZHAO, et al., 2005). Os resultados de outro estudo mostraram que todas as isoenzimas da PKC presentes em neutrófilos são capazes de ativar a NADPH oxidase através de fosforilações diferenciadas da $p67^{phox}$ (FONTAYNE et al., 2001). Essa capacidade das isoenzimas de PKC de fosforilarem a $p47^{phox}$, bem como a $p67^{phox}$, fazem delas as principais cinases responsáveis pela ativação da NADPH oxidase e esta, por sua vez, é a maior fonte de produção de EROs em uma grande variedade de condições, tais como fibrose, arteriosclerose, e vários tipos de câncer (LAMBETH, 2007).

Sendo assim, diversos estudos têm demonstrado que a ativação da PKC pode ser requerida para a produção de EROs em diversos sistemas incluindo as complicações do diabetes (LEE et al., 2003). Em um estudo realizado com células de hepatocarcinoma da linhagem HepG2 observou-se que a geração de EROs foi dependente de PKC e que a presença de sequestradores de EROs preveniu a ativação da PKC (WU et al., 2006). Isso sugere que a produção de EROs pode tanto preceder quando suceder a ativação da via da PKC (WU, 2006).

2.4 Proteção antioxidante

Para evitar ou minimizar os efeitos deletérios causados pelo estresse oxidativo, o organismo utiliza sistemas antioxidantes que inativam os radicais livres. Estes sistemas são classificados em enzimáticos de ação intracelular (catalase - CAT, superóxido dismutase - SOD e glutathione peroxidase - GPx) e não enzimáticos (substâncias eliminadoras e sequestradoras de EROs, como as vitaminas E e C e os carotenóides) (FRIDOVICH, 1995, MURADIANA, et al, 2002 e NAVARRO et al, 2005).

A PKC pode ser desativada pela ação de antioxidantes devido às características da sua estrutura. A porção C-terminal do domínio catalítico da PKC apresenta alta concentração de resíduos de cisteína os quais são alvos de agentes antioxidantes como a curcumina e os análogos da vitamina E. Ao reagirem com o domínio catalítico, estes agentes provocam alterações nas cisteínas inibindo a atividade celular da PKC e, conseqüentemente, interferindo na ação dos promotores tumorais (GOPALAKRISHNA E JAKEN, 2000).

2.4.1 Licopeno como possível antioxidante inibidor da PKC

O licopeno é um carotenóide, isômero do beta-caroteno, de fórmula $C_{40}H_{56}$. Apresenta estrutura acíclica e, por não ter o anel beta-ionona, não tem atividade pró-vitamina A (Figura 2). Constitui-se no pigmento natural lipossolúvel de frutas e legumes

vermelhos e alaranjados e é considerado um carotenóide de grande reatividade tanto para o oxigênio como para os radicais livres. Tal reatividade se deve a sua estrutura química que apresenta treze duplas ligações, das quais onze são conjugadas (VITALE et al.,2010).



Figura 2: Estrutura do licopeno.

O licopeno é sintetizado exclusivamente por microrganismos e plantas e tem como uma de suas principais funções a absorção da luz durante a fotossíntese, protegendo, assim, a planta da fotossensibilidade (VITALE et al., 2010).

As principais fontes de licopeno na dieta humana são os tomates e os produtos à base de tomate. Contudo, melancia, uva rosa, mamão, goiaba, pitanga e damasco também são fontes importantes de licopeno (MANGELS et al., 1993). O licopeno pode se apresentar na configuração *cis* ou *trans*. Nos alimentos naturais, ele se encontra ligado à matriz em sua forma *trans*, o que dificulta sua liberação e o torna menos susceptível à digestão e absorção. O processamento mediante calor rompe as paredes celulares e transforma as formas isoméricas *trans* do licopeno em *cis*(5-*cis*, 9-*cis*, 13-*cis* y 15-*cis*) melhorando a sua biodisponibilidade (PERDOMO et al., 2012). Como pode ser visto na figura 3, cerca de trinta minutos após sua ingestão, o licopeno é incorporado às micelas dos lipídeos da dieta e é absorvido por difusão passiva na mucosa intestinal, incorporando-se a quilomícrons e liberando-se para ser transportado através do sistema linfático (BOJÓRQUEZ et al., 2013).

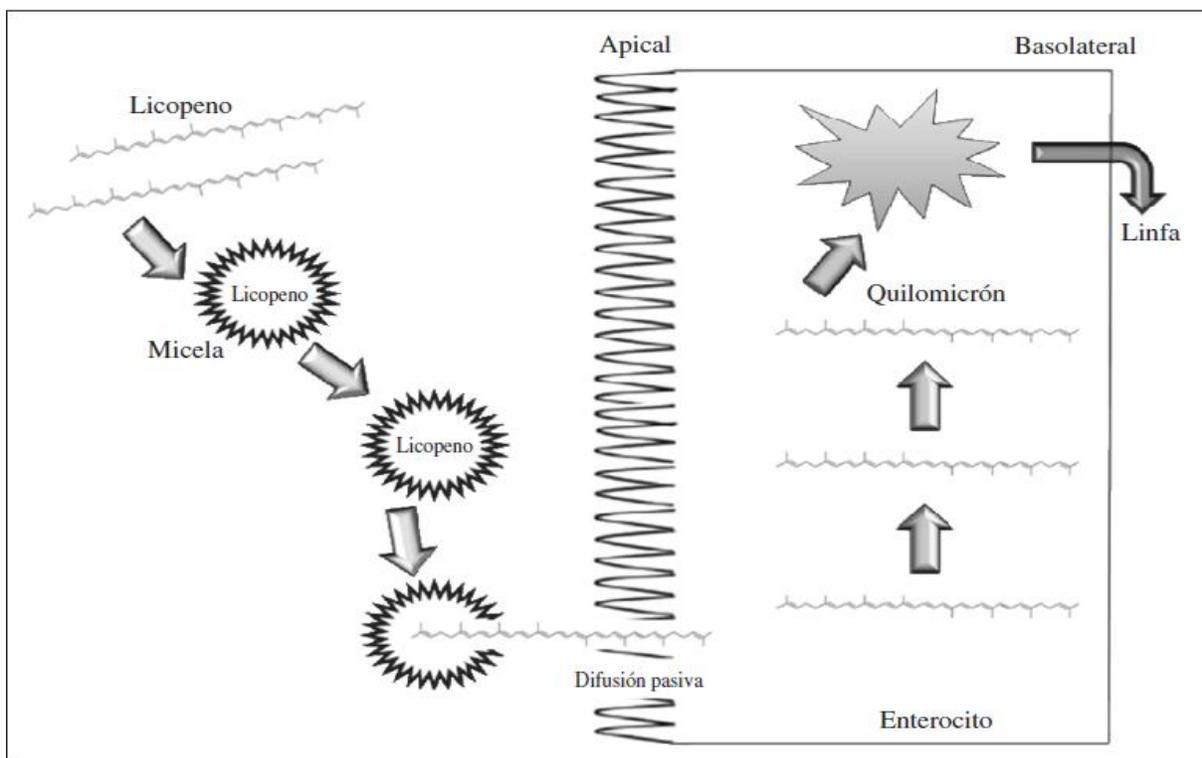


Figura 3. Absorção e transporte do licopeno. BOJÓRQUEZ et al., 2013.

Estudos *in vitro* sugerem que a absorção preferencial do isômero *cis* do licopeno sobre a forma *trans* deriva do fato de que aquele tem estrutura ligeiramente modificada, tornando a molécula mais curta e mais adequada para se encaixar nas micelas do ácido biliar, sendo preferencialmente incorporado em quilomícrons. (BOILEAU, BOILEAU, & ERDMAN, 2002).

Assim, além de estar presente nos alimentos, o licopeno é amplamente distribuído no corpo humano, sendo o carotenóide predominante no soro humano com níveis plasmáticos que variam de 0,22 a 1,06 nmol/mL. O licopeno é encontrado ainda em vários tecidos do corpo humano, como fígado, rim, glândulas renais, testículos, ovários e próstata (LU, et al., 2011). Sua concentração é proporcional à sua ingestão alimentar, mas é pouco influenciada pelas variações diárias, devido ao fato de que a taxa média de meia vida do licopeno no plasma é de 12 a 33 dias (COHEN, 2002).

O metabolismo do licopeno envolve reações químicas e clivagens enzimáticas e gera um conjunto de licopénóides (BLANCHE et al., 2014). Os compostos carbonílicos

tornam o licopeno susceptível à clivagem por auto-oxidação, oxidação mediada por radical, e oxigênio singlete (BRITTON et al., 2004). Estes produtos podem ser produzidos *in vivo* se os tecidos são expostos ao estresse oxidativo (MEIN et al., 2008).

Em relação à clivagem enzimática, os estudos têm demonstrado que, diferentemente dos carotenóides com atividade pro vitamina A, que são clivados pela caroteno 15,15'-oxigenase (CMO1), o licopeno é um substrato pobre para esta enzima. Aparentemente, a isomerização do licopeno impede a capacidade da CMO1 de metabolizá-lo (MEIN et al., 2008 e BLANCHE et al., 2014). Por outro lado, o caroteno-9',10'-oxigenase (CMO2) tem se demonstrado capaz de clivar o licopeno, de modo que, quanto maior a perda da enzima CMO2, maior é a concentração de licopeno intacto no sangue em modelo murino (FORD et al., 2010 e HU et al., 2006). Os metabólitos provenientes dessas reações podem apresentar efeitos biológicos e têm se tornado objetos de estudos, à medida em que mais evidências relacionam o consumo de licopeno à redução do risco de doenças crônicas em humanos (BLANCHE et al., 2014).

Uma meta-análise que reuniu 72 estudos mostrou que, em 57 destes estudos, o risco de diversos tipos de câncer (incluindo próstata, mama, pulmão e cólon) é inversamente proporcional à ingestão de licopeno (GIOVANUCCI, 1999). Recentemente, estudos epidemiológicos, *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos sugeriram que o licopeno tem efeitos positivos no tratamento de cancer oral e de lesões pré cancerosas (SINGH et al., 2004 e MAYNE et al., 2004).

