

## 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 H<sub>2</sub>DCFDA 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 ( $4 \times 10^5$  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  $\mu$ M por 1 hora. Em seguida as células foram irradiadas com 600 mJ/cm<sup>2</sup> de UVB e incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ L do lisado celular, 180  $\mu$ l de tampão fosfato de sódio [100 mM, 5 mM EDTA (pH 8)] e 10  $\mu$ L 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<sub>2</sub>DCFDA), 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<sub>2</sub>. Após as 24 h, as células foram lavadas com PBS e marcadas com (10  $\mu$ M) H<sub>2</sub>DCFDA em Hanks, durante 45 minutos a abrigo da luz. Posteriormente, retirou-se o tampão e o tratamento com divanilina na concentração de 200  $\mu$ M foi realizado por 1 h. Em seguida, as células foram irradiadas em tampão Hanks com uma dose de 600 mJ/cm<sup>2</sup>. 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  $\mu$ L da solução retirada e adicionada em placa de 96 poços transparente contendo 100  $\mu$ L de Bradford a 25%, após 5 min a leitura pode ser realizada em leitor de microplacas (Bio-Tek®, Power Wave XS) a 595 nm.

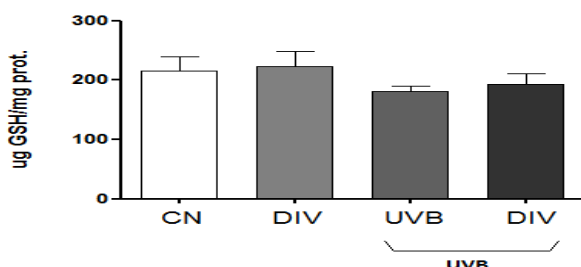
### *Avaliação do potencial de membrana mitocondrial:*

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<sup>2</sup> 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.

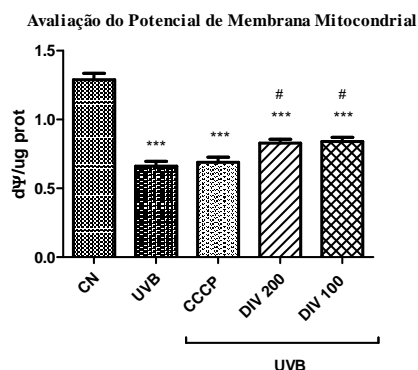
## Resultados e Discussão

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 ( $600 \text{ mJ/cm}^3$ ). 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 ( $600 \text{ mJ/cm}^3$ ). 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  $\mu$ 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