UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO

Betina Schmidt

RESVERATROL, CURCUMINA E PIPERINA: BIOATIVIDADE EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO MCF-7

Rio de Janeiro

2015

Betina Schmidt

RESVERATROL, CURCUMINA E PIPERINA: BIOATIVIDADE EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO MCF-7

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor em Nutrição.

Orientadora: Prof.ª Eliane Fialho de Oliveira

Rio de Janeiro

2015

SCHMIDT, Betina

Resveratrol, Curcumina e Piperina: Bioatividade em Células de Adenocarcinoma Mamário Humano MCF-7 / Betina Schmidt – Rio de Janeiro.
105 f.il

Tese: Doutorado em Ciências Nutricionais – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, 2015.

Orientadora: Eliane Fialho de Oliveira.

1. Resveratrol 2. Curcumina 3. Piperina 4. AGEs 5. Câncer de mama – Teses. I. Fialho de Oliveira, Eliane. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro. III. Título.

Betina Schmidt

RESVERATROL, CURCUMINA E PIPERINA: BIOATIVIDADE EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO MCF-7

Tese submetida ao Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Nutrição.

Banca Examinadora:

_____

Profª. Tatiana El-Bacha Porto
Professora Adjunta do Instituto de Nutrição Josué de Castro, UFRJ
Revisora

_____

Profª. Mariana Costa Monteiro
Professora Adjunta do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/ INJC/ UFRJ
Titular Interno

_____

Profª. Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek
Professora Titular do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ
Titular Externo

_____

Prof. Anderson Junger Teodoro
Professor Associado do Departamento de Tecnologia de Alimentos/ Escola de Nutrição/ UNIRIO
Titular Externo

Profª. Marta Citelli dos Reis
Professora Adjunta do Instituto de Nutrição da UERJ
Titular Externo

Profª. Cristiana Pedrosa Melo Porto
Professora Associada do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/ INJC/ UFRJ
Suplente Interno

Prof. Robson de Queiroz Monteiro
Professor Associado do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ
Suplente Externo

Profª. Eliane Fialho de Oliveira
Professora Associada do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/ INJC/ UFRJ
Orientadora

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Alimentos Funcionais e Sementes (LABAFs) do Instituto de Nutrição Josué de Castro e no Centro Nacional de Bioimagem (Cenabio), ambos no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação da Profª. Eliane Fialho de Oliveira, na vigência de auxílios financeiros concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Fundação do Câncer, no período de outubro de 2011 a junho de 2015.

Dedico esta tese aos meus pais, Pedro e Citânia, meu irmão Alexandre,

meu marido Fabio e minha bebê Julia

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profª. Eliane Fialho, a Lili, pela oportunidade que me cedeu, mesmo sem me conhecer, abrindo as portas da família LABAFs. Pelo exemplo de pessoa doce, ética, responsável e visionária que és.

Ao Prof. Jerson Lima da Silva, que colaborou com este trabalho, disponibilizando equipamentos e instalações do seu laboratório.

À Profª. Tatiana El-Bacha, pelas sugestões pertinentes, pela atenção e carinho de sempre.

Ao meu orientador de mestrado, Marcos Luiz Santos Perry (*in memorian*), quem me apresentou os AGEs. Por ter ido muito além da bioquímica com seus ensinamentos.

À todos do laboratório do Prof. Jerson Lima da Silva, pela companhia na sala de cultura e pelo apoio no desenvolver da pesquisa.

À Julia, querida Jugi, pelo auxílio nos experimentos, pela alegria da convivência, pelos diálogos sobre pesquisa e pelas palavras incentivadoras de sempre.

À Lú, Chris e Rêzinha, pelo carinho, pela companhia nos congressos e disciplinas, pela atenção, amizade e ajuda neste finalzinho.

Ao Cielo (Marcelo) e à Dê, pelas longas conversas e reflexões sobre passado, presente e futuro.

À doce e conversadeira Paulona, pela disposição em ajudar sempre.

Aos demais colegas de laboratório, família LABAFs: Paty, Carol, Fabi, Ana Luisa, Vaguinho, Dani, Paulinha, Érika, Íris e Leidiane, pelo acolhimento no sorriso de todos os dias, pelas discussões nos *journals* do grupo e pela maciez no convívio.

À CAPES, FAPERJ e Fundação do Câncer, pelos auxílios financeiros recebidos, essenciais para a realização deste trabalho.

Aos meus chefes, Cláudia Valéria e Carlos Eduardo, coordenadores do curso de Nutriçao da UVA/RJ, Vera e Magda, coordenadoras do curso de Biologia da UVA/RJ e Ana Luiza, Carminha e Juliana, diretoras da escola Os Batutinhas. Pelo apoio, estímulo e compreensão durante estes quatro anos de estudo.

Às minhas grandes colegas de trabalho, parceiras de projetos e amigas, Giselle e Tatiana, por acreditar em mim e me motivar sempre que precisei. Pelas risadas e pelo carinho.

Às minhas amigas "*Best Friends*" de toda vida, Alice, Bru, Cacá, Cami, Fê, Gabi, Lívia, Mô e Vivs. Pela importância que tiveram, têm e sempre terão no meu caminho, por tornar tudo mais leve e mais engraçado, por participar da minha vida nestes trinta anos de convivência e por compreender meu sumiço durante estes quatro anos de dedicação. Amo vocês gurias!

Ao meu marido Fabio, parceiro e melhor amigo. Por me escutar, me incentivar e se orgulhar tanto das minhas conquistas. Por acreditar em mim mais do que eu mesma acredito. Pela família linda que construímos, pelas nossas vitórias e pelos nossos doces momentos juntos, que me motivam tanto a continuar.

Ao meu irmão Alexandre, pelo eterno exemplo que representas para mim. Pela ternura, pelas palavras e pela proteção ao longo de toda vida.

Aos meus pais, Pedro e Citânia, amores da minha vida, pelo carinho, exemplo e dedicação de uma vida inteira.

À minha pequena e encantadora Julia, que tão novinha já conquistou meu coração. Pela parceria durante este finalzinho corrido.

À beleza e acolhimento da natureza, que oportunizou minha trajetória até aqui. Obrigada pela minha extraordinária, ordinária vida!

"Go confidently in the directions of your dreams.

Live the life you've imagined"

- Henry David Thoreau –

RESUMO

Atualmente, o câncer de mama representa a neoplasia maligna mais comum entre as mulheres. Os produtos finais de glicação avançada (AGEs do inglês, *Advanced Glycation End-Products*) tem como precursores para sua formação os substâncias glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicosona, obtidas exógenamente por meio de alimentos ricos em aminoácidos e açúcares e submetidos a elevadas temperaturas, mas podem também ser gerados endogenamente por meio da hiperglicemia persistente e em vias de alta utilização de glicose, como no metabolismo de células cancerosas. Os precursores dos AGEs são deletérios para células saudáveis e para células cancerígenas, por esta razão, estas células otimizam seu sistema enzimático de detoxificação destes compostos, conhecido como sistema da glioxalase, que requer a glutationa reduzida (GSH) como cofator para ação da primeira enzima do sistema, a glioxalase 1 (GLO1). Os compostos bioativos dos alimentos (CBAs), como o resveratrol, a curcumina e a piperina, tem sido associados a efeitos quimioterápicos e quimiopreventivos e poderão influenciar as via de formação e detoxificação dos AGEs em células de câncer. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do resveratrol, da curcumina e da piperina, sobre o sistema da glioxalase e a ação destes compostos e dos precursores dos AGEs em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7. Tanto o resveratrol quanto a curcumina e a piperina reduziram a viabilidade das células MCF-7 por meio do ensaio de MTT, gerando valores de IC50 respectivamente iguais a 131 µM, 24,5 µM , 94,5 µM, em 24 horas de tratamento e 83,9 µM, 11,4 µM e 38,3 µM em 48 horas de tratamento. Estes dados foram confirmados pelo ensaio com azul de tripan. O metilglioxal e o glioxal geraram um IC50, em 24 horas de tratamento, igual a 2,8 mM. Este valor aumentado pode se associar a melhora da capacidade de detoxificação destes compostos pelo sistema da glioxalase na linhagem MCF-7. A 3-deoxiglicosona não se demonstrou citotóxica à MCF-7 neste trabalho. Ao tratar a MCF-7 com os valores de IC50 de cada CBA observamos que estes geraram um prejuízo sobre o potencial de membrana mitocondrial, esta alteração pode indicar dano mitocondrial e formação de espécies reaitivas do oxigênio (EROS). Ao pré-incubar as células com os antioxidantes GSH e N-acetilcisteína (NAC), observamos que ambos geram efeitos de proteção à MCF-7 ao efeito citotóxico dos CBAs. Foi ainda observado que o tratamento com os CBAs isolados diminui a atividade da GLO1, e esta queda foi dose dependente. Quando as células foram pré-tratadas com a GSH, a queda da enzima foi protegida nos grupos tratados com o resveratrol e com a curcumina, mas não com a piperina. A curcumina também diminuiu a expressão da GLO1. Na avaliação da liberação de lactato, produto final da via da glioxalase, observamos que esta liberação foi prejudicada nos grupos tratados com os CBAs, e podemos associar este dado ao efeito deletério dos CBAs à mitocôndria da MCF-7. Na avaliação da citotoxicidade na combinação dos CBAs à MCF-7, foi observado que o tratamento da curcumina com resveratrol, curcumina com piperina e resveratrol com piperina gerou um efeito sinérgico de citotoxicidade. A utilização de um meio mais concentrado em glicose não alterou o efeito isolado dos CBAs à MCF-7. Estes resultados obtidos em cultura de células indicam o potencial para pesquisa clínica ao subsidiar o uso de agentes adjuvantes durante a terapia de câncer de mama com CBAs.

