

Avaliação da Atividade Fotoquimioprotetora da Divanilina

Bruna Lenzion Alves (PIBIC/CNPq), Andressa Fumagalli Dacome, Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager (Orientadora), e-mail: lautenschlager@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Básicas Saúde/Maringá, PR.

Farmácia/ Farmacognosia

Palavras-chave: Fotoquimioproteção; Radiação UVB, Espécies Reativas de Oxigênio

Resumo:

A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) gera um desequilíbrio redox nas células, levando à promoção de danos celulares. Para diminuir ou inibir esse desequilíbrio, pode-se utilizar substâncias antioxidantes, as quais entre elas está a divanilina. Afim de investigar a atividade fotoquimioprotetora da divanilina células L-929 pré tratadas com divanilina foram submetidas a radiação UVB e seguidas da avaliação da atividade de glutatona (GSH) pela formação de um produto fluorescente, produto da reação entre os grupos tióis (SH) e fluorocromo OPT (o-ftaladeído). Também avaliou-se a produção de EROs, utilizando o marcador H₂DCFDA e o potencial de membrana mitocondrial, utilizando-se o marcador TMRE. Os resultados mostraram que a divanilina aumentou significativamente o potencial de membrana mitocondrial em células L-929 irradiadas com UVB comparadas à células não tratadas e irradiadas com UVB. Esse resultado evidencia um possível mecanismo de ação fotoquimioprotetora da divanilina

Introdução

A exposição contínua de radiação ultravioleta na pele leva à formação de EROs, contribuindo para o desenvolvimento de uma variedade de patologias da pele, incluindo inflamação, envelhecimento degenerativo e câncer. Mesmo que o organismo possua um sistema antioxidante próprio, a produção excessiva de EROs leva a um estresse oxidativo prejudicial para a célula (VASCONCELOS et al., 2007).

Como maneira de evitar o estresse oxidativo, podem ser usadas substâncias antioxidantes, entre elas estão as substâncias fenólicas, que possuem alta capacidade de eliminação de radicais livres (KASOTE, et al., 2015). A divanilina é um homodímero da vanilina, esta, por sua vez, é um composto fenólico, a qual possui diversas atividades biológicas (JANTAREE et al., 2017).

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade fotoquimioprotetora da divanilina em células L-929 irradiadas com luz UVB.

Materiais e métodos

Avaliação dos níveis de GSH:

Determinou-se a atividade da GSH intracelular por meio da formação de um produto fluorescente, causado pela reação entre os grupos tióis (SH) e fluorocromo OPT (o-ftaladeído). Dessa forma, células L-929 (4×10^5 células/mL) foram plaqueadas em placa de 6 poços e incubadas durante 24 h. Após foi realizado um pré-tratamento com divanilina na concentração de 200 μM por 1 hora. Em seguida as células foram irradiadas com 600 mJ/cm^2 de UVB e incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO_2 por 24 horas. Preparou-se o lisado celular por meio do deslocamento das células L929 com auxílio do scraper em tampão de lise [10 mM tris-HCl (pH 7.4)], 1% triton X-100], seguido de sonicação (4C15, Branson Ultrasonics ®) por 60 s e centrifugação a 14000 rpm/4°C por 10 min. O sobrenadante foi coletado e realizado a quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford. Uma solução reagente contendo 10 μL do lisado celular, 180 μl de tampão fosfato de sódio [100 mM, 5 mM EDTA (pH 8)] e 10 μL de OPT (1 mg/ml em metanol) foi incubada por 15 min a temperatura ambiente, a fluorescência foi mensurada a 350/420 nm de excitação/emissão (Victor ® X3 multilabel plate reader, Perkin–Elmer). A concentração de GSH foi calculada em comparação com a curva de calibração utilizando-se padrão de GSH.

Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio:

Determinou-se a produção de EROs pelo ensaio com 2',7' diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA), um marcador não fluorescente que difunde-se nas células, e é oxidado por EROs intracelulares originando um composto fluorescente. Para esse experimento, células L-929 ($2,5 \times 10^5$ células/mL) em DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) foram plaqueadas em microplaca preta de 96 poços durante 24 horas em estufa a 37°C, 5% de CO_2 . Após as 24 h, as células foram lavadas com PBS e marcadas com (10 μM) H_2DCFDA em Hanks, durante 45 minutos a abrigo da luz. Posteriormente, retirou-se o tampão e o tratamento com divanilina na concentração de 200 μM foi realizado por 1 h. Em seguida, as células foram irradiadas em tampão Hanks com uma dose de 600 mJ/cm^2 . A leitura foi realizada no espectrofluorímetro (VICTORTM X3, PerkinElmer) a 525 nm. Para a dosagem de proteína, utilizou-se Triton 0,2%. A análise foi feita a partir de uma alíquota de 10 μL da solução retirada e adicionada em placa de 96 poços transparente contendo 100 μL de Bradford a 25%, após 5 min a leitura pode ser realizada em leitor de microplacas (Bio-Tek®, Power Wave XS) a 595 nm.