Estudos demonstraram que o licopeno inibe o CYP2E1, uma isoforma do citocromo P450, que é responsável pela conversão de certos xenobióticos em carcinógenos (LOUISA, et al, 2009). Além disso, o licopeno induz as enzimas de fase I (como as enzimas dependentes do citocromo P450) e as enzimas de desintoxicação de fase II, sendo estas enzimas importantes para a eliminação de substâncias estranhas e carcinógenos do corpo (BREINHOLT et al., 2000 e VELMURUGAN et al., 2002).

Assim, o licopeno tem sido apontado como um importante componente bioativo responsável pela redução do risco de cancer. Como pode ser visto na figura 4, o licopeno pode atuar atenuando o estresse oxidativo e/ou através de outros mecanismos e reduzir, assim, o risco de doenças crônicas. Este estudo, contudo, se aterá à ação do licopeno enquanto antioxidante e à sua proteção na modulação de espécies reativas em linhagem celular de hepatocarcinoma.

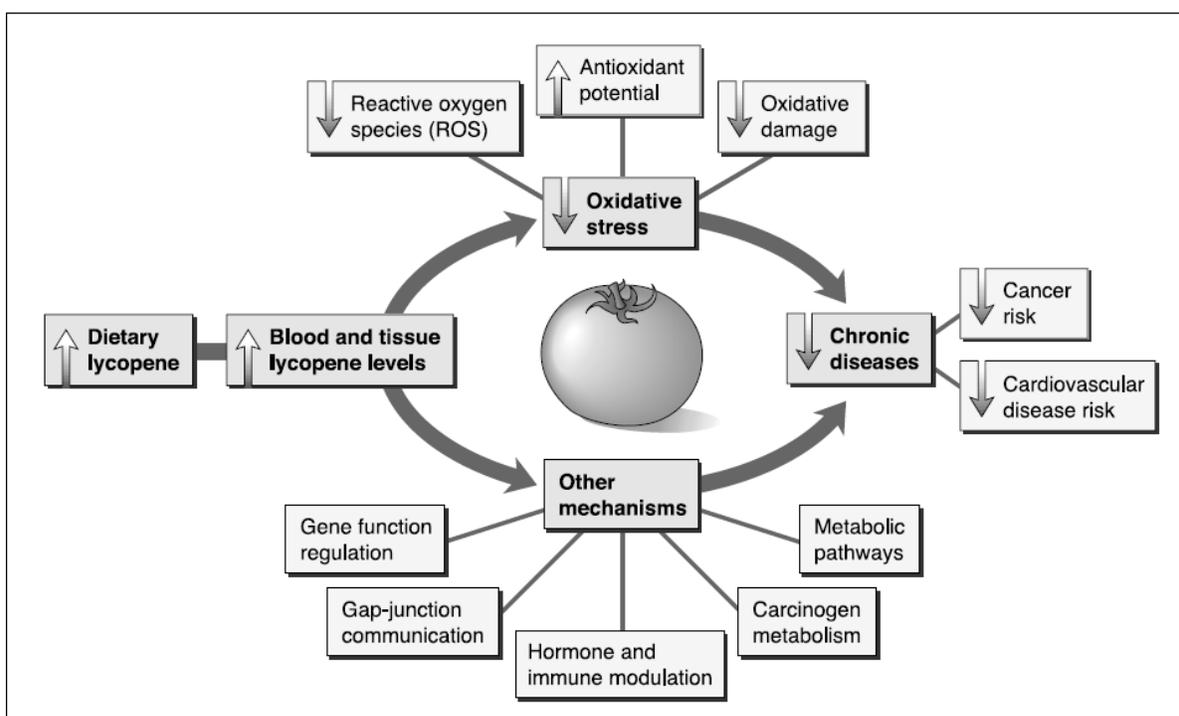


Figura 4: Mecanismos propostos para o papel do licopeno na prevenção de doenças crônicas. (AGARWAL e RAO, 2000).

O fígado é um importante local de metabolismo e apresenta, portanto, altos níveis de EROs o que resulta em aumento do estresse oxidativo (SUZUKI et al., 2013). O CHC (hepatocarcinoma celular) é a forma dominante de câncer primário de fígado (YU et al., 2008), sendo o quinto tipo de câncer mais comum no mundo e a terceira causa mais comum de morte por câncer (BOSCH, et al., 2004).

O desenvolvimento de CHC está frequentemente associado com uma inflamação crônica do fígado seguida de cirrose induzida por infecções persistentes causadas pelo vírus da hepatite B (VHB) ou pelo vírus da hepatite C (VHC). Outros fatores de risco

para o desenvolvimento de CHC incluem esteatose hepática alcoólica e não alcoólica, hemocromatose hereditária, hepatite autoimune, algumas porfirias, obesidade e diabetes *mellitus* tipo II (EL-SARAG, 2007).

Os estudos têm demonstrado que pacientes com infecções por VHC tendem a apresentar altos níveis de EROs e reduzidos níveis de antioxidantes (SERONELLO et al., 2007). Além disso, níveis elevados de EROs estão envolvidos nos processos de migração, invasão e metástase de células de hepatocarcinoma (HU et al., 2011).

Estas evidências sugerem que biomarcadores do estresse oxidativo podem ser úteis para prever o desenvolvimento e a recorrência de CHC em pacientes com doença hepática crônica. Como as isoenzimas da PKC apresentam papéis chave na sinalização celular, elas também podem ser alvos terapêuticos para diversos tipos de doenças incluindo desordens metabólicas e múltiplos tipos de câncer (KANG, 2014). Por essa razão, identificar meios de inativar a ação das isoenzimas da PKC é de grande importância.

Assim, baseando-se nas propriedades já citadas do licopeno e no fato de que a PKC pode ser inativada por antioxidantes, este projeto pretende utilizar como ferramenta de estudo células da linhagem SK-Hep-1, que são células de hepatocarcinoma altamente invasivas, com o objetivo de avaliar o potencial antioxidante do licopeno nestas células, sobretudo, na via da PKC.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito antioxidante do licopeno e a sua influência na via de sinalização de PKC em linhagem de células de hepatocarcinoma SK-Hep-1.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar a viabilidade celular da linhagem SK-Hep-1 expostas a diferentes concentrações de licopeno;

Avaliar o efeito do licopeno na modulação basal de EROs;

Avaliar a influência da NADPH oxidase na geração de EROs em células SK-Hep-1;

Avaliar a influência do licopeno na via de sinalização da PKC;

Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT.

4. METODOLOGIA

4.1. Cultivo celular

A linhagem celular SK-Hep-1 foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro. Para o cultivo, as células foram colocadas em frascos estéreis de crescimento de 75cm² contendo o meio de cultura DMEM e 10% (v/v) de soro fetal bovino. As garrafas foram incubadas em estufa a 37°C umidificadas com 5% de dióxido de carbono (CO₂). O meio foi substituído a cada dois ou três dias, de acordo com a confluência da monocamada celular, que era diariamente observada em microscópio invertido.

As células foram utilizadas para os ensaios quando a confluência atingia em torno de 80%, assim o meio era aspirado e a monocamada lavada com solução salina tamponada (PBS). Após a lavagem para o descolamento da monocamada utilizava-se 4 mL de solução de Tripsina e EDTA (0,20% e 0,02% respectivamente). Posteriormente, as células eram retiradas do frasco, colocadas em tubos Falcon estéreis, completando-se o volume para 10mL com meio DMEM. Os tubos com as células eram então centrifugados à 640xg por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante era descartado e o pellet de células ressuspenso em 1mL de meio DMEM. Em seguida, era realizada a contagem das células com Azul de Tripán 0,3% em Câmara de Neubauer.

4.2. Contagem celular utilizando azul de Tripán

Para a realização dos experimentos, bem como para a manutenção das células viáveis em estoque, o número de células viáveis era estimado com o uso do corante azul de Tripán. O fundamento desse método baseia-se na observação de que células viáveis são impermeáveis ao referido corante, ao passo que as células não viáveis apresentam permeabilidade, devido à formação de poros na membrana, o que permite a penetração do corante e assim as células não viáveis exibem coloração azul após tratamento (KANOPKA *et al.*, 1996). Resumidamente, 100 µL da suspensão celular

eram adicionados a 900 μL do azul de tripan (0,3%) e posteriormente uma gota era colocada na câmara de Neubauer para a realização da contagem.

4.3. Preparo das soluções de Licopeno

O licopeno puro foi armazenado ao abrigo da luz a -80°C para minimizar a oxidação. A solução estoque de licopeno foi preparada em tetrahidrofurano (THF) contendo 0,25% de butil-hidroxi-tolueno (BHT) como conservante, a uma concentração de 1 μM e armazenada no escuro a -80°C . Para a realização dos experimentos, a solução Licopeno-THF era adicionada ao meio de cultura de modo a obter as concentrações finais de 0,5;1,0;2,5;5;10 μM de licopeno.

4.4. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

O teste MTT (*3-(4,5 dimethylazol-2yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromide*) constitui-se em um modelo para avaliar a viabilidade celular, de forma rápida e objetiva, com base em uma reação colorimétrica.

A mitocôndria é a maior fonte de EROs através da cadeia transportadora de elétrons, e o MTT reage com enzimas indicando a atividade da cadeia transportadora de elétrons, e conseqüentemente, a viabilidade das células. O MTT quando incubado com células vivas, tem seu substrato clivado por enzimas mitocondriais como a succinato-desidrogenase, transformando um composto amarelo em um composto violeta (Formazan). A quantidade de cristais de Formazan formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Assim, quanto mais escura a coloração, ao final da reação, maior a viabilidade celular e a atividade da cadeia respiratória.