ABSTRACT

Currently, breast cancer is the most common cancer among women. Advanced Glycation End-Products (AGEs) has as precursors for its formation the substances glyoxal, methylglyoxal e 3-deoxyglucosone, obtained exogenously through rich amino acids and sugar foods subjected to elevated temperatures, but it can also be generated endogenously by persistent hyperglycemia and high glucose utilization pathways, such as the metabolism of cancer cells. The precursors of AGEs are harmful to healthy cells, but also for tumor cells, and for this reason, these cells optimize their enzymatic detoxification system of these compounds, known as glyoxalase system, which requires reduced glutathione (GSH) as a cofactor for action of the first system enzyme, glyoxalase 1 (GLO1). The bioactive compounds (BCs), such as resveratrol, curcumin and piperine, has been associated with chemotherapeutic and chemopreventive effects and may influence the route of training and detoxification of AGEs in cancers cells. The aim of this study was to evaluate the effects of resveratrol, curcumin and piperine on the glyoxalase system and the action of these compounds and the precursors of AGEs in human mammary adenocarcinoma cells, MCF-7. Both curcumin and resveratrol, as piperine reduced the viability of MCF-7 cells by the MTT assay generating IC50 values respectively equal to 131 µM, 24.5 µM and 94.5 µM, in 24 hours of treatment, and 83.9 µM , 11.4 µM and 38.3 µM in 48 hours of treatment. These data were confirmed by trypan blue assay. Methylglyoxal and glyoxal generated, in 24 hours of treatment, an IC50 value equal to 2.8 mM. This increased value may be associated with the improvement on the ability of the detoxification of theses compounds by glyoxalase system in MCF-7 cells. 3-deoxyglucosone did not demonstrate citotoxic effects to MCF-7 in this study. When MCF-7 cells were treated with IC50 values of each BCs, the mitochondrial membrane potential decreased. This change may indicate mitochondrial damage and generating of reactives oxygen species (ROS). By pre-incubating the cells with antioxidants as GSH and N-acetylcysteine (NAC), we observed that both generate protective effects on MCF-7 to the cytotoxic effect of CBs. It was also observed that treatment with isolated CBs decreases the activity of GLO1, and this decrease was dose-dependent. When cells were pre-treated with GSH, the decrease of the enzyme has been protected in the groups treated with resveratrol and curcumin, but not with piperine. Curcumin also decreased the expression of GLO1. In the assesment of the lactate formation, the final product of glyoxalase pathway, we observed and impaired of this production in groups treated with CBs, and we may associated this data to the deleterius effect of CBs to MCF-7's mitochondria. When we evaluated the cytotoxicity of CBs in combination, it was observed that treatment with resveratrol and curcumin, curcumin and piperine, and piperine and resveratrol, generated a synergistic toxic effect. Incubation in a more concentrated glucose medium did not alter the effect of isolated CBs on MCF-7 cells. The results obtained in cell culture indicate the potential for clinical research to support the use of adjuvant agents such as CBs for breast cancer therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. As etapas epigenéticas da carcinogênese. 24

Figura 2. Formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) por meio da Reação de Maillard. 27

Figura 3. Produção de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. 29

Figura 4. Via endógena de formação dos AGEs. 30

Figura 5. Estrutura química do metilglioxal. 32

Figura 6. Estrutura química do glioxal. 33

Figura 7. Sistema da glioxalase. 35

Figura 8. Alimentos funcionais quimiopreventivos e seus compostos bioativos. 39

Figura 9. Estrutura química do resveratrol. 40

Figura 10. Estrutura química da piperina. 43

Figura 11. Estrutura química da curcumina. 46

Figura 12. Efeito dos α-oxaldeídos e dos compostos bioativos na viabilidade das células MCF-7 em 24 horas e 48 horas. 59

Figura 13. Efeito do resveratrol, da curcumina e da piperina, na concentração de 24,5 µM, sobre a contagem de células MCF-7 em 24 horas de tratamento. 60

Figura 14. Efeito do resveratrol, da curcumina e da piperina, na concentração de 94,5 µM, sobre a contagem de células MCF-7 em 24 horas de tratamento. 61

Figura 15. Efeito do resveratrol, da curcumina e da piperina, na concentração de 131 µM, sobre a contagem de células MCF-7 em 24 horas de tratamento. 62

Figura 16. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial da célula MCF-7 tratada com os valores de IC50 dos compostos bioativos. 63

Figura 17. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial da célula MCF-7 tratada com os compostos bioativos na concentração de 24,5 µM. 64

Figura 18. Viabilidade celular da MCF-7 tratada com diferentes concentrações de GSH. 65

Figura 19. Viabilidade celular da MCF-7 tratada com resveratrol ou curcumina ou piperina e diferentes concentrações de GSH. 67

Figura 20. Viabilidade celular da MCF-7 tratada com diferentes concentrações de NAC. 68

Figura 21. Viabilidade celular da MCF-7 tratada com resveratrol ou curcumina ou piperina e diferentes concentrações de NAC. 70
Figura 22. Atividade da GLO1 em células MCF-7 pré-tratadas com GSH e pós-tratadas com resveratrol ou curcumina ou piperina por 24 horas. 72
Figura 23. Atividade da GLO1 em células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações resveratrol ou curcumina ou piperina por 24 horas. 74
Figura 24. Expressão da GLO1 em células MCF-7 tratadas com resveratrol ou curcumina ou piperina por 24 horas. 75
Figura 25. Dosagem de D-lactato produzido por células MCF-7 tratadas com resveratrol por 24 horas. 76
Figura 26. Dosagem de D-lactato produzido por células MCF-7 tratadas com curcumina por 24 horas. 77
Figura 27. Dosagem de D-lactato produzido por células MCF-7 tratadas com piperina por 24 horas. 77
Figura 28. Efeito dos compostos bioativos na viabilidade das células MCF-7 em 24 horas em meio com alta glicose e sem insulina. 79
Figura 29. Efeito da combinação entre a curcumina e o resveratrol na viabilidade das células MCF-7 em 24 horas. 80
Figura 30. Efeito da combinação entre a curcumina e a piperina na viabilidade das células MCF-7 em 24 horas. 81
Figura 31. Efeito da combinação entre a piperina e o resveratrol na viabilidade das células MCF-7 em 24 horas. 81
Figura 32. Influência dos CBAs e dos α-oxaldeídos sobre a MCF-7: Dano mitocondrial e prejuízo sobre a atividade da GLO1. 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de IC50 dos precursores dos AGEs e dos compostos bioativos na viabilidade da linhagem celular de mama MCF-7 em 24 horas e 48 horas. 58

Tabela 2. Efeito da combinação entre os CBAs na viabilidade das células MCF-7 em 24 horas. 82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil CoA	Acetil Coenzima A
AGEs	Produtos Finais de Glicação Avançada (do inglês, *Advanced Glycation End-Products*)
ATP	Adenosina Trifosfato
Bax	Proteína Bax (do inglês, *Bcl-2 associated X protein*)
Bcl-2	Proteína Bcl-2 (do inglês, *B-cell lymphoma-2)*
BSA	Albumina de Soro Bovino
Caspase	Cisteinil-aspartato proteases (do inglês, *cysteine-dependent aspartate-specific proteases*)
ATR	do inglês, *ATM and Rad 3-related*
Bak	Proteína Bak (do inglês, *Bcl-2-homologous antagonist/killer*)
Bax	Proteína Bax (do inglês, *Bcl-2 associated X protein*)
Bcl-2	Proteína Bcl-2 (do inglês, *B-cell lymphoma-2)*
Bcl-xL	Proteína Bcl-xL (do inglês, *B-cell lymphoma-extra large*)
Bim	do inglês, *Bcl-2-interacting mediator of cell death*
Caspase	Cisteinil-aspartato proteases (do inglês, *cysteine-dependent aspartate-specific proteases*)
CBA	Composto Bioativo de Alimento
COX	Ciclo-oxigenase-2
DM	*Diabetes Mellitus*
DMEM	do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
$FADH_2$	Dinucleotídeo de flavina e adenina
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GLO1	Glioxalase 1
GLO2	Glioxalase 2
GO	Glioxal
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
HO^-	Radical hidroxila
IC	Índice de Combinação
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro 1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol carbocianina
LOX	Lipo-oxigenase
MAPK	Proteína quinase ativadora de mutógeno

MDR	Resistência a múltiplas drogas (do inglês, *Multiple Drug Resistance*)
MGO	Metilglioxal
MMP-9	Metaloproteinase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio
NAC	N-acetilcisteína
NaF	Fluoreto de sódio
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NF- κB	do inglês, *Factor nuclear kappa B*
PBS	Tampão fosfato salino
P-gp	do inglês, *P-glycoprotein*
PKC	Proteína quinase C
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfonil
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
RAGE	do inglês, *Receptor for Advanced Glycation End-products*
RNA	Ácido ribonucléico (do inglês, *ribonucleic acid*)
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TBS-T	Tween 20
UV	Ultravioleta
3-DG	3-Deoxiglicosona
ΔΨm	Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20
2 REVISÃO DE LITERATURA 22
2.1 ASPECTOS GENÉTICOS E AMBIENTAIS ASSOCIADOS AO CÂNCER DE MAMA 22
2.2 AS ETAPAS DA CARCINOGÊNESE 23
2.2.1 Modelo de células de câncer estudada nesta tese 25
2.3 OS PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGES) 26
2.3.1 Formação exógena e endógena dos AGEs e sua relação com o metabolismo energético 26
2.3.2 Os precursores dos AGEs 31
2.3.2.1 Metilglioxal (MGO) 31
2.3.2.2 Glioxal (GO) 33
2.3.3 Efeito dos AGEs 33
2.4 O SISTEMA DA GLIOXALASE COMO VIA DE DETOXIFICAÇÃO DOS AGEs 34
2.4.1 A glutationa reduzida (GSH) e o sistema da glioxalase 36
2.4.2 A N-acetilcisteína (NAC) e o sistema da glioxalase 37
2.5 COMPOSTOS BIOATIVOS EM ALIMENTOS NA MODULAÇÃO DA CARCINOGÊNESE: ÊNFASE NO RESVERATROL, NA CURCUMINA E NA PIPERINA 37
2.5.1 Resveratrol 40
2.5.1.1 Metabolismo e biodisponibilidade do resveratrol 41
2.5.1.2 Efeitos biológicos do resveratrol 41
2.5.2 Piperina 43
2.5.2.1 Metabolismo e biodisponibilidade da piperina 44
2.5.2.2 Efeitos biológicos da piperina 44
2.5.3 Curcumina 46
2.5.3.1 Metabolismo e biodisponibilidade da curcumina 46
2.5.3.2 Efeitos biológicos da curcumina 47
3 JUSTIFICATIVA 49
4 OBJETIVOS 50
4.1 OBJETIVO GERAL 50
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 50
5 MATERIAL E MÉTODOS 51
5.1 REAGENTES 51
5.2 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS CELULARES 51
5.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR 51
5.3.1 Tratamento 51
5.3.2 Redução de MTT 52
5.3.3 Contagem celular utilizando teste de exclusão Azul de Tripan 52
5.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO 53