Avaliação do potencial de membrana mitocondrial:

Determinou-se o potencial de membrana mitocondrial por meio da fluorescência do Tetramethylrhodamine, Ethyl Ester, Perchlorate (TMRE), que se acumula em mitocôndrias ativas. Para esse experimento, células L-929 ($2,5 \times 10^5$ células/mL) foram plaqueadas em DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico em microplaca preta de 96 poços. Após a formação da monocamada celular, foi realizado o tratamento por uma hora, e irradiadas com uma dose de 600 mJ/cm^2 em tampão Hanks. Posteriormente, as células foram incubadas com DMEM por 24 horas. Então, as células foram marcadas com o marcador TMRE

por 30 minutos, lavadas com tampão PBS, e a leitura foi realizada utilizando espectrofluorímetro (VICTORTM X3, PerkinElmer) a 540 nm. Para obtenção de dosagem de proteína, adicionou-se Triton 0,2% aos poços. A leitura da absorbância da alíquota de 10 µL do lisado e 200 µL de Bradford a 25%, foi realizada em leitor de microplacas (Bio-Tek®, Power Wave XS) a 595 nm.

Resultados e Discussão

Quanto a metodologia que quantifica a enzima glutationa peroxidase (GSH), a concentração de 200 µM de divanilina possibilitou um aumento na concentração de GSH nas células tratadas e irradiadas. Este aumento não foi significativo em relação as células submetidas à radiação e não tratadas (UVB).

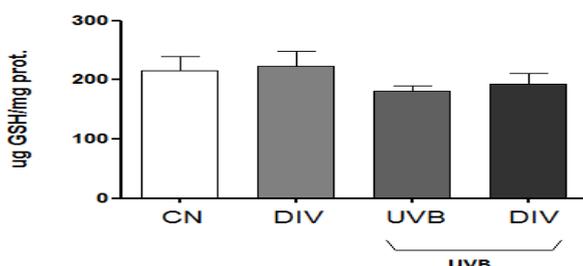


Figura 1. Quantificação da atividade antioxidante da GSH em células L929 irradiada com UVB (600 mJ/cm^3). CN: células não irradiadas e não tratadas. UVB: células irradiadas com UVB e não tratadas. DIV: células não irradiadas e tratadas com divanilina (200 µM). DIV: células irradiadas (UVB) e tratadas com divanilina (200 µM) (one-way, ANOVA, pós teste de Tukey) ($p < 0,05$).

Foi observado também que a divanilina foi capaz de melhorar o potencial de membrana mitocondrial em células expostas a radiação UVB. O potencial de membrana mitocondrial tem papel importante não somente na síntese de ATP, mas também, no transporte de compostos carregados, sendo alguns deles essenciais para a viabilidade mitocondrial (ZOROVA et al., 2017). Desta forma, esse resultado indica um possível mecanismo de ação da divanilina como fotoquimioprotetor.

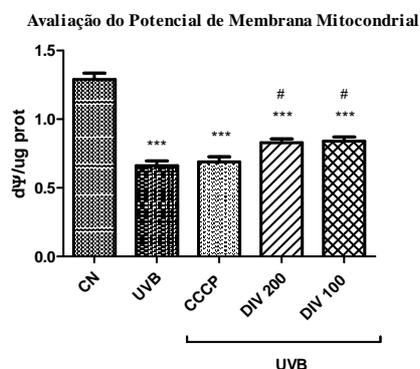


Figura 2. Quantificação do potencial de membrana mitocondrial em células L929 irradiada com UVB (600 mJ/cm^3). CN: células não irradiadas e não tratadas. UVB: células irradiadas com UVB e não tratadas, DIV: células tratadas com divanilina, CCCP: células tratadas com CCCP. ***($p < 0,001$) indicam diferença significativa comparado com Células não irradiadas e # ($p < 0,05$) comparado com Célula Irradiada de acordo com o Teste de Tukey.

Para a avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio observou-se que a divanilina na concentração de 200 μ M, não induziu atividade sequestradora de espécies reativas de oxigênio. Sendo assim necessário testar outras concentrações de divanilina para melhor concluir se a divanilina apresenta capacidade em inibir a produção de EROs em células L-929 irradiadas com UVB..

Conclusões

A partir do estudo preliminar realizado pode-se concluir que a divanilina apresentou um potencial fotoquimioprotetor, evidenciado pelo aumento do potencial de membrana mitocondrial em células L-929 irradiadas com radiação UVB.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo auxílio e Bolsa de iniciação científica.

Referências

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, V. M. M. S.; KUBOTA, L. T. **Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação.** Química Nova, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

JANTAREE, P.; LIRDPRAPAMONGKOL, K.; KAEWSRI, W.; THONGSORNKLEEB, C.; CHOOWONGKOMON, K.; ATJANASUPPAT, K.; RUCHIRAWAT, S.; SVASTI, J. **Homodimers of vanilin and apocynin decrease the metastatic potential of human cancer cells by inhibiting the FAK/PI3K/Akt signaling pathway.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 65, p. 2299-2306, 2017.

KASOTE, Deepak M. et al. **Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications.** International Journal Of Biological Sciences, [s.l.], v. 11, n. 8, p.982-991, 2015. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.12096>.

L.D. Zorova, V.A. Popkov, E.Y. Plotnikov, D.N. Silachev, I.B. Pevzner, S.S. Jankauskas, V.A. Babenko, S.D. Zorov, A.V. Balakireva, M. Juhaszova, S.J. Sollott, D.B. Zorov, **Mitochondrial membrane potential**, Analytical Biochemistry (2017), doi: 10.1016/j.ab.2017.07.009