As células foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços na concentração de 5×10^3 células em cada poço em presença de meio DMEM e 10% de soro fetal bovino, perfazendo um volume final de 200 μL . As placas foram então

incubadas em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas para a aderência das células e formação da monocamada celular. Decorrido este tempo, o sobrenadante foi retirado, e foram adicionados 180µL de meio DMEM, e 20µL da solução preparada de licopeno nas concentrações 0,5;1,0;2,5;5;10µM. As placas foram então incubadas novamente em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂ por 12, 24 e 48 horas. Decorrido o tempo de incubação, o sobrenadante foi retirado e os poços lavados com PBS. Foram adicionados 200 µL/poço de uma solução contendo 5,0 mg/mL de MTT em DMEM e incubadas por 4h a 37°C. A solução de MTT foi removida e 100 µL de DMSO foram adicionados a cada poço. A absorbância foi lida a 570 nm.

O cálculo utilizado para avaliar a porcentagem de viabilidade celular foi o seguinte: Absorbância das células tratadas/ absorbância do controle x 100. A porcentagem de citotoxicidade foi calculada como segue: 100 – porcentagem de viabilidade.

Para cada tempo de incubação foi realizado um controle (células não tratadas). Ao controle foi atribuído 100% de viabilidade (0% de citotoxicidade). De acordo com a ISSO 2009 - 10993-5, um composto é considerado citotóxico quando a viabilidade celular é menor ou igual a 70%. Sendo assim, os resultados obtidos no teste de MTT foram comparados com as determinações da ISO.

4.5. Análise da produção de EROs por citometria de fluxo

Para avaliação da produção de EROs em células de linhagem hepática SK-Hep-1 foi utilizado o Kit Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species (Invitrogen®) que permite a detecção de EROs intracelular por citometria de fluxo. A técnica utiliza um marcador fluorogênico não fluorescente (5-ou-6)-carboxy-2',7'dichlorodihydrofluoresceindiacetate (carboxy-H₂DCFDA), que quando quebrado por esterases intracelulares não específicas, gera a molécula carboxy-DCFH que reage com as EROs não específicas tornando-se fluorescente.

Primeiramente, procedeu-se o descolamento das células nas garrafas com solução de tripsina/EDTA e elas foram transferidas para tubos de citômetro, nos quais foram adicionados o meio de cultura DMEM e o licopeno nas concentrações de 0,5 ou 10 μM , perfazendo o volume final de 500 μL . Após verificarmos a viabilidade das células em todas as concentrações avaliadas, optamos por realizar os experimentos subsequentes utilizando as concentrações de 0,5 e 10 μM , por representarem a menor e maior concentração de licopeno testada no ensaio de viabilidade. Em seguida as células foram incubadas em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO_2 por 30 minutos ou 6 horas.

Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 640xg por 3 minutos e o sobrenadante descartado. Por fim foi adicionado o marcador carboxi-H2DCFDA (10 μM) para a avaliação da produção de EROs. As células foram então incubadas por 30 minutos em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO_2 . Posteriormente, as células foram lavadas com solução de Hanks (pH 7.4) e centrifugadas por 2 vezes a 640xg por 3 minutos. Na última lavagem, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 200 μL de solução de fixação (MFF). A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo BD FACSCalibur™, utilizando o software CellQuest™.

4.5.1 Influência do licopeno na modulação de EROs induzida por PKC

Como descrito anteriormente, a associação de PMA e ionomicina é capaz de ativar a PKC e esta, por sua vez, ativa a enzima NADPH oxidase levando à produção de quantidades significativas de EROs. Para avaliar a influência do licopeno na modulação de EROs induzida pela PKC, a ativação desta foi realizada pelo uso de PMA e ionomicina. Para a execução deste experimento, as células foram incubadas durante 30 minutos ou 6 horas com o licopeno, os tubos foram centrifugados a 640xg por 3 minutos e o sobrenadante descartado. Adicionou-se, então, o marcador carboxi-H2DCFDA (10 μM), o PMA (50 μM) e a ionomicina (100 μM) em todos os tubos. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos em estufa umidificada à 37°C e 5%

de CO₂. Posteriormente, as células foram lavadas com solução de Hanks (pH 7.4) e centrifugadas por 2 vezes a 640xg por 3 minutos. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 200µL de solução de fixação (MFF). A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo BD FACSCalibur™, utilizando o software CellQuest™.

4.5.2 Avaliação da Influência da NADPH oxidase na geração de EROs

Para verificar a influência da NADPH oxidase na geração de EROs foi utilizado o Diphenyleneiodoniumchloride (DPI), um potente inibidor desta enzima. Após o descolamento das células com solução de tripsina/EDTA, estas foram transferidas para tubos de citômetro, nos quais foram adicionados o meio de cultura DMEM, as concentrações de licopeno (0,5 ou 10 µM) e ou DPI (20 µM), perfazendo o volume final de 500µL. Em seguida as células foram incubadas em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂ por 30 minutos ou 6 horas. O procedimento pós-incubação ocorreu como descrito no item anterior.

Após cada ensaio para determinação da produção de EROs nas células foi realizado teste de viabilidade por azul de tripan, como descrito anteriormente.

4.6. Atividade da Superóxido Dismutase

A superóxido dismutase é uma enzima antioxidante que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A atividade da superóxido dismutase total foi determinada utilizando o “*Superoxide Dismutase assay Kit*” (Chemical Cayman, MI, EUA). Resumidamente, após incubação por 30 minutos ou 6 horas com as respectivas concentrações de licopeno e subsequente estimulação ou não por PMA e ionomicina, as células (1×10⁶/mL) foram homogeneizadas em tampão HEPES 20 mM, gelado, pH 7,2, contendo 1mM de EGTA, 210 mM de sacarose e 70 mM de manitol. Para a realização do ensaio foram utilizados 10 µL de sobrenadante, os quais foram

transferidos para placas de ELISA. Adicionou-se então, a xantina oxidase a qual é responsável pelo início da reação. A placa foi incubada em um agitador a temperatura ambiente por 20 minutos e a absorbância foi medida a 450 nm utilizando um leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808).

4.7. Atividade da Catalase

A catalase é uma enzima antioxidante que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio. A atividade da catalase foi determinada usando o “*EnzyChrom™ Catalase Assay Kit*” (BioAssay System, CA, USA). Resumidamente, após incubação por 30 minutos ou 6 horas com as respectivas concentrações de licopeno e subsequente estimulação ou não por PMA e ionomicina as células (1×10^6 /mL) foram homogeneizadas em 200 μ L de tampão fosfato pH 7,4 e transferidas para placas de Elisa. Após a adição de 50 mM H_2O_2 iniciou-se a reação que durou 30 minutos. Depois dessa incubação foram acrescentados 100 μ L de reagente de detecção por reação, a placa foi agitada e incubada por 10 minutos. A absorbância foi medida em 570 nm usando um leitor de placa de ELISA (BiotekELx808).

Para a realização do cálculo foi feita a seguinte normatização: uma unidade é a quantidade de catalase que decompõe um μ mol de H_2O_2 por min em pH 7,0 e temperatura ambiente.

4.8. Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados apresentavam distribuição normal. Após esta análise, os dados foram estatisticamente avaliados pela análise de variância ANOVA one-way seguido pelo pós-teste de Bonferroni para múltiplas comparações. O

nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. O software Prism 5.0 foi utilizado para realização das análises e plotagem de gráficos.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do Licopeno na Viabilidade Celular

Os resultados do ensaio de viabilidade celular (MTT) demonstram que o licopeno nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10 μM durante os tempos de incubação de 12, 24 e 48 horas não teve efeito significativo sobre a viabilidade da linhagem de células SK-Hep-1 ($p > 0.05$), sendo que a viabilidade manteve-se acima de 85% em todas as concentrações avaliadas (Figura 5).

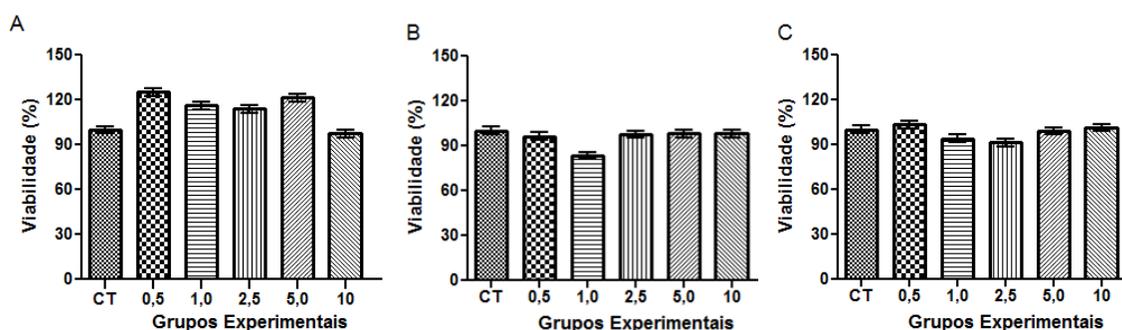


Figura 5: Avaliação da viabilidade celular da linhagem SK-Hep-1 após 12 (A), 24 (B) e 48 (C) horas de incubação com o licopeno. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. Os ensaios foram realizados em sextuplicata. O licopeno não afetou a viabilidade celular nos tempos estudados.

5.2 Avaliação da Produção de EROs

O efeito do licopeno na produção basal de EROs intracelular foi avaliado através da marcação com a sonda carboxy-H₂DCFDA por citometria de fluxo. Para tal, as células da linhagem SK-Hep-1 foram incubadas, durante 30 minutos ou 6 horas, em duas concentrações distintas (0,5 ou 10 μM) de licopeno.

Os resultados mostram que as células incubadas com licopeno nas concentrações de 0,5 e 10 μM por 30 minutos não foram capazes de reduzir significativamente a produção de EROs quando comparado ao controle (figura 6A).

Entretanto, as células incubadas durante 6 horas com licopeno na concentração de 10 μ M apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de EROs (figura 6B). Não foi observada nenhuma alteração na produção destas espécies em células incubadas 6 horas com licopeno na concentração de 5 μ M (figura 6B).