COM OS COMPOSTOS BIOATIVOS NA PRESENÇA DE ANTIOXIDANTES
5.4.1 Tratamento para o ensaio de citotoxicidade 53
5.4.2 Ensaio de citotoxicidade 53
5.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLIOXALASE 1 53
5.5.1 Tratamento para dosagem da atividade da GLO1 53
5.5.2 Obtenção dos extratos celulares 53
5.5.3 Ensaio de atividade da GLO1 54
5.6 DETERMINAÇÃO DO ΔΨM 54
5.6.1 Tratamento para a determinação do (ΔΨm) 54
5.6.2 Ensaio para determinação do ΔΨm 54
5.7 ANÁLISE DO POTENCIAL SINÉRGICO OU ANTAGÔNICO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS EM ASSOCIAÇÃO 55
5.7.1 Tratamento 55
5.7.2 Índice de Combinação (IC) para determinação do efeito sinérgico, aditivo ou antagônico 55
5.8 DOSAGEM DE D-LACTATO 56
5.9 *WESTERN BLOTTING* 56
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA 57
6 RESULTADOS 58
7 DISCUSSÃO 83
8 CONCLUSÕES 90
9 REFERÊNCIAS 92

1 INTRODUÇÃO

O câncer representa um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos (Instituto Nacional do Câncer - INCA, 2014). Sua cura se torna difícil pela grande diversidade dos tumores existentes, tanto em relação a sua histologia quanto às diferentes mutações celulares que sofrem. As elevadas taxas de proliferação celular, a sua capacidade de invasão tecidual, a resistência à quimioterapia e/ou radioterapia e a metástase, são outros fatores que dificultam a cura desta doença (GREAVES & MALEY, 2012).

Dos diversos tipos de câncer, a neoplasia de mama é considerada o segundo tipo de neoplasia mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres em incidência, prevalência e mortalidade (SERVICK, 2014; MALORNI e cols., 2006). O processo de desenvolvimento do câncer de mama ocorre em etapas múltiplas, sendo que uma série de mutações gênicas e alterações epigenéticas do tecido mamário iniciam este tipo de câncer. A hereditariedade desta doença se associa a aproximadamente 10% a 15% em todos os casos, demonstrando que a maior parte dos casos de câncer de mama são gerados por fatores extrínsecos (CIPOLLINI e cols., 2004; PAN e cols., 2015).

A carcinogênese envolve uma sequência de transformações celulares, como mutações gênicas, amplificações, deleções e translocações em genes que codificam proteínas associadas ao ciclo celular, apoptose e proliferação celular, conhecidos como oncogenes. Estas alterações irão desencadear desvios em vias de sinalização, comprometendo o processo de apoptose induzida e levando ao descontrole da proliferação celular, que quando associado à ativação dos mecanismos de escape imunológico, manifestam o crescimento tumoral (YOSHIOKA e cols., 2015).

Entre as diversas vias metabólicas que englobam as pesquisas básicas com câncer, cita-se a via de formação e eliminação dos produtos finas da glicação avançada (AGEs, do inglês, *Advanced Glycation End-Products*). Estes metabólitos, extremamente tóxicos para células saudáveis e, recentemente, para as células cancerosas (TAKINO, 2010; ANTOGNELLI, 2013), são gerados no estresse oxidativo e em vias metabólicas que requerem alta utilização de glicose, e podem ser um novo alvo quimioterápico quando seu sistema de detoxificação é prejudicado por algumas substâncias (LOARCA e cols., 2013; TANIGUCHI e cols., 2012).

Os compostos bioativos dos alimentos (CBAs) são metabólitos secundários presentes em plantas e considerados ingredientes não nutricionais, porém responsáveis por diversas ações benéficas para saúde humana, uma vez que demonstram atividades anti-inflamatórias, antibióticas, quimiopreventivas e quimioterapêuticas, antioxidantes, entre outros, estando envolvidos na redução do risco e controle das doenças crônicas não transmissíveis, como o câncer (PAN e cols., 2015).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS GENÉTICOS E AMBIENTAIS ASSOCIADOS AO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama são ainda muito elevadas, estando este entre as neoplasias malignas mais frequentes nas mulheres (INCA, 2014). Segundo INCA (2014), a estimativa de incidência desta neoplasia maligna na região Sudeste do Brasil foi de 300 mil casos, e, para o país, cerca de 60 mil novos casos de câncer de mama no ano de 2014. Ainda no Brasil, cerca de 10.000 óbitos, por ano, são registrados em razão desta doença.

A transformação maligna da célula mamária normal é um processo que ocorre em várias etapas e envolve mudanças na expressão e atividade de diferentes genes e proteínas. Estes eventos celulares são geralmente mútuos e exclusivos, e são regulados por mecanismos genéticos específicos, controlados pela ação sequencial e cooperativa de fatores de transcrição. A frequência aumentada do câncer de mama no sexo feminino, em relação ao sexo masculino, é entendida pela presença dos hormônios sexuais femininos. Desde a menarca até a menopausa, a mulher sofre a influência do estrogênio e da progesterona sobre as células da mama, útero e ovários. O estrogênio é um regulador do crescimento e diferenciação das células epiteliais da glândula mamária normal e tem um papel crítico no desenvolvimento da transformação maligna (ZIEGLER e cols., 1993; PEREOU e cols., 2000; MESTER & REDEUILH, 2008).

Desta forma, os tumores de mama podem ser estimulados por estrogênio, por possuírem receptores de estrogênio na superfície de suas células e dependerem deste hormônio para seu crescimento, como também, as células de câncer mamário podem possuir receptores de progesterona e serem estimuladas por este hormônio. Aproximadamente 75% dos tumores de mama são estrogênio positivo e destes, estima-se que 65% são ainda progesterona positivo, dependendo também da progesterona para crescer (HARMER, 2008).

Nenhum mecanismo isolado é conhecido como responsável pelo aumento do risco do desenvolvimento da doença. A idade é considerada o principal fator de risco para o câncer de mama. Em geral, as taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, esse aumento ocorre de forma mais lenta. O fumo, o consumo de bebidas alcoólicas, a história familiar de câncer da mama, a alta densidade do tecido mamário (razão

entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama), fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, multiparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal) e os fatores dietéticos tais como a ingestão calórica, o consumo de frutas e hortaliças e a qualidade da dieta, estão diretamente relacionados ao desenvolvimento da carcinogênese mamária (DUFFY, 2013; INCA, 2015; HANF & HANF, 2014). Estudos observacionais sugerem que a exposição ambiental a substâncias químicas tóxicas, a dieta e o estilo de vida, podem contribuir para a causa e progressão do câncer de mama, alterando a epigenética normal e a sinalização endócrina (VANDEN, 2012; JENKINS e cols., 2012).

A escolha para o tratamento do câncer de mama estará relacionada ao estádio da doença, às características biológicas do tumor e à individualidade do paciente. Neste sentido, leva-se em consideração o *status* menopausal, a idade, comorbidades e preferências. Se diagnosticado no início, o tratamento terá maior poder curativo. Este poderá ser local, quando se opta pela cirurgia e radioterapia; ou sistêmico, quando há necessidade de quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica. Nos casos de metástases, o tratamento tem como objetivo prolongar a sobrevida e melhorar a qualidade de vida (INCA, 2015).

2.2 AS ETAPAS DA CARCINOGÊNESE

Como unidade básica de todos os organismos em sistemas biológicos, a célula tem seu crescimento controlado por uma série de mecanismos homeostáticos que vão determinar o equilíbrio entre a proliferação e a morte celular. Este equilíbrio é coordenado pela ação de diversos genes em resposta a estímulos intrínsecos e extrínsecos (FREITAS e cols., 2010).

A carcinogênese é entendida pela sequência de eventos, como mudanças genéticas e epigenéticas, em níveis morfológicos, celulares e moleculares, que leva à transformação de uma célula normal em uma célula neoplásica. Costuma ser dividida em três estágios principais: a iniciação, a propagação e a progressão (Figura 1) (RYAN, 2009; VINCENT & GATENBY, 2008).

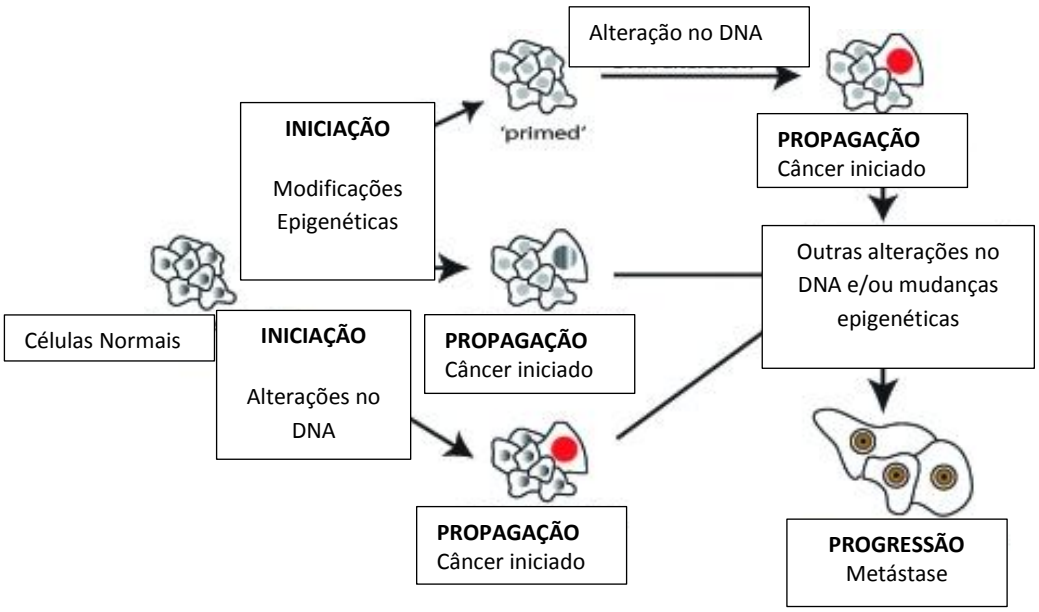


Figura 1. As etapas epigenéticas da carcinogênese (Adaptado de RYAN, 2009).

A iniciação é caracterizada por alterações genéticas que ocorrem a partir da exposição a agentes mutagênicos físicos, como a luz ultravioleta e as radiações ionizantes; biológicos, como alguns vírus; ou químicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e nitrosaminas. Estes agentes poderão promover alterações na composição e na estrutura básica da dupla fita do ácido desoxirribonucleico (DNA), gerando mutações possíveis de serem revertidas por meio da atuação de genes supressores de tumores. Contudo, a exposição repetitiva aos carcinógenos é o que levará ao desenvolvimento de tumores malignos (STRATTON, 2011).

Células mutadas demonstram uma adaptação diferente ao seu microambiente com consequentes vantagens seletivas no seu crescimento quando comparadas as células normais, mesmo assim, apresentam um fenótipo idêntico às células que não passaram pelo processo de iniciação. Alguns mecanismos celulares poderão reverter este processo inicial da carcinogênese, são eles: detoxificação de carcinógenos, reparo do DNA, por meio de genes supressores de tumores e eliminação das células que tenham o DNA modificado, por meio de apoptose celular. Para que a iniciação ocorra, é necessário que haja não só a modificação do DNA, mas também a sua replicação e a proliferação celular, de modo que o dano ao DNA inicial possa se fixar nas gerações celulares seguintes (STRATTON, 2011; LIU & ROBINS, 2006).

Durante a propagação, as células que sofrerão a iniciação começam a se multiplicar gerando as lesões pré-neoplásicas, como a displasia e anaplasia, por meio de estímulos

promotores. Este evento é seguido pela expansão clonal destes grupos celulares, caracterizada pela replicação celular, levando a um acúmulo de mutações, com alterações genéticas e epigenéticas (GREAVES & MALEY, 2012; VINCENT & GATENBY, 2008).

A etapa seguinte é caracterizada por alterações moleculares adicionais, pelo aumento da massa tumoral primária, desprendimento de células do tumor, movimento na direção de tecidos e órgãos adjacentes e penetração de células neoplásicas individuais ou pequenos agrupamentos das mesmas no sistema circulatório, com seu transporte e aprisionamento em órgãos e tecidos distantes. Tais grupos de células tendem a ficar retidos e costumam fixar-se em novos locais, continuando a crescer e levando à formação de tumores secundários, em um processo conhecido como metástase (FREITAS e cols., 2010). Em geral, nos estágios avançados de desenvolvimento tumoral, as células transformadas apresentam uma série de alterações gênicas que as tornam altamente invasivas e resistentes a medicamentos antitumorais, dificultando, em alguns casos, o sucesso do tratamento (GRAVITZ, 2011).

2.2.1 Modelo de células de câncer estudada nesta tese

A alta incidência de casos, bem como o elevado número de mortes, mostra a importância da melhor compreensão dos mecanismos relacionados ao câncer de mama. O estudo do câncer de mama, assim como de outros tipos de câncer, reconhece que estas patologias apresentam alta heterogeneidade no que refere aos tipos celulares e suas origens no interior dos tecidos (KREEGER & LAUFFENBURGUER, 2010).

Entre os modelos existentes para pesquisa do câncer de mama podemos citar os ensaios clínicos com humanos, os modelos de pesquisa de atividade antitumoral *in vivo*, com a utilização dos modelos murinos, as técnicas de implantação de tumores em animais por meio dos modelos xenográficos, e, finalmente, os modelos *in vitro*, nos estudos com culturas de células. Entre as linhagens celulares utilizadas para o estudo do câncer de mama, cita-se: HS-578T (carcinoma), MDA-MB-231 (adenocarcinoma), MDA-MB-435 (adenocarcinoma), MX-1 (carcinoma) e MCF-7, linhagem escolhida para o desenvolvimento desta tese, além de outras. A MCF-7 vem sendo utilizada desde 1970, quando retirada de uma efusão pleural de uma paciente com adenocarcinoma mamário. Desde então, estas células tornaram-se um modelo de estudo de câncer de mama de resposta hormonal, estrogênio positivo, e aparecem em diversos estudos experimentais que objetivam entender os mecanismos moleculares

envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama (SIMSTEIN e cols., 2003; MARKAVERICH e cols., 2011).

2.3 OS PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGES)

Os AGEs são um grupo complexo e heterogêneo de compostos que têm sido associados com as complicações de diversas doenças crônicas não transmissíveis tais como a Diabetes Mellitus (DM) (BROWNLEE, 2005), doenças neurológicas como a doença de Alzheimer (KUHLA e cols., 2014), obesidade (GAENS e cols.; 2013), doenças renais (JAN e cols., 2005), assim como com o câncer (TAKINO, 2010). Os AGEs se envolvem em diversos mecanismos bioquímicos que explicam como a hiperglicemia crônica se associa aos danos celulares e teciduais observados em algumas condições clínicas. Estes produtos constituem grande variedade de substâncias formadas a partir de interações amino carbonilo, de natureza não-enzimática, entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucléicos (BROWNLEE, 2001; SHANGARI e cols., 2004; BROWNLEE, 2005; THORNALLEY, 2005).

2.3.1 Formação endógena e exógena dos AGEs e sua relação com o metabolismo energético

A formação dos AGEs é um processo químico pouco conhecido, mas entende-se que existem mecanismos endógenos e exógenos para a geração destes produtos. Açúcares reduzidos, como a glicose, reagem não enzimaticamente com grupos amino de proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos por meio de uma série de reações que formam bases de Shiff, seguida da formação de produtos de Amadori e consequente produção de AGEs, conforme pode ser visualizado na figura 2. Este processo, conhecido por reação de Maillard foi descrito em 1912, quando se percebeu que alimentos proteicos quando aquecidos e associados à presença de açúcares reduzidos, resultavam em uma coloração marrom amarelada (BROWNLEE, 2001; THORNALLEY, 2005).

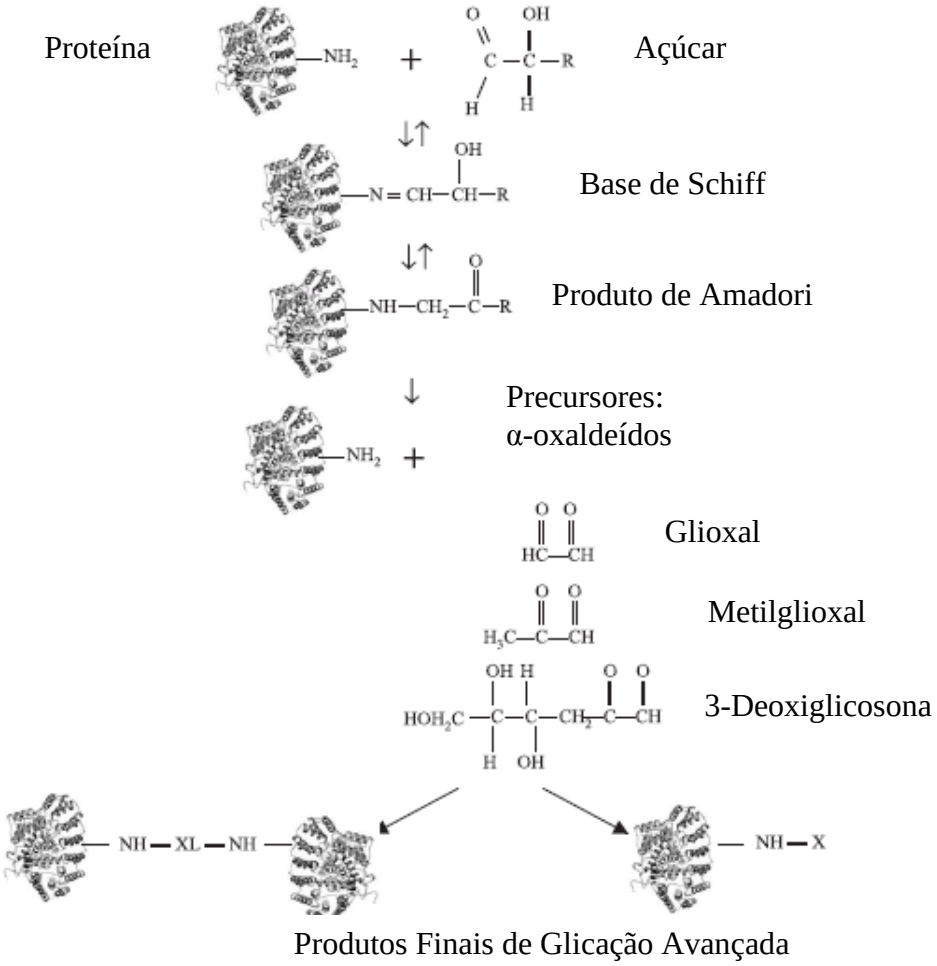


Figura 2. Formação dos AGEs por meio da Reação de Maillard (Adaptado de SHANGARI e O'BRIEN, 2004).

O preparo de alimentos que contenham carboidratos e aminoácidos, tais como massas de pães, biscoitos, bolos, ou ainda carnes, entre outros, a elevadas temperaturas (130°C ou superior), por um período entre 20 a 50 minutos, por meio das técnicas de assar, grelhar e cozer, é a principal fonte dietética dos AGEs. Este processo é dependente do tempo e da temperatura em que os alimentos são aquecidos, bem como da composição química dos mesmos (BROWNLEE, 2001). Em humanos, uma única refeição com alto teor de AGEs leva a um aumento significativo de AGEs séricos quando comparado a uma refeição com baixos teores de AGEs. De todos os AGEs ingeridos, cerca de 10% deste total é absorvido, e dois terços desta fração absorvida é retida no nosso organismo (KOSCHINSKY e cols., 1997). O epitélio intestinal absorve os derivados primários (produtos de Amadori), assim como AGEs intermediários e tardios (FINOT, 2005). Mono, di ou tripeptídeos modificados por AGEs

podem ser facilmente transportados por meio da parede intestinal levando consigo um ou mais produtos de glicação. A presença, na maioria dos alimentos industrializados, de dois produtos derivados da formação dos AGEs, como o metilglioxal (MGO) e a N-carboximetilisina, permitiu os estudos que confirmam a relação destas substâncias à atividades tóxicas em sistemas de múltiplas finalidades (CAI e cols., 2002; VLASSARA & URIBARRI, 2004; LI e cols., 2005; COURTEN e cols., 2015).

Na quantificação comparativa do conteúdo de AGEs em 250 alimentos comumente consumidos, Goldberg e cols. (2004), mostraram que a cocção a elevadas temperaturas, como durante a execução de técnicas dietéticas tais como assar, grelhar, fritar e cozer, aumentou significativamente o teor de AGEs nos alimentos. O cozimento dos alimentos a temperaturas mais baixas, por curto período de tempo e com maior quantidade de água (fervura ou vapor), se associou a um menor aumento de AGEs nas preparações.

Wang e Chang (2010), mostraram que o consumo excessivo de qualquer tipo de café pode trazer riscos associados à doença cardiovascular e a DM, em razão do consumo aumentado de MGO exógeno, o principal precursor para formação dos AGEs.

Endogenamente, os AGEs também poderão ser gerados por meio da reação de Maillard, que ocorre em situações de hiperglicemia persistente, tal como no DM. A hemoglobina glicada e a frutosamina são exemplos de produtos de Amadori, e podem ser utilizados como marcadores bioquímicos que se associam aos danos gerados pelos AGEs, nestas condições (SHANGARI & O´BRIEN, 2004).

Outra via de formação endógena dos AGEs seria durante a alta utilização de glicose pelas células em condições metabólicas anormais. Células de câncer apresentam elevada utilização de glicose. Uma alta taxa glicolítica, resultando numa elevada taxa de formação de lactato, é essencial para a proliferação e metástase das células tumorais. Apesar de Warburg e cols. (1927) terem associado a alta taxa glicolítica à disfunção mitocondrial das células tumorais, sabe-se que mitocôndrias de tumores são funcionais e que o maquinário oxidativo ativo é necessário para produção de ATP e outros compostos que suportam a elevada taxa de proliferação celular.

Existem quatro complexos protéicos na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, estes são chamados complexo I, II, III e IV. A oxidação de compostos orgânicos propicia a formação de dinucleotídeo de flavina e adenina ($FADH_2$) e dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH). O principal doador de elétron é o NADH, que doa elétrons para o complexo I. O outro doador de elétrons, gerado pelo ciclo de Krebs, é o $FADH_2$, formado pela succinato

desidrogenase, que doará elétrons para o complexo II. Os elétrons destes complexos passarão para a coenzima Q, e após, transferidos para o complexo III, citocromo-c e complexo IV, sendo o oxigênio molecular o aceptor final de elétrons (SMITH e cols., 2012).

O transporte de elétrons ocorre do menor potencial para o maior potencial de redução e muito da energia do transporte de elétrons é usada para bombear prótons através da membrana. Nos complexos I, III e IV há liberação de energia que é utilizada para o transporte de prótons. Isto gera uma diferença de potencial eletroquímico entre o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial. A energia deste gradiente de voltagem leva a síntese de ATP pela ATP-sintase, quando os prótons retornam do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial (SMITH e cols., 2012).

O drástico aumento da glicólise em células de câncer tem por consequência o aumento na produção de piruvato, o que ocasiona um aumento da oxidação do acetil-Coenzima A (Acetil CoA) no ciclo de Krebs, levando a um aumento do potencial de membrana mitocondrial (CHEN e cols., 2015). Quando esta diferença atinge um ponto crítico, ocorre um fluxo reverso para a coenzima e desta para o O_2 gerando superóxido, um radical livre, muito reativo, conforme observado na figura 3 (BROWNLEE e cols., 2005).

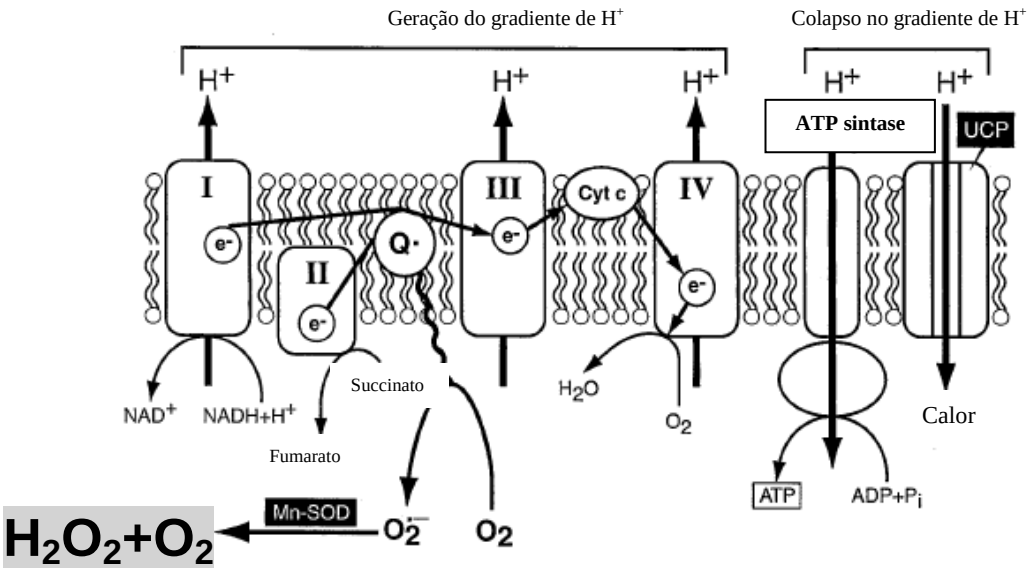


Figura 3. Produção de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Adaptado de BROWNLEE e cols., 2005).

A enzima superóxido dismutase transforma o superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 pode ser transformado em água pela catalase e pela glutationa peroxidase; contudo o H_2O_2 e o O^-_2 pela reação de Haber-Wales formam o radical hidroxil, e o H_2O_2 pela reação de Fenton também forma o mesmo radical. O grande aumento do radical hidroxil ocasiona quebra do DNA com consequente ativação da enzima poli (ADP) ribose polimerase. Como pode ser observado na figura 4, a enzima poli (ADP) ribose polimerase inibe a enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, enzima atuante na via glicolítica, o que ocasiona um grande aumento da via do poliol, da hexosamina, ativação da proteína quinase C (PKC) e da formação de AGEs, portanto o aumento do estresse oxidativo em razão da alta utilização da via glicolítica, seria o responsável pela ativação destas quatro vias e, consequentemente, formação endógena de AGEs (BROWNLEE e cols., 2005).

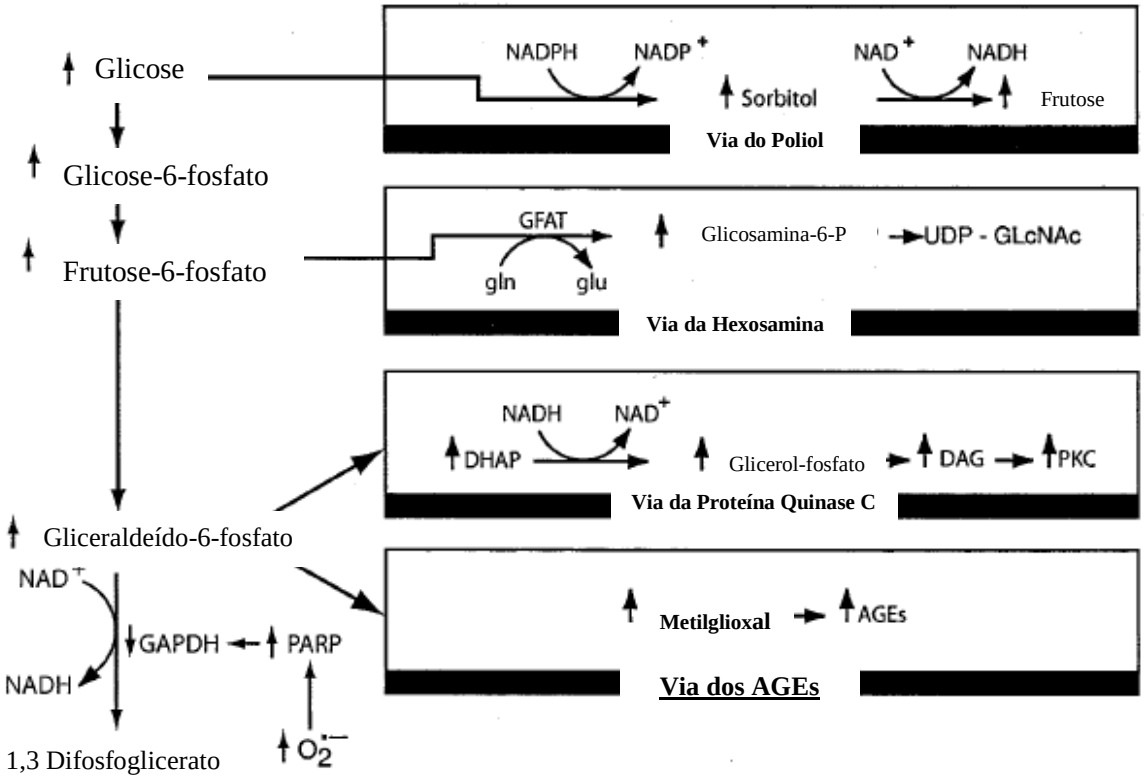


Figura 4. Via endógena de formação dos AGEs (Adaptado de BRONWLEE e cols., 2005).

O aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células de câncer em comparação às células normais, gera um impacto significativo sobre a

tumorigênese e sobre a reprogramação metabólica destes tecidos (KOPPENOL e cols., 2011).