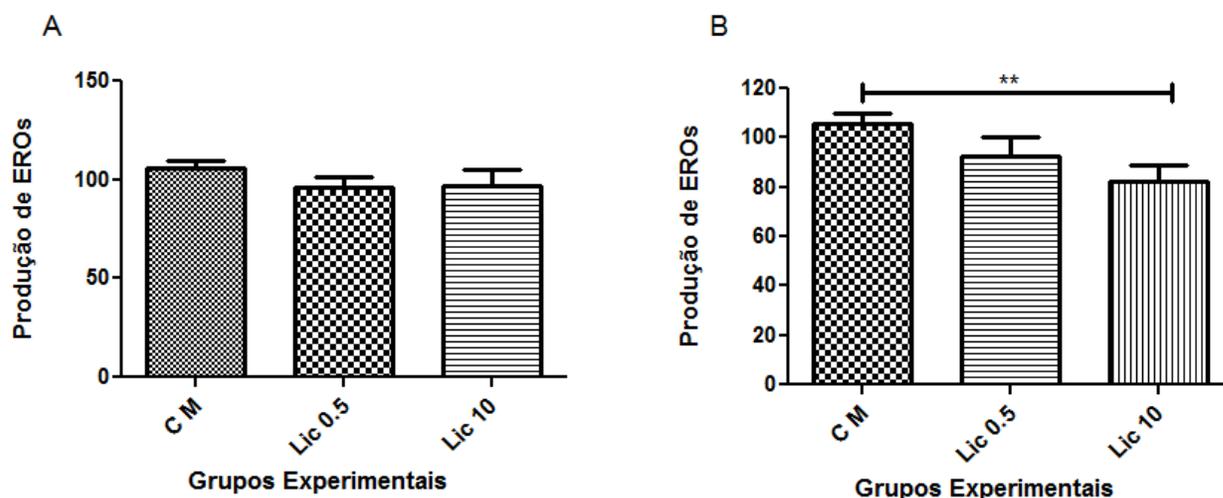


Figura 6: Efeito do Licopeno na produção de EROs em células SK-Hep-1. (A) Níveis de EROs em células pré-incubadas por (A) 30 minutos e (B) 6 horas com licopeno e marcadas com a sonda carboxi-H2DCFDA por 30 minutos. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Este experimento foi realizado em duplicata em três ensaios independentes. O licopeno na concentração de 10 μ M por 6 horas inibiu significativamente ($p < 0,05$) a produção de EROs. CM: Células marcadas com a sonda carboxi-H2DCFDA; Lic 0.5: células incubadas com 0,5 μ M de licopeno + sonda carboxi-H2DCFDA; Lic 10: células incubadas com 10 μ M de licopeno + sonda carboxi-H2DCFDA.

5.3 Avaliação das influências da NADPH oxidase na geração de EROs e do licopeno na via de sinalização da PKC

A produção de EROs pode ser induzida pelo uso de PMA e ionomicina, os quais são ativadores da PKC e, conseqüentemente, da NADPH oxidase (Gustafsson e Bengtsson, 1999). Para avaliar a influência da NADPH oxidase na geração de EROs as células foram incubadas na presença de DPI, um inibidor da NADPH oxidase. Para avaliar a influência do licopeno na via de sinalização de PKC, as células foram estimuladas ou não com PMA e ionomicina por 30 minutos. Os resultados mostram que, conforme esperado, a adição de PMA e ionomicina aumentou significativamente a

produção de EROs e a adição de DPI reduziu significativamente a produção dessas espécies. A incubação com o licopeno reduziu significativamente a produção de EROs tanto na concentração de 0,5 μM quanto na concentração de 10 μM em ambos os tempos (figura 7 – painel A e B).

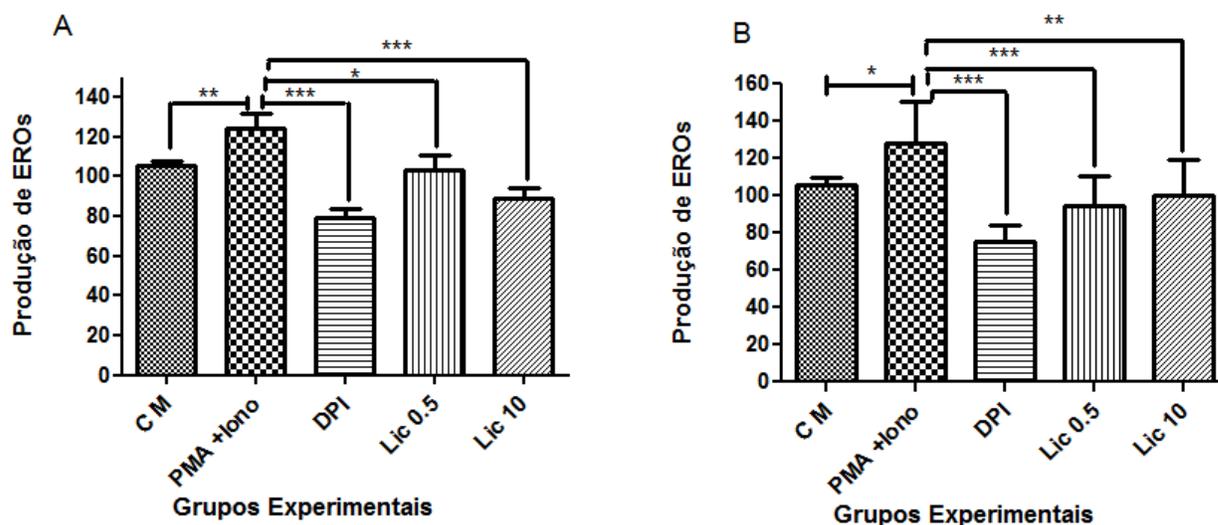


Figura 7: Efeito do licopeno na produção de EROs induzida por PMA e Ionomicina em células SK-Hep-1. Os gráficos mostram os níveis de EROs após pré-incubação de (A) 30 minutos e (B) 6 horas com licopeno em células expostas ao PMA e ionomicina ou DPI (inibidor da NADPH oxidase). Este experimento foi realizado em duplicata em três ensaios independentes. A adição de PMA e ionomicina aumentou significativamente a produção de EROs e a adição de DPI reduziu significativamente a produção dessas espécies. O tratamento com licopeno reduziu significativamente a produção de EROs em ambas as concentrações e tempos estudados. (*) $p < 0,5$; (**) $p < 0,05$; (***) $p < 0,01$. CM: Células marcadas com sonda carboxi-H2DCFDA; PMA+iono: células + carboxi-H2DCFDA + PMA + Ionomicina; DPI: células + carboxi-H2DCFDA + DPI; Lic 0.5: células + carboxi-H2DCFDA + 0.5 μM de licopeno + PMA + Ionomicina. Lic 10: células + carboxi-H2DCFDA + 10 μM de licopeno + PMA + Ionomicina.

5.4 Avaliação da viabilidade celular através do teste de exclusão por Azul de Tripán

Após cada ensaio para determinação da produção de EROs nas células foi realizado o teste de exclusão por azul de tripan para análise de células viáveis. As figuras 8 e 9 apresentam o efeito da incubação com diferentes concentrações de licopeno sobre a viabilidade celular na ausência (figura 8) e na presença de estímulo

(figura 9) e em diferentes tempos (painel A: 30 minutos e painel B: 6 horas). A incubação com licopeno não reduziu significativamente a porcentagem de células viáveis em nenhuma das concentrações e tempos estudados.

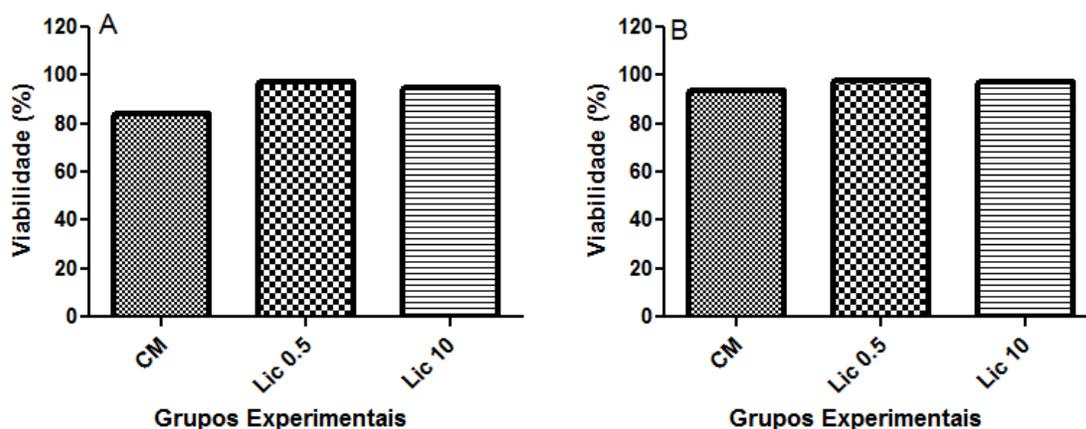


Figura 8. Porcentagem de células vivas após a incubação por (A) 30 minutos e (B) 6 horas com diferentes concentrações de licopeno. CM: células controle marcadas com a sonda carboxi DCFDA; Lic 0.5 e Lic 10: respectivamente, células pré-incubadas com 0,5 μM e 10 μM de licopeno e marcadas com carboxi-DCFDA.

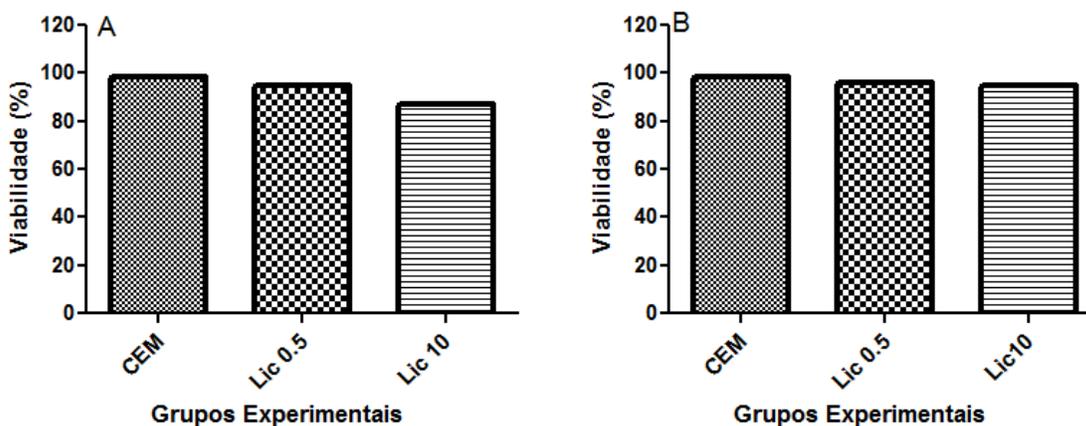


Figura 9. Porcentagem de células vivas após a incubação por (A) 30 minutos e (B) 6 horas com diferentes concentrações de licopeno e estimuladas com PMA e ionomicina. CEM: células controle marcadas com a sonda carboxi DCFDA e estimuladas com PMA e ionomicina; Lic 0.5 e Lic 10: respectivamente, células pré-incubadas com 0,5 μM e 10 μM de licopeno, marcadas com carboxi DCFDA e estimuladas com PMA e Ionomicina.

5.5 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) e da Catalase (CAT)

A figura 10 mostra a atividade total das enzimas antioxidantes SOD (painéis A e B) e CAT (painéis C e D). Os resultados mostram que a atividade da SOD foi aumentada significativamente nas células incubadas por 6 horas com 10 μ M de licopeno e estimuladas por PMA e ionomicina quando comparadas ao controle estimulado (painel B). Já a atividade da catalase não foi afetada pela incubação com licopeno em nenhuma das concentrações e em nenhum dos tempos estudados.

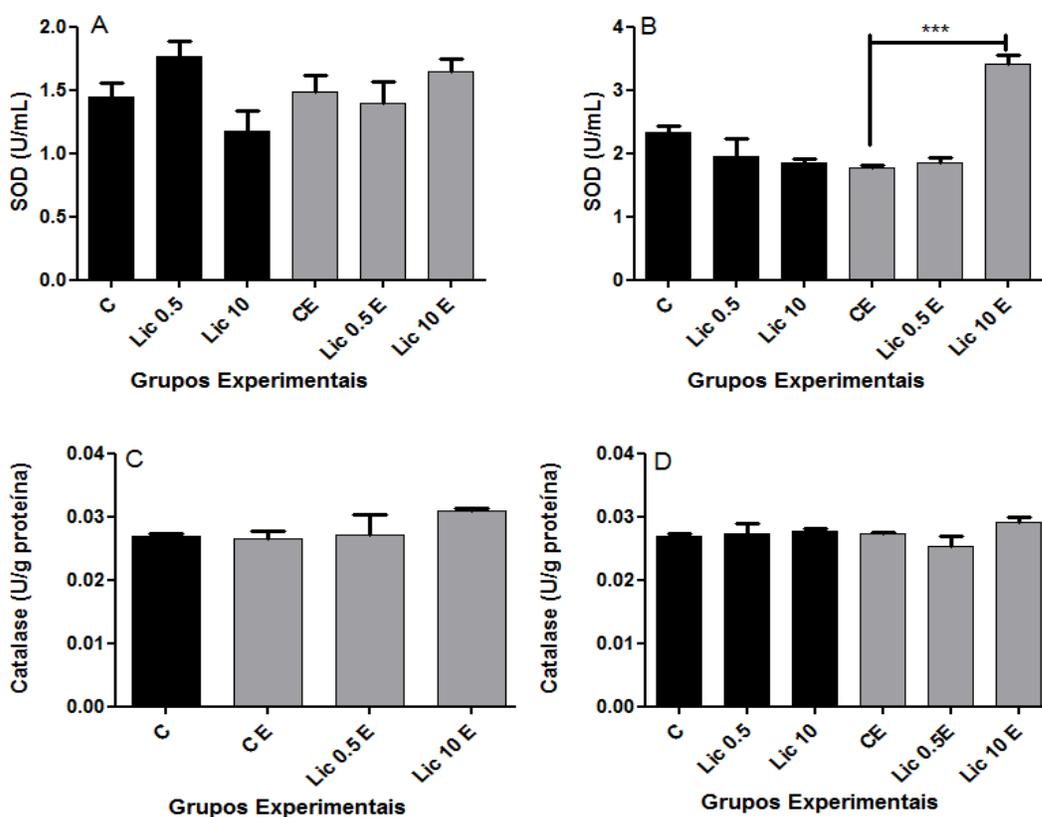


Figura 10: Efeito do licopeno na atividade das enzimas SOD e CAT. Efeito do licopeno na atividade da SOD após (A) 30 minutos e (B) 6 horas de incubação. Efeito do licopeno na atividade da CAT após (C) 30 minutos e (D) 6 horas de incubação. O ensaio de SOD foi realizado em duplicata em três experimentos independentes. O ensaio de CAT foi realizado em triplicata. C: células controle; CE: células marcadas com carboxi-DCFDA e estimuladas com PMA e ionomicina; Lic 0.5 e Lic 10: respectivamente, células pré-incubadas com 0,5 μ M e 10 μ M de licopeno, marcadas com carboxi DCFDA. Lic 0.5E e Lic 10E: respectivamente, células pré-incubadas com 0,5 μ M e 10 μ M de licopeno, marcadas com carboxi DCFDA e estimuladas com PMA e Ionomicina.

6. DISCUSSÃO

O licopeno é um carotenóide que se caracteriza por possuir uma estrutura química acíclica formada por 40 átomos de carbono com 12 duplas ligações sendo 11 conjugadas. Tal estrutura o torna muito reativo ao oxigênio e aos radicais livres (BOJÓRQUEZ, 2013). Entre os carotenóides, o licopeno é considerado como o de maior potencial antioxidante e, muitos estudos têm demonstrado um forte efeito protetor contra várias doenças (DI MASCIO, 1989 e CLINTON, 1998).

Apesar de seus efeitos positivos, assim como os demais carotenóides, quando em altas concentrações, o licopeno pode exibir atividade pró-oxidante (LOWE et al., 1999) causando dano celular e alterando a viabilidade destas células. Por essa razão, nosso primeiro passo foi verificar a viabilidade das células SK-Hep-1 expostas à diferentes concentrações de licopeno através do ensaio de MTT. O ensaio de viabilidade celular por MTT mostrou que o licopeno não apresentou citotoxicidade para as células SK-Hep-1 em nenhuma das concentrações (0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10 μM) e em nenhum dos tempos estudados (12, 24 e 48 horas) (Figura 5). Resultado semelhante foi encontrado por um estudo que avaliou a viabilidade de células de câncer de mama (MCF-7) quando incubadas por 24, 48 e 72 horas com licopeno nas concentrações de 0,125, 0,5, 1, 5, 10, 20, 50 e 100 μM . O licopeno apresentou citotoxicidade apenas na maior concentração, após 24 horas de incubação, quando a viabilidade foi de 68% comparado aos 89% do controle (FORNELLI et al, 2006). Outro estudo testou o efeito do licopeno na viabilidade de 8 tipos diferentes de linhagens celulares. As células foram incubadas com licopeno nas concentrações de 1, 3 ou 5 μM por 24, 48 e 96 horas. Os resultados das incubações por 24 e 48 horas mostraram que não houve alteração no número de células viáveis. Apenas em 96 horas de incubação a viabilidade foi reduzida em algumas linhagens, sobretudo diante da maior concentração de licopeno (TEODORO et al, 2012).

Como mencionado anteriormente, muitos benefícios do licopeno para a saúde são atribuídos ao seu potencial antioxidante. Contudo, quando em altas concentrações, o licopeno pode apresentar atividade pró-oxidante (Young e Lowe, 2001). Nas dietas

ocidentais, há um elevado consumo de alimentos ricos em licopeno e sua concentração fisiológica varia de 1-2 μM (RAFI et al., 2007 e EGLASS et al., 2012). Estudos apontam que concentrações inferiores a 0,292 e 0,260 μM estão relacionados, respectivamente, ao aumento do risco de câncer de mama e próstata. Por outro lado, concentrações superiores a 0,92 e 0,838 μM estão relacionadas à redução do risco dessas neoplasias (ELIASSEN et al., 2012 e ZHANG et al, 2007).

Com base nessas informações, e nos resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular do presente estudo, nós optamos por utilizar as concentrações de 0,5 e 10 μM nos experimentos seguintes. Dessa forma, as concentrações utilizadas estariam dentro de uma faixa fisiológica e seria possível testar se haveria alguma diferença na modulação do estresse oxidativo bem como se, em maior concentração (10 μM), o licopeno teria efeito pró-oxidante.

Como mencionado anteriormente, as evidências indicam que o estresse oxidativo tem um importante papel no desenvolvimento de vários tipos de doenças humanas, incluindo o hepatocarcinoma (SASAKI, 2006). O fígado é o principal órgão de controle metabólico e, como tal, exibe altos níveis de EROs, o que resulta em aumento do estresse oxidativo. Além disso, a infecção pelo VHB, condição comum no desenvolvimento de hepatocarcinoma, está associada com elevados níveis de EROs e baixos níveis de antioxidantes (SERONELLO et al, 2007). Estudos *in vitro* e *in vivo* tem sugerido que o licopeno pode atenuar o dano ao fígado e prevenir o desenvolvimento do hepatocarcinoma.

Nesse contexto, um dos objetivos deste estudo foi o de avaliar o efeito do licopeno na geração basal de EROs em células de hepatocarcinoma. Para isso as células foram incubadas em dois tempos (30 minutos e 6 horas) na presença e na ausência de licopeno em duas concentrações distintas (0,5 e 10 μM). Foi observado que a incubação de 30 minutos com 0,5 e 10 μM de licopeno não alterou de forma significativa a produção de EROs. Já a incubação de 10 μM de licopeno durante 6 horas reduziu significativamente a produção de EROs em relação às células controle

(figura 6). Isso sugere que o licopeno pode ter a habilidade de proteger as células SK-Hep-1 do estresse oxidativo através da modulação da geração de EROs promovida pela doença. Vale ressaltar também que, em uma situação basal (sem estímulo) o licopeno foi capaz de reduzir a produção de EROs apenas quando o tempo de exposição a este carotenóide foi maior. Isto nos levou a questionar se o licopeno poderia estar modulando vias de sinalização celular ou atuando de forma direta. Neste sentido, sabendo-se da importância da via de PKC para a geração de EROs através da NADPH oxidase, principalmente em situações patológicas, resolvemos como próximo passo avaliar o efeito do licopeno mediante ativação desta via. É sabido que o uso de PMA e ionomicina promove a ativação da PKC e esta, por sua vez, ativa a NADPH oxidase o que aumenta a produção de EROs. Sendo assim, os níveis de EROs foram medidos após incubação com licopeno seguida de estímulo com PMA e ionomicina. Os resultados mostraram que o licopeno inibiu de forma significativa a produção de EROs, em ambas as concentrações e tempos avaliados. Para confirmar a participação da NADPH oxidase neste processo, os níveis de EROs também foram avaliados na presença de DPI, um importante inibidor desta enzima. A exposição das células ao DPI causou uma redução significativa na produção de EROs em ambos os tempos estudados (Figura 7). Estes resultados em conjunto sugerem que o licopeno pode proteger a célula SK-Hep-1 do estresse oxidativo promovido pela ativação da NADPH oxidase dependente da via da PKC. Este resultado estão em concordância com CHAO et al (2014) que observaram que o pré-tratamento com licopeno nas concentrações de 3-10 μ M diminuiu significativamente a produção de EROs através da redução da expressão da NADPH oxidase.

Estudos recentes têm demonstrado que danos excessivos ao DNA, sobretudo aquele induzido pelo radical peróxido nítrico (ONOO^-), provocam a superativação da PARP (uma enzima envolvida na manutenção da estrutura da cromatina e no reparo do DNA) promovendo a depleção de NAD^+ , falha de energia e a inibição da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Nessas condições, há um aumento da produção mitocondrial de EROs bem como a ativação de vias de sinalização, como a PKC. Essa ativação se dá

via síntese de novo de diacilglicerol e, subsequentemente, da NADPH oxidase, aumentando o estresse oxidativo endotelial (DU et al, 2013 e OBROSOVA et al, 2005). YORGOV et al (2009) observaram que, na presença de um inibidor da PKC ou da NADPH oxidase, a produção de ONOO⁻ é inibida bem como a ativação da PARP. Estes resultados sugerem que a ativação da PKC dependente da NADPH oxidase constitui a via principal para geração de ONOO⁻, o qual ativa PARP em células endoteliais. Sabe-se que o licopeno também apresenta como importante propriedade a capacidade de sequestrar EROs. ZOU et al (2013), observaram que o licopeno foi capaz de inibir os níveis intracelulares de EROs e que essa redução pode acontecer diretamente pelo sequestro dessas espécies ou indiretamente através da habilidade de inibir a expressão da enzima NADPH oxidase. Da mesma forma, PALOZZA et al (2011) também sugeriram que a redução da produção de EROs pelo licopeno se dá por um mecanismo que envolve a inibição da NADPH oxidase.

Apesar de alguns trabalhos na literatura observarem o efeito do licopeno na inibição da NADPH oxidase, este é o primeiro estudo que sugere o envolvimento do licopeno na modulação da via de sinalização da PKC. Sendo assim, nossos resultados sugerem que o efeito do licopeno sobre a produção de EROs em células estimuladas por PMA e ionomicina está relacionada à inibição desta via. Entretanto, mais experimentos são necessários para validar esta hipótese.

A análise de viabilidade celular é uma ferramenta bastante útil em vários procedimentos experimentais, incluindo aqueles que objetivam avaliar a morte espontânea de células expostas a diferentes condições (CHAN et al., 2012). Tendo a integridade da membrana como critério básico para a distinção entre células vivas e mortas, o ensaio de Azul de Tripán é muito utilizado para avaliar a citotoxicidade em investigações experimentais. Neste ensaio, por perderem a seletividade da membrana, as células mortas absorvem o Azul de Tripán para o citoplasma e são coradas de azul, enquanto as células vivas permanecem intactas e não coradas (TENNANT, 1964). Neste estudo o ensaio com Azul de Tripán permitiu a avaliação da citotoxicidade do licopeno em todos os experimentos realizados. Os resultados mostraram que o licopeno

não afetou a viabilidade das células SK-HEP-1. Quando o ensaio de Azul de Tripán é realizado em um grande número de amostras, pode proporcionar resultados de baixa precisão devido ao longo tempo de execução e ao intensivo exame microscópico (KIM et al., 2011). Tais limitações foram consideradas e, para a realização dos ensaios, foram utilizadas amostras de número reduzido de modo a agilizar o trabalho e evitar perdas de precisão dos resultados.

A SOD é uma enzima considerada a primeira linha de defesa contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo em células. Ela sequestra EROs ao catalizar a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (ONYEKA et al, 2012). Já a catalase decompõe o peróxido de hidrogênio e é considerada como uma proteção contra os radicais hidroxila (KIM et al, 2006). Este estudo mostrou que, diante da estimulação com PMA e ionomicina, a incubação com licopeno a 10 μM por 6 horas foi capaz de aumentar significativamente a atividade da SOD. A atividade da CAT não sofreu alterações em nenhuma das concentrações e tempos estudados.

CHEN et al (2010) avaliaram o efeito do licopeno na atividade da SOD em células vasculares do músculo liso. Os resultados mostraram que o licopeno aumentou a atividade desta enzima, principalmente na concentração de 1 μM . DANIEL et al (2015) avaliaram o efeito do licopeno na atividade da SOD e da CAT em ratos Wistar diabéticos. Foi observado um aumento na atividade de SOD e CAT diante do tratamento com licopeno nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/kg. SULOGLU et al (2014) investigaram o efeito do licopeno em fígado de ratos e nos marcadores do estresse oxidativo. Assim com o relatado no presente estudo, o licopeno foi capaz de aumentar a atividade da SOD e não provocou qualquer alteração na atividade da enzima catalase.

7. CONCLUSÃO

Este estudo sugere que o licopeno pode ter a habilidade de proteger as células SK-Hep-1 do estresse oxidativo através da modulação da geração de EROs, modulação da PKC, além de estimular a atividade da enzima antioxidante SOD. Entretanto, mais experimentos são necessários para validar esta hipótese.

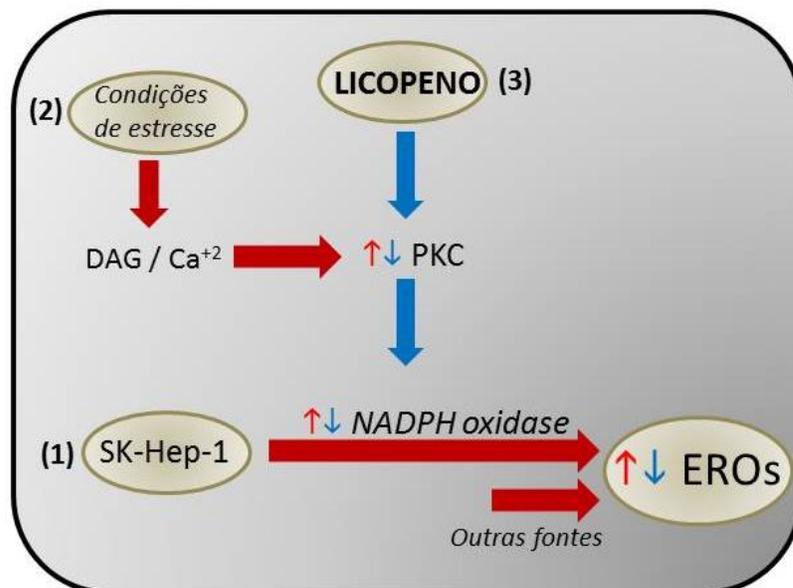


Figura 11: Hipótese de atuação do licopeno em células da linhagem de hepatocarcinoma SK-Hep-1. Setas azuis indicam inibição, setas vermelhas indicam ativação. (1) A produção de EROs em células da linhagem SK-Hep-1 é dependente, em grande parte, da ativação da NADPH oxidase. Uma pequena parte, decorrente de outras fontes como, por exemplo, a respiração mitocondrial (metabolismo basal). (2) Células de linhagem tumoral estariam expostas à um maior desequilíbrio redox, conduzindo a um aumento na concentração de DAG e liberação de cálcio, levando a uma ativação da PKC e consequentemente da enzima NADPH oxidase, aumentando assim, a produção de espécies reativas. (3) Já o licopeno atuaria como um inibidor da via de PKC, conduzindo a uma menor geração de EROs proveniente da NADPH oxidase.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, S.; RAO, A. V. **Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases.** Canadian Medical Association Journal. 163: 739-44. 2000.

BABIOR, B. M. **NAPH oxidase: an update.** Blood. 93: 1464-1476. 1999.

BLANCHE, C.; WANG, X-D. **Non-Alcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma: Implications for Lycopene Intervention.** Nutrients. 6: 124-162. 2014.

BOILEAU, T. W. M.; BOILEAU, A.C.; ERDMAN, J.W. **Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene.** Experimental Biology and Medicine. 227: 914-919. 2002.

BOJÓRQUEZ, R.M.C.B.; GALLEGU, J.G.; COLLADO, P.S. **Propiedades funcionales y beneficios para La salud del licopeno.** Nutrición Hospitalaria. 28: 6-15. 2013.

BOSCH, F.X.; RIBES, J.; DI'AZ, M.; CLERIES, R. **Primary liver cancer: worldwide incidence and trends.** Gastroenterology. 127: 5-17. 2004.

BREINHOLT, V.; LAURIDSEN, S.T.; DANESHVAR, B.; JAKOBSEN, J. **Dose-response effects of lycopene on selected drugmetabolizing and antioxidant enzymes in the rat.** Cancer Letters. 154: 201-210. 2000.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H.P. **Carotenoids: Handbook.** Springer: Basle, Switzerland, 2004.

CARTER, C.A.; KANE, C. J. M. **Therapeutic Potential of Natural Compounds that Regulate the Activity of Protein Kinase C.** Current Medicinal Chemistry.11: 2883-2902. 2004.

CHAN L.L.; WILKINSON, A.R. PARADIS, B.D. LAI, N. **Rapid image-based cytometry for comparison of fluorescent viability staining methods.** J Fluoresc. 22: 1301-1311. 2012.

CHEN, L-P.; HE, S-Y.; ZHENG, H. DAY, Y-L. **Effects and mechanisms of Lycopene on the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells.** Chinese Journal of Natural Medicines.8: 0218–0222. 2010.

CLINTON, S.K. **Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease.** Nutrition Reviews. 56: 35-51. 1998.

COHEN, L.A. **A review of animal model studies of tomato carotenoids, lycopene, and cancer chemoprevention.** Experimental, Biology and Medicine. 227: 864-868. 2002.

CUNHA, K. C. S. **Sobrevida das células ganglionares das células ganglionares da retina induzida pelo PMA: envolvimento da PKC e JNK.** 74f. Trabalho de Conclusão de Curso - (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.

DANIEL, E.E.; MOHAMMED, A.; TANKO, Y.; AHMED, A. **Effects of lycopene on kidney antioxidant enzyme activities and functions in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats.** Cell Biology. 3: 1-13. 2015.

DI MASCIIO, P.; RAISER, S. SIES, H. **Lycopene as the Most Efficient Biological Carotenoid Singlet Oxygen Quencher.** Arquivos of Biochemistry and Biophysics. 274: 532-538. 1989.

DU, X.; MATSUMURA, T.; EDELSTEIN, D.; ROSSETTI, L.; ZSENGELLÉR, Z.; SZABÓ, C., et al. **Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells.** The Journal of Clinical Investigation.112: 1049-1057. 2003.

DURACKOVA, Z. **Some Current Insights into Oxidative Stress.** Physiological Research. 59: 459-469. 2010.

EGLASS, S.; COOPER, A.; CHOPRA, M. **Lycopene inhibits angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells and rat aortic rings.** *British Journal of Nutrition.* 108: 431-439. 2012.

ELIASSEN, A.H.; HENDRICKSON, S.J.; BRINTON, L.A., et al. **Circulating Carotenoids and Risk of Breast Cancer: Pooled Analysis of Eight Prospective Studies.** *Journal of the National Cancer Institute.* 24: 1905-1916. 2012.

EL-SARAG, H.B.; RUDOLPH, K.L. **Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis.** *Gastroenterology.* 132: 2557-2576. 2007.

FONTAYNE, A.; CHAN DANG, P. M.; POCIDALO, M.A.G.; BENNA, J.E. **Phosphorylation of p47^{phox} Sites by PKC α , β II, δ , and ζ : Effect on Binding to p22^{phox} and on NADPH Oxidase Activation.** *Biochemistry.* 41: 7743-7750. 2002.

FORD, N.A.; CLINTON, S. K.; LINTIG, J.V.; WYSS, A; ERDMAN, J.W. **Loss of Carotene-9', 10'-Monooxygenase Expression Increases Serum and Tissue Lycopene Concentrations in Lycopene-Fed Mice.** *The Journal of Nutrition.* 140: 2134-2138. 2010.

FORMAN, H.J.; TORRES, M. **Redox signaling in macrophages.** *Molecular Aspects of Medicine.* 22: 189-216. 2001.

FORNELLI, F.; LEONE, A.; VERDESCA, I.; MINERVINI, F.; ZACHEO, G. **The influence of lycopene on the proliferation of human breast cell line (MCF-7).** *Toxicology in Vitro.* 21: 217-223. 2007.

FRIDOVICH, I. **Superoxide radical and superoxide dismutases.** *Annual Review of Biochemistry.* 64: 97-112. 1995.

GIOVANNUCCI, E. **Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: review of the epidemiologic literature.** *Journal of the National Cancer Institute.* 91: 317-331. 1999.

GOMES, D. C.; MACHADO, N. R.; FERNANDES, J. R. M. **Cell Signaling through Protein Kinase C Oxidation and Activation.** International Journal of Molecular Sciences. 13: 10697-10721. 2012.

GOPALAKRISHNA, R.; JAKEN, S. **Protein Kinase C Signaling and Oxidative Stress.** Free Radical Biology & Medicine. 28: 1349-1361. 2000.

HAUSLADEN, A.; STAMLER, J.S. **Nitrosative stress.** Methods in Enzymology. 300: 389-395. 1999.

HU, C.T.; WU, J.R.; CHENG, C.C.; WANG, S.; WANG, A.T.; LEE, M.C.; WANG, L.J.; PAN, S.M.; CHANG, T.Y.; WU, W.S. **Reactive oxygen species-mediated PKC and integrin signaling promotes tumor progression of human hepatoma HepG2.** Clinical & Experimental Metastasis. 28: 851-863. 2011.

INOBUCHI, T.; SONTA, T.; TSUBOUCHI, H.; ETOH, T.; KAKIMOTO, M.; SONODA, N.; SATO, N.; SEKIGUCHI, N.; KOBAYASHI, K.; SUMIMOTO, H.; UTSUMI, H.; NAWATA, H. **Protein Kinase C-Dependent Increase in Reactive Oxygen Species (ROS) Production in Vascular Tissues of Diabetes: Role of Vascular NAD(P)H Oxidase.** Journal of American Chemical Society of Nephrology. 14: 227-232. 2003.

ISHIKAWA, K.; TAKENAGA, K.; AKIMOTO, N.; KOSHIKAWA, A.; YAMAGUCHI, H.; IMANISHI, K.; HAYASHI, H.J. **ROS generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis.** Science. 320: 661-664. 2008.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. **Global Cancer Statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians.** 61: 69-90. 2011.

KANG, J.H.; **Protein Kinase C (PKC) Isozymes and Cancer.** New Journal of Science. 36 pages. 2014.

KANOPKA, K., PRETZER, E., FELGNER, P.L., DUZGUNES, N. **Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of**

macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1312: 186-196, 1996.

KIM, B-J.; HOOD, B.L.; RICHARD, A.A.; HARDWICK, J.P.; CONRADS, T.P.; VEENSTRA, T.D.; SONG, B.J. **Increased oxidation and degradation of cytosolic proteins in alcohol-exposed mouse liver and hepatoma cells.** *Proteomics.* 6: 1250–1260. 2006.

KIM, J.S.; NAM, M.H. AN, S.S.; LIM, C.S.; HUR, D.S.; CHUNG, C. et al. **Comparison of the automated fluorescence microscopic viability test with the conventional and flow cytometry methods.** *J Clin Lab Anal.* 25: 90-94. 2011.

KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. **Lessons from Hereditary Colorectal Cancer.** *Cell.* 87: 159-170. 1996.

KLAUNING, J.E.; KAMENDULIS, L.M. **The role of oxidative stress in carcinogenesis.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 44: 239-267. 2004.

LAMBETH, J. D. **Nox enzymes, ROS, and chronic disease: An example of antagonistic pleiotropy.** *Free Radical Biology & Medicine.* 43: 332-347. 2007.

LEE, H. B.; YU, M.R.; SONG, J.S.; HA, H. **Reactive oxygen species amplify protein kinase C signaling in high glucose-induced fibronectin expression by human peritoneal mesothelial cells.** *Kidney International.* 65: 1170-1179. 2004.

LEE, H.B.; YU, M.; YANG, Y.; JIANG, Z.; HA, H. **Reactive Oxygen Species-regulated Signaling Pathways in Diabetic Nephropathy.** *Journal of American Chemical Society of Nephrology.* 14: 241-245. 2003.

LEUNG, T.M.; NIETO, N. **CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease.** *Journal of Hepatology.* 58: 395-398. 2013.

LI, J.; GOBE, G. **Protein kinase C activation and its role in kidney disease.** *Nephrology.* 11: 428-434. 2006.

LI, S.; WANG, X.; WU, Y.; ZHANG, H.; ZHANG, L.; WANG, C.; ZHANG, R.; GUO, Z. **8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine expression predicts hepatocellular carcinoma outcome.** *Oncology Letters*. 3: 338-342. 2012.

LOUISA, M.; SUYATNA, F.D.; SETIAWATI, A.; JUSMAN, S.W.A. **The effect of lycopene on the total cytochrome P450, CYP1A2 and CYP2E1.** *Medical Journal of Indonesia*. 18: 233-238. 2009.

LOWE, G.M.; BOOTH, L.A.; YOUNG, A.J.; BILTON, R.F. **Lycopene and β -carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses.** *Free Radical Research*. 30: 141-151. 1999.

LU, R.; DAN, H.; WU, R.; MENG, W.; LIU, N.; JIN, X.; ZHOU, G.; CHEN, Q. **Lycopene: Features and potential significance in the oral cancer and precancerous lesions.** *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 40: 361-8. 2011.

MANGELS, A.R.; HOLDEN, J.M.; BEECHER, G.R.; FORMAN, M.R.; LANZA, E. **Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data.** *Journal of the American Dietetic Association*. 93: 284-296. 1993.

MAYNE, S.T.; CARTMEL, B.; LIN, H.; ZHENG, T.; Goodwin, W.J. **Low plasma lycopene concentration is associated with increased mortality in a cohort of patients with prior oral, pharynx or larynx cancers.** *Journal of the American College of Nutrition*. 23: 34-42. 2004.

MEIN, J.R.; LIAN, F.; WANG, X-D. **Biological activity of lycopene metabolites: implications for cancer prevention.** *Nutrition Reviews*. 66: 667-683. 2008.

MOURA, P. R.; VIDAL, F.A.P. **Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G.** *Sci. Med*. 21: 31-36. 2011.

MURADIANA K.K.; UTKO, N.A.; FRAIFELD, V.; MOZZHUKHINA, T.G.; PISHEL, I.N. LITOSHENKO, A.Y. **Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase**

activities in the liver of young and old mice: linear regression and correlation.

Archives of Gerontology and Geriatrics. 35: 205-211. 2002.

NAVARRO, A.; GOMEZ, C.; SANCHEZ-PINO, M.J.; GONZALEZ H.; BANDEZ, M.J.; BOVERIS, A.D. ET al. **Vitamin E at high doses improves survival, neurological performance, and brain mitochondrial function in a ging male mice.** American Journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology. 289(5): 1392-1399. 2005.

NEWTON, A.C. **Protein Kinase C: Structure, Function, and Regulation.**The Journal of Biological Chemistry. 270: 28495-28498. 1995.

NORDBERG, J.; ARNER, E.S.J. **Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system.** Free Radical Biology & Medicine. 31: 1287-1312. 2001.

OBROSOVA, I.G.; DREL, V.R., PACHER, P.; ILNYTSKA, O.; WANG, Z.Q.; STEVENS, M.J., et al. **Oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation in experimental diabetic neuropathy: the relation is revisited.** Diabetes. 54: 3435-3441. 2005.

ONYEKA, C.A.; NWAKANMA, A.A.; BAKARE, A.A.; OKOKO, I.I.; OFOEGO, U.C.; WALI, C.C.; ABENGOWE, FC. **Hypoglycemic, Antioxidant and Hepatoprotective Activities of Ethanolic Root Bark Extract of *Chrysophyllum albidum* in Alloxan-Induced Diabetic Rats.** Bangladesh Journal of Medical Science.12: 298-304. 2013.

PALOZZA, P.; PARRONE, N.; CATALANO, A.; SIMONE, R. **Tomato Lycopene and Inflammatory Cascade: Basic Interactions and Clinical Implications.** Current Medicinal Chemistry. 17: 2547-2563. 2010.

PALOZZA, P.; SIMONE, R. E.; CATALANO, A.; MELE, M.C. **Tomato Lycopene and Lung Cancer Prevention: From Experimental to Human Studies.** Cancers. 3: 2333-2357. 2011.

PALOZZA, P.; SIMONE, R.; CATALANO, A.; MONEGO, G.; BARINI,A.; MELE, MC.; PARRONE, N.; TROMBINO, S.; PICCI, N.; RANELLETTI, F.O. **Lycopene prevention of oxysterol-induced proinflammatory cytokine cascade in human macrophages: inhibition of NF- κ B nuclear binding and increase in PPAR γ expression.** *Journal of Nutritional Biochemistry.* 22: 259-268. 2011.

PALOZZA,P.; PARRONE, N.; SIMONE, R.; CATALANO, A. **Role of Lycopene in the Control of ROS-Mediated Cell Growth: Implications in Cancer Prevention.** *Current Medicinal Chemistry.* 18: 1846-1860. 2011.

PERDOMO, F.F.; FRÁÑQUIZ, F.C.; CABRERA, J.; SERRA-MAJEM, L. **Influencia del procedimiento culinário sobre La biodisponibilidad Del licopeno em el tomate.** *Nutrición Hospitalaria.* 27: 1542-1546. 2012.

PITOT, H.C. **The molecular biology of carcinogenesis.** *Cancer.* 72: 962-970. 1993.

RAFI, M.M.; YADAV, P.N.; REYES, M. **Lycopene inhibits LPS-induced proinflammatory mediator inducible nitric oxide synthase in mouse macrophage cells.** *Journal of Food Science.* 72: 69-74. 2007.

RAKOFF-NAHOUN, S.**Why Cancer and Inflammation?** *Yale Journal of Biology and Medicine.* 79: 123-130. 2006.

SERONELLO, S.; SHEIKH, M.Y.; CHOI, J. **Redox regulation of hepatitis C in nonalcoholic and alcoholic liver.** *Free Radical Biology & Medicine.* 43: 869-882. 2007.

SINGH, M.; KRISHANAPPA, R.; BAGEWADI,A.; KELUSKAR, V. **Efficacy of oral lycopene in the treatment of oral leukoplakia.** *Oral Oncology.* 40: 591-6. 2004.

SLOW, Y. L.; YEUNG, K.K.W.A.; WOO, C.W.H.; O, K. **Homocysteine stimulates phosphorylation of NADPH oxidase p47phox and p67phox subunits in monocytes via protein kinase C β activation.** *Biochem. J.* 398: 73-82. 2006.

STEINBERG, S. F. **Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function.** *Physiological Reviews.* 88: 1341-1378. 2008.

SULOGLU, A.K.; GIRGIN, G.; SELMANOGLU, G.; BALC, S.; BAYDAR, T. **Possible effects of lycopene and silymarin on rat liver functions and oxidative stress markers.** *Turkish Journal of Biochemistry–Turk.* 39:344–350. 2014.

SUZUKI, Y.; IMAI, K.; TAKAI, K. HANAI, T.; HAYASHI, H.; NAIKI, T.; NISHIGAKI, Y.; TOMITA, E.; SHIMIZU, M.; MORIWAKI, H. **Hepatocellular carcinoma patients with increased oxidative stress levels are prone to recurrence after curative treatment: a prospective case series study using the d-ROM test.** *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* 139: 845-852. 2013.

TANAKA, S.; MOGUSHI, K.; YASEN, M.; BAN, D.; NOGUCHI, N.; IRIE, T.; KUDO, A.; NAKAMURA, N.; TANAKA, H.; YAMAMOTO, M.; KOKUDO, N.; TAKAYAMA, T.; KAWASAKI, S.; SAKAMOTO, M.; ARII, S. **Oxidative Stress Pathways in Noncancerous Human Liver Tissue to Predict Hepatocellular Carcinoma Recurrence: A Prospective, Multicenter Study.** *Hepatology.* 54: 1273-1281. 2011.

TENNANT, J.R. **Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability.** *Transplantation.* 2: 685-694. 1964.

TEODORO, A.J.; OLIVEIRA, F. L.; MARTINS, N. B.; MAIA, G.A.; MARTUCCI, R.B.; BOROJEVIC, R. **Effect of lycopene on cell viability and cell cycle progression in human cancer cell lines.** *Cancer cell international.*12-36. 2012.

TREJO-SOLÍS, C.; PEDRAZA-CHAVERRÍ, J.; TORRES-RAMOS, M.; JIMÉNEZ-FARFÁN, D.; SALGADO, A.C.; SERRANO-GARCÍA, N.; OSÓRIO-RICO, L.; SOTELO, J. **Multiple Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Lycopene in Cancer Inhibition.***Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* Articulo ID 705121, 17 páginas. 2013.

VELMURUGAN, B.; BHUVANESWARI, V.; BURRA, U.K.; NAGINI, S. **Prevention of N-methyl-N'-nitroso-guanidine and saturated sodium chloride-induced gastric carcinogenesis in Wistar rats by lycopene.** European Journal of Cancer Prevention. 11: 19-26. 2002.

VITALE, A.A.; BERNATENE, E. A.; POMILIO, A.P. **Carotenoides en quimiopreencion: Licopeno.** Acta Bioquímica Clínica Latino americana. 44 (2): 195-238. 2010.

WEYEMI, U.; RENDON, C.E.; PAREKH, P. R.; DUPUY, C.; BONNER, W. **NADPH Oxidases Noxs and DUOXs as Putative Targets for Cancer Therapy.** Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. 13: 502-514. 2013.

WU, W. S.; TSAI, R. K.; CHANG, C. H.; WANG, S.; WU, J.R.; CHANG, Y.X. **Reactive Oxygen Species Mediated Sustained Activation of Protein Kinase C A and Extracellular Signal-Regulated Kinase for Migration of Human Hepatoma Cell Hepg2.** Molecular Cancer Research. 4: 747-758. 2006.

WU, W-S. **The signaling mechanism of ROS in tumor progression.** Cancer Metastasis Rev. 25:695–705. 2006.

YORGOV, M.M.; MARIE, N.; BORDERIE, D.; DJELIDI, R.ROUSSELOT, D.B.; LEGRAND, A.; BEAUDEUX, J-L., PEYNET, J. **Metformin suppresses high glucose-induced poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase overactivation in aortic endothelial cells.** Metabolism Clinical and Experimental 58: 525–533. 2009.

YOUNG, A.J.; LOWE, G.M. **Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids.** Archives of Biochemistry and Biophysics. 385: 20-27. 2001.

YU, M.C.; YUAN, J.M.; LU, S.C. **Alcohol, cofactors and the genetics of hepatocellular carcinoma.** Journal of Gastroenterology and Hepatology. 23: 92-97. 2008.

ZHANG, J.; DHAKAL, I.; STONE, A.; NING, B.; GREENE, G.; LANG, N.P. KADLUBAR, F.F. **Plasma Carotenoids and Prostate Cancer: A Population-Based Case-Control Study in Arkansas.** Nutrition and Cancer. 59, Iss. 1. 2007.

ZHAO, X.; XU, B.; BHATTACHARJEE, A.; OLCFIELD, C. M.; WIENTJES, F.B.; FELDMAN, G.M.; CATHCART, M.K. **Protein kinase C regulates p67phox phosphorylation in human monocytes.** Journal of Leukocyte Biology. 77: 414-420. 2005.

ZOU, J.; FENG, D.; LING, W-H.; DUAN, R-D. **Lycopene suppresses proinflammatory response in lipopolysaccharide stimulated macrophages by inhibiting ROS-induced trafficking of TLR4 to lipid raft-like domains.** Journal of Nutritional Biochemistry. 24: 1117-1122. 2013.