Desta forma, entende-se que os AGEs poderão ser formados, endogenamente, em situações de hiperglicemia persistente, como no caso do DM (figura 2), onde açúcares livres irão ligar-se à aminoácidos e, por meio da reação de Maillard, gerar os AGEs, causando danos oxidativos e disfunção de proteínas plasmáticas, ativando os receptores para AGEs. Ainda endogenamente, os AGEs serão gerados em células que demandam uma alta utilização de glicose, como as células tumorais, onde, por meio da via glicolítica (figura 4), haverá a geração dos AGEs e seus precursores, não havendo, neste caso, relação com a hiperglicemia (BROWNLEE e cols., 2005).

2.3.2 Os precursores dos AGEs

Durante a reação de Maillard, alguns produtos intermediários são formados. Estes são conhecidos como α-dicarbonilas ou α-oxaldeídos e incluem compostos como o glioxal (GO), o MGO e a 3-deoxiglicosona (3-DG). Entre eles, o MGO é, provavelmente, o precursor mais importante para formação dos AGEs (KIM e cols., 2008). Numerosos estudos têm indicado que a toxicidade da glicose tem por consequência o aumento na formação de α-oxaldeídos, como o GO e o MGO (RABBANI & THORNALLEY, 2008; SCHMIDT e cols., 2010; HANSEN e cols., 2012; LEE & CHANG, 2014).

2.3.2.1 Metilglioxal

Entre as principais substâncias utilizadas em modelos experimentais que reportam a ação dos AGEs sobre as células de câncer, citamos o MGO (figura 5), um metabólito fisiológico com propriedades importantes sobre a inibição do crescimento celular (VAN HEIJST e cols., 2005; CHIAVARINA e cols., 2014; ALLAM e cols., 2015). Formado pelo processo de caramelização dos alimentos, também conhecido como Reação de Maillard, alimentos como queijos, carnes fritas e assadas, biscoitos, pães, bolos, azeite de oliva e manteigas são algumas fontes exógenas deste metabólito (GOLDBERG e cols. 2004).

O MGO é um α-oxoaldeído de cor castanha e odor pungente, altamente reativo, sendo produzido *in vivo* por quatro vias enzimáticas diferentes: (a) a partir de triose-fosfatos (gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato) interconvertidas por isomerases; (b)

oxidação de acetona, um dos corpos cetônicos, catalisado pelo citocromo P450; (c) degradação de aminoácidos por amino-oxidases; e (d) oxidação de acetoacetato mediada pela mieloperoxidase. Algumas vias não enzimáticas a partir da glicose, triose-fosfatos, acetoacetato, succinilacetona e aminoacetona, também se mostraram como produtores de MGO nas células, em trabalhos *in vitro* (KALAPOS, 1999; THORNALLEY, 2005; NEMET e cols., 2006).

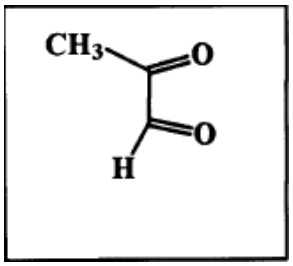


Figura 5. Estrutura química do metilglioxal.

Entre as fontes exógenas de metilglioxal cita-se a atmosfera urbana, a fumaça de cigarro, as bebidas, bem como produtos alimentares derivados de açúcares e óleos, podendo ser produzido no processo de cozimento ou de longa estocagem (NEMET e cols., 2006).

Mesmo sendo normalmente degradado por glioxalases, aldeído-oxidases e outras enzimas, o MGO sofre adições nucleofílicas e promove agregações de proteínas gerando efeitos biológicos nocivos que se associam ao DM, a doença de Alzheimer, e outras doenças crônicas não transmissíveis. Sua concentração também está aumentada em condições caracterizadas por hiperglicemia e estresse oxidativo, sendo considerado típico na obesidade (GAENS e cols., 2013).

O MGO promove eventos citotóxicos associados ao crescimento celular, disfunção mitocondrial, apoptose e necrose, modificando proteínas celulares e ácidos nucleicos. Por esta razão, também tem sido associado a ações quimioterápicas em diferentes modelos de pesquisa (ABE e cols., 2004; TAKINO e cols., 2010; GHOSH e cols., 2011; ANTOGNELLI e cols., 2013).

2.3.2.2 Glioxal

O GO (figura 6) é considerado o composto dialdeídico mais simples presente em alimentos, podendo ser gerado pelos processos de fermentação, cozimento e fritura, estando presente em torradas, “ketchup”, molhos de soja e manteigas (DEGEN e cols., 2012).

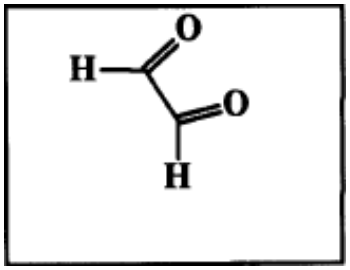


Figura 6. Estrutura química do glioxal.

Endogenamente pode ser produzido a partir de açúcares por reações de oxidação diretas ou por reações de Maillard e produtos de Amadori. Pode ainda ser produzido a partir da lipoperoxidação não enzimática de ácidos graxos poli-insaturados, a qual gera peróxidos intermediários que se degradam para produzir uma variedade de produtos oxidados, inclusive o GO. Suas vias de consumo são semelhantes as vias de consumo do MGO, através das enzimas do sistema da glioxalase (VISTOLI, 2013).

A concentração de glioxal no soro está na faixa de 0,05-0,08 mg/L e de 12 +- 0,5 mg/L no plasma de indivíduos saudáveis, mas atinge 0,19-0,33 mg/L no soro, 22,6 +- 3 mg/L no plasma e 0,18-0,40 mg/L na urina de pacientes diabéticos (LAPOLLA, 2005).

2.3.3 Efeito dos AGEs

A produção intracelular de precursores dos AGEs geram algumas consequências deletérias em células normais e tumorais: nas células endoteliais, modificam proteínas intracelulares, como proteínas envolvidas na regulação da transcrição gênica; os precursores dos AGEs também podem difundir para o exterior da célula e modificar matrizes extracelulares próximas, alterando a sinalização entre a matriz e a célula e, assim, causando disfunção celular; e também modificam proteínas circulantes na corrente sanguínea como a albumina. A modificação destas proteínas circulantes, pode ligar a receptores de AGEs e ativá-los, causando assim, a produção de citocinas inflamatórias e liberação de fatores de

crescimento, o que provocaria patologias vasculares e poderia associar-se à alterações na sinalização celular e indução de tumores (SHANGARI e cols., 2004).

Os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados à capacidade destes compostos de modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas. Por meio da geração de radicais livres, da formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares, os AGEs promovem, respectivamente, estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios. A contribuição dos AGEs para o desenvolvimento de tumores malignos encontra-se bastante evidenciada na literatura (ABE e cols., 2004; KIM e cols., 2008; TAKINO e cols., 2010; NEDIC e cols., 2013; PAN e cols., 2014; OJIMA e cols., 2014).

Nos últimos anos, alguns estudos têm mostrado o efeito dos precursores dos AGEs, MGO e GO, como possíveis agentes quimioterápicos e indutores de morte celular de células cancerosas de pele, pulmão, próstata, sarcomas, mama, entre outras (ABE e cols., 2004; TAKINO e cols., 2010; GHOSH e cols., 2011; ANTOGNELLI e cols., 2013; NASS e cols., 2014).

2.4 O SISTEMA DA GLIOXALASE COMO VIA DE DETOXIFICAÇÃO DOS AGES

O MGO e o GO, precursores dos AGEs, quando em quantidades toleráveis, apresentam um sistema de detoxificação dependente de glutationa reduzida (GSH), conhecido como sistema da glioxalase (figura 7), composto por duas enzimas principais, a glioxalase 1 (GLO1) e a glioxalase 2 (GLO2). Presente no citosol de todas as células de mamíferos, o sistema da glioxalase parece estar envolvido em processos associados ao envelhecimento e morte celular. O sistema das redutases é menos importante na detoxificação dos glioxais, este sistema inclui a aldeído redutase e a carbonil redutase (THORNALLEY, 1999). Estudos recentes têm revelado a associação do sistema da glioxalase com mecanismos patológicos, particularmente, complicações de doenças crônicas não transmissíveis e do estresse oxidativo (MORE e cols., 2013; KURZ e cols., 2011). O desenvolvimento de inibidores das enzimas que compõe este sistema aparece como alvo terapêutico para a quimioterapia em células de câncer (LEE & CHANG, 2014).

A GLO1 catalisa a conversão do MGO citotóxico ao não tóxico hemitioacetal, utilizando a GSH como cofator (MORCOS e cols., 2008). A GLO1 possui um importante

papel na sobrevivência e proliferação de células tumorais, sendo atualmente considerada um alvo em potencial na terapia anticâncer (HOSODA e cols., 2014). Cheng e cols. (2012) mostraram que a expressão aumentada da GLO1 no câncer gástrico estaria associada com o crescimento e proliferação celular das células cancerosas.

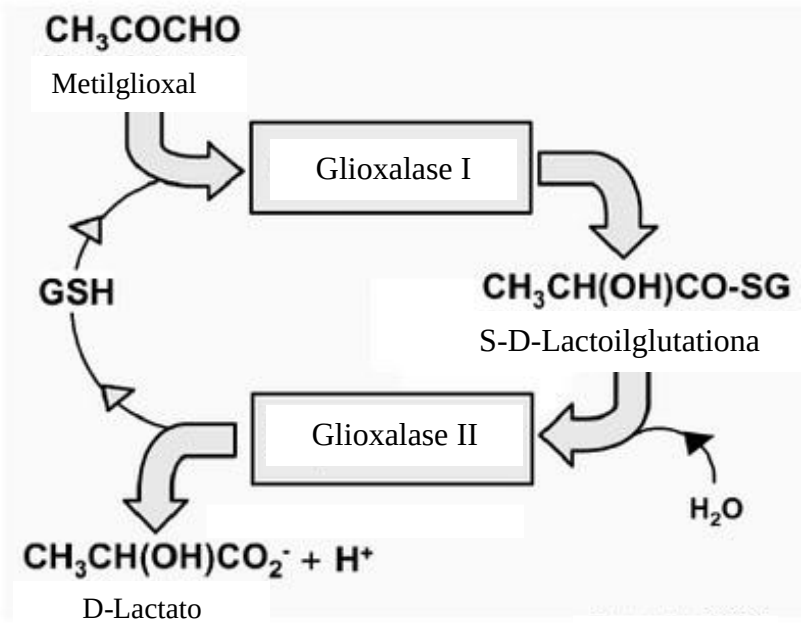


Figura 7. Sistema da Glioxalase (Adaptado de THORNALLEY, 2005).

O acúmulo de MGO bem como o dano ao DNA é aumentado em células tumorais com altas taxas metabólicas, desta forma o aumento da expressão da GLO1 em diversos tipos de tumores resulta na redução dos danos citotóxicos do MGO e da apoptose celular. A alta expressão e atividade da GLO1 estão associadas à rápida proliferação celular, enquanto que a deficiência na atividade e expressão da mesma enzima está associada com o aumento dos níveis de AGEs intracelular e danos à célula (THORNALLEY e cols., 2011; SANTARIUS e cols., 2010).

O sistema da glioxalase protege as células do efeito tóxico acumulativo gerado pelo excesso de MGO e GO e posterior conversão aos AGEs, convertendo-os em D-lactato. O aumento da expressão da GLO1 ocorre em alguns tipos de tumores como no câncer de mama, ovário (RULLI e cols., 2001; SMITH-BECKERMAN e cols., 2005), câncer de próstata (DAVIDSON e cols., 1999) e melanoma (BAIR e cols., 2010). A inibição da enzima, por sua

vez, mostra-se como um potente alvo de ação aos quimioterápicos. Warner e cols. (2010) mostraram, pela primeira vez, que a expressão gênica da GLO1 é aumentada em tecido de melanoma metastático. Neste mesmo trabalho foi demonstrado que o prejuízo na expressão da GLO1 se associa ao aumento da citotoxicidade induzida pelo acúmulo de MGO neste modelo de pesquisa.

Os efeitos citotóxicos do GO e do MGO nas células e tecidos ocorrem na maioria das vezes por meio da indução de EROs (LORETO e cols., 2004). Sob condições de estresse oxidativo, como na situação de alta utilização de glicose em células tumorais, onde citocinas estão sendo liberadas, os níveis de GSH diminuem e isto prejudica a detoxificação do GO e MGO por meio do sistema da glioxalase (SHANGARI e cols., 2004).

2.4.1 A Glutationa Reduzida (GSH) e o Sistema da Glioxalase

A GSH é um tripeptídeo, contendo cisteína e representa o tiol não proteico mais abundante nas células dos mamíferos. Sendo um conhecido antioxidante, é encontrada na maioria das células e amplamente utilizada em pesquisas com a finalidade de avaliar o estado redox em sistemas biológicos, investigando sua concentração e atividade das enzimas que utilizam a glutationa como cofator (SMITH e cols., 2012). A GSH faz parte do sistema da glioxalase atuando como cofator da GLO1, na primeira etapa da reação (THORNALLEY, 1999). O núcleo do resíduo cistenilglicina da glutationa está envolvido na sua função como antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz, por exemplo, de reagir com um elétron não pareado de um radical livre, formando um radical GS•, que produz, por dimerização, a glutationa oxidada (GSSG). A GSSG é, então, reduzida pela glutationa redutase, regenerando a GSH, num processo às custas do NADPH. A glutationa redutase, que regenera a GSH, tem o NADPH como substrato (SMITH e cols., 2012).

Variações nos níveis de GSH afetam diretamente a síntese de proteínas e de DNA, sendo assim, a oxidação ou depleção de GSH pode diminuir a síntese proteica. A GSH pode ser consumida muito rapidamente em situações de estresse oxidativo muito intenso, permanecendo na forma oxidada e não sendo novamente reduzida (AQUILANO e cols., 2014).

2.4.2 A N-acetilcisteína (NAC) e o Sistema da Glioxalase

A N-acetilcisteína (NAC) é um antioxidante não enzimático que age, principalmente, bloqueando a cadeia de peroxidação lipídica, eliminando oxigênio ou quelando íons metálicos (THORNALLEY, 1999; KUMAR e cols., 2014). Como precursor sintético da cisteína e de glutationa, a NAC é considerada um antioxidante que aumenta as concentrações intracelulares de GSH, uma das principais defesas contra o estresse oxidativo, e tem sido utilizada terapeuticamente em várias desordens relacionadas com estresse oxidativo. A NAC promove a síntese da GSH aumentando a disponibilidade de cisteína, elevando assim os níveis de gama-glutamil-cisteína-sintetase, enzima limitante sobre a rota de formação de GSH (KUMAR e cols., 2014).

A cisteína é um aminoácido ocasionalmente essencial para os seres humanos por que podemos sintetizá-lo. Porém, esta síntese ocorre de maneira limitada e algumas vezes insuficiente para o nosso organismo. Muitos pesquisadores demonstram que a suplementação de cisteína atua com efeitos positivos (GOMEZ e cols., 2015; KANIKARLA-MARIE & JAIN, 2014).

O uso de NAC resulta em uma série de ações promotoras de saúde em diferentes sistemas celulares. Loreto e cols. (2004) mostraram que culturas de neurônios expostas a 100 µM de MGO por 24 horas na presença de 10 mM de NAC não apresentaram os efeitos deletérios observados nas culturas de neurônios incubadas com MGO na ausência de NAC. Schmidt e cols. (2010), incubaram córtex cerebral de ratos Wistar com 1 mM de NAC durante 1 hora reduzindo assim os efeitos deletérios do GO associados ao metabolismo de aminoácidos.

2.5 COMPOSTOS BIOATIVOS EM ALIMENTOS NA MODULAÇÃO DA CARCINOGÊNESE: ÊNFASE NO RESVERATROL, NA CURCUMINA E NA PIPERINA.

A quimioterapia pode ser a primeira modalidade no tratamento de um tumor primário de mama de grande porte (acima de três centímetros), com avanço local (HARMER, 2008). Em geral, a quimioterapia é realizada por meio da combinação de drogas, pois as células cancerosas são sensíveis a determinados medicamentos em diferentes fases do ciclo celular, como na divisão celular e na reprodução celular. A quimioterapia se associa a inúmeros efeitos colaterais uma vez que as drogas não distinguem células saudáveis de células de

câncer, agindo, desta forma, em células da medula óssea, trato gastrointestinal, pele, dentre outros. Esta opção de tratamento não melhora a sobrevida do paciente, mas permite que o tumor não progrida, possivelmente resultando em cirurgia de conservação da mama, uma forma segura e eficaz para melhorar a qualidade de vida da mulher (STEBBING & GAYA, 2001).

Diversos mecanismos epigenéticos distintos podem interagir mutuamente com a sinalização hormonal, regulando a expressão gênica, levando a mudanças genéticas. A regulação de eventos epigenéticos podem contribuir para iniciação e promoção da carcinogênese e a malignidade do fenótipo. Estes eventos implicam ainda em processos neoplásicos conduzidos por hormônios (STRATTON, 2011; GREAVES & MALEY, 2012). Polifenóis dietéticos podem influenciar a expressão gênica e modular processos epigenéticos, tais como, metilação de DNA, modificação de histonas e alterações no ácido ribonucleico (RNA) mensageiro (VANDEN, 2012).

Desta forma, entre as alternativas de complemento ao tratamento quimioterápico, otimização de sua ação e prevenção do câncer, estão os CBAs. Béliveau & Gingras (2007), descreveram que entre os casos de câncer relacionados a fatores ambientais, a dieta inadequada contribui com cerca de 30%, seguida pelo tabaco, contribuindo com os mesmos 30%. Os fatores genéticos contribuiriam com 15% e outros fatores de risco, tais como poluentes e exposição à radiação ultravioleta (UV), pela parcela menor. Este dado mostra que os componentes dietéticos, no que se refere aos alimentos ultra processados, ricos em gorduras saturadas, sódio, conservantes e açúcares, podem se correlacionar diretamente ao desenvolvimento de câncer e de outras doenças crônicas não transmissíveis. No entanto, a modulação de mecanismos bioquímicos por CBAs, vem sendo muito referenciada na literatura como um dos possíveis métodos de prevenção e tratamento de tumores (PATEL e cols., 2009; VAN POPPE e cols., 2011; GONÇALVES e cols., 2011; KOZLOWSKA & SZOSTAK-WEGIEREK, 2014; WEAVER, 2014).

Os fitoquímicos quimiopreventivos são encontrados em diversos alimentos e são compostos pertencentes a diferentes classes estruturais (Figura 8) (SURH, 2003). Podem ser divididos em dois grandes grupos: proteínas antimicrobianas e compostos não protéicos, como alcalóides, quinonas, óleos essenciais, polifenóis e terpenos (SAMY & GOPALAKRISHNAKONE, 2010).

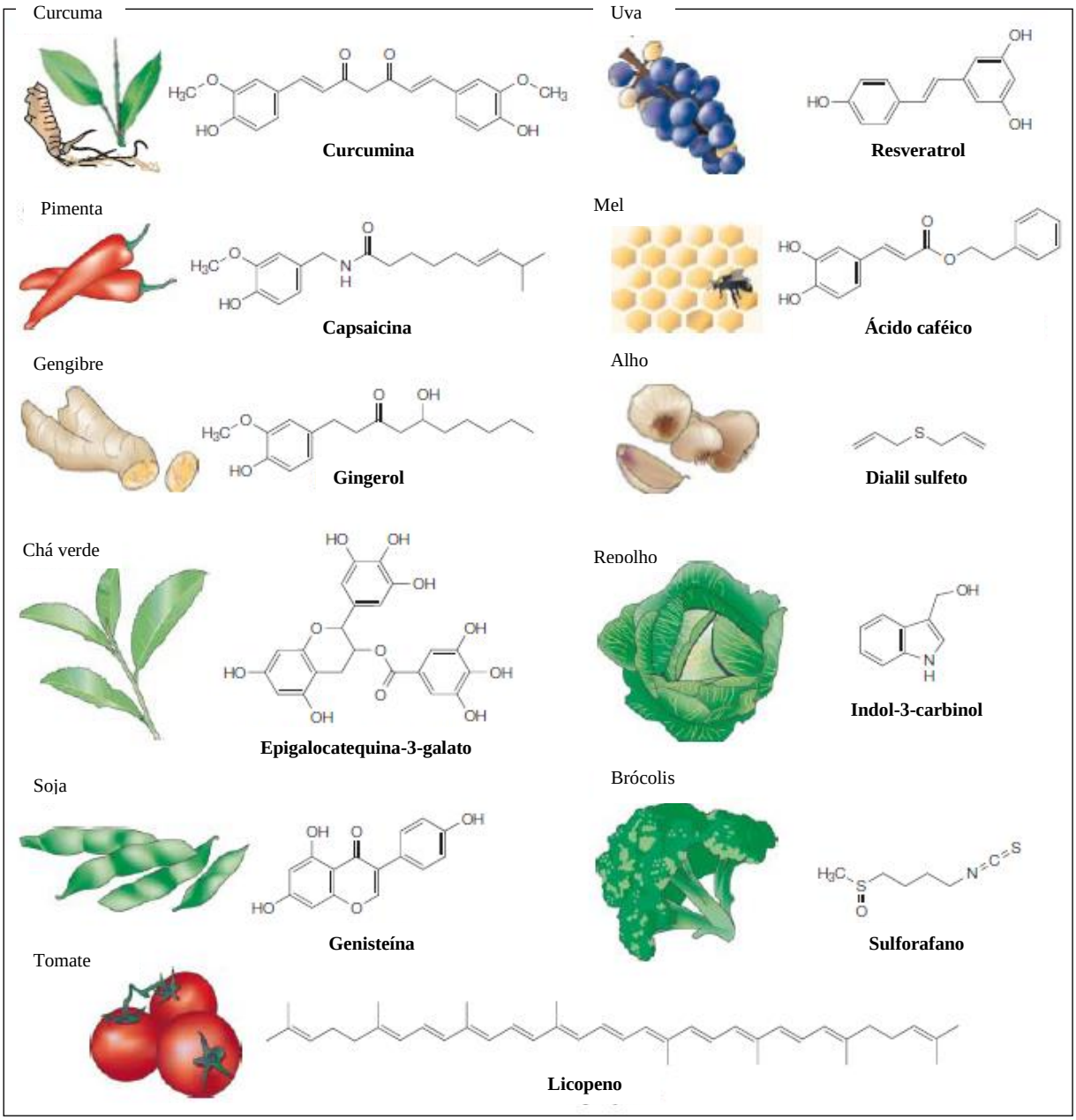


Figura 8. Alimentos funcionais quimiopreventivos e seus compostos bioativos (Adaptado de SURH, 2003).

A enorme diversidade de funções químicas encontradas em compostos naturais pode proporcionar uma nova geração de drogas para a prevenção e tratamento de alguns cânceres (AZMI e cols., 2006). Entre os efeitos dos CBAs já demonstrados por meio de estudos experimentais é possível citar: atividade antioxidante, detoxificante e de reparação de DNA que impedem a iniciação de tumores (HUQ e cols., 2014; MALHOTRA e cols., 2014); imunomodulação, sinalização e atividades anti-proliferativas que impedem a promoção do carcinógeno (RAGHU e cols., 2012); efeitos sobre o ciclo celular, apoptose e imobilidade

celular que interrompem a progressão dos tumores (MALHOTRA e cols., 2014; RAGHU e cols., 2012); e, finalmente, efeitos que geram diminuição nos mecanismos de motilidade e invasão celular, reduzindo a metástase (JI e cols., 2013).

2.5.1 Resveratrol

O resveratrol (figura 9) é um composto da classe dos estilbenos com uma estrutura química constituída por dois anéis aromáticos ligados por uma ponte metila e ligações de três grupos hidroxila inseridos nos anéis. Esta estrutura é sintetizada naturalmente sob duas formas isômeras: *trans* e *cis* resveratrol. O isômero *trans* é encontrado em maiores quantidades e é a forma biologicamente ativa. No entanto, este isômero é fotossensível, podendo ser convertido na presença de luz, em *cis*-resveratrol, perdendo assim a sua atividade biológica (LATRUFFE e cols, 2002; SIGNORELLI & GHIDONI, 2005).

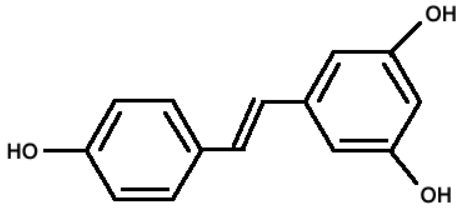


Figura 9. Estrutura química do resveratrol.

Considerado um polifenol, dada à presença de mais de um anel fenol em sua estrutura, o resveratrol foi isolado pela primeira vez em 1940 na raiz da *Hellebore branca (Veratrunm grandiflorum)* e é encontrado naturalmente em mais de 70 espécies de plantas, incluindo alimentos como uvas, vinhos tintos e oleaginosas (MILLER & RICE-EVANS, 1998). Este composto é sintetizado pelas plantas em resposta a condições de estresse, como condições climáticas, presença de fungos ou pragas, incidência de radiação solar, entre outros eventos, sendo considerado uma fitoalexina (SOLEAS e cols., 1997).

2.5.1.1 Metabolismo e biodisponibilidade do resveratrol

Humanos absorvem cerca de 80% do resveratrol ingerido. Presente nos alimentos na forma *cis*- e *trans*- resveratrol, mas principalmente nas formas glicosiladas, denominadas *piceid*, o resveratrol é absorvido no intestino, somente na forma aglicona cujo processo de absorção requer a ação de glicosidases intestinais. Por isso, a quantidade relativa da forma aglicona e glicosídica do resveratrol pode modular a taxa de absorção deste composto. Além disso, os níveis de expressão e a atividade diferenciada das glicosidases intestinais podem explicar as diferenças na taxa de absorção observadas em humanos e ratos (DAY e cols., 1998).

A conversão do resveratrol em conjugados hidrofílicos facilita sua entrada na corrente sanguínea e sua excreção. Estudos *in vivo* mostraram que, após a administração oral do resveratrol, ocorre um pico de concentração deste composto no plasma, que com o tempo diminui até o surgimento de um segundo pico de concentração. Este pico secundário é devido à circulação êntero-hepática deste composto (SIGNORELLI & GHIDONI, 2005; WALLE, 2011). A excreção renal é a maior rota de eliminação do resveratrol, uma vez que a excreção total deste composto na urina e nas fezes, após a administração oral em humanos, foi de 71 a 98% (AMRI e cols., 2012).

Dados farmacocinéticos, realizados tanto em modelos animais como em humanos, revelaram que o resveratrol parece ser rapidamente metabolizado pelo organismo, apresentando uma meia-vida curta (~8 a 14 minutos) e, portanto, baixa biodisponibilidade (ASENSI e cols., 2002; WALLE e cols., 2004). Outros estudos já demonstraram que metabólitos do resveratrol podem ser detectados no plasma, no período de 12 a 72 horas após a administração (VITRAC e cols., 2003; PERVAIZ & HOLME, 2009).

2.5.1.2 Efeitos biológicos do resveratrol

O consumo regular de vinho tinto está associado ao Paradoxo Francês, onde foi observado que a população francesa apresentava baixo risco para doenças cardiovasculares apesar de a dieta ser rica em lipídeos provenientes de laticínios (RENAUD & LORGERIL, 1992). Desde então, diversos estudos epidemiológicos têm sugerido que o consumo de compostos polifenólicos, presente em frutas, vegetais e bebidas derivadas de vegetais, podem reduzir o risco de doenças relacionadas à idade, como o câncer (JIANG e cols., 2010).

Em razão do seu efeito antioxidante e modulador de processos anti-apoptóticos, bem como atuação na síntese e degradação do peptídeo β amiloide, o resveratrol vem sendo também associado ao efeito protetor sobre múltiplas desordens neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer e a Doença de Parkinson (RICHARD e cols., 2011).

Recentes estudos mostram que o resveratrol possui propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, tornando-se um agente promissor quimiopreventivo uma vez que atua nos diferentes estágios do processo de carcinogênese, incluindo iniciação, promoção e progressão do tumor (TYIHAK e cols., 2011; JI e cols., 2013; MALHOTRA e cols., 2014). O resveratrol induz a morte por apoptose de diversas linhagens de células de câncer em modelos de tumores experimentais (DELMAS e cols., 2006; MALHOTRA e cols., 2014).

Entre os mecanismos de ação do resveratrol contra o desenvolvimento de tumores é possível citar sua atividade antioxidante (FERRUELO e cols., 2014), indução à apoptose celular, modulação do ciclo celular (SHI e cols., 2011), efeitos anti-proliferativos e anti-metastáticos (JI e cols., 2013).

A ação quimiopreventiva do resveratrol está ligada, ainda, à modulação da ativação de carcinógenos e de enzimas detoxificadoras. Conforme citado previamente, o resveratrol demonstra importantes efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, ações requeridas como atividades quimiopreventivas uma vez que os processos associados à inflamação, tais como a produção aumentada de citocinas inflamatórias, a geração de EROs e espécies reativas do nitrogênio, contribuem para a transformação maligna das células (ALLAVENA e cols., 2011; KUNDU & SURH, 2008).

Em linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 tratadas com resveratrol, a redução da razão Bcl-2/Bax por meio da ativação da atividade da proteína p53 contribuiu para a atividade pró apoptótica do resveratrol encontrada em um estudo de Sakamoto e cols. (2010). Ferruelo e cols. (2014) mostraram que em células de câncer de próstata LNCaP, o tratamento com 5, 10 e 25 µM de resveratrol, induziu apoptose celular de forma mais significativa do que outros polifenois presentes no vinho tinto, tais como o ácido gálico e a quercetina. A apoptose neste estudo estava associada ao aumento da atividade das caspases 3 e 7.

2.5.2 Piperina

A pimenta preta (*Piper nigrum L.*) é um dos temperos mais utilizados no mundo em preparações culinárias, muito conhecida por seu constituinte pungente, a piperina (figura 10), um dos principais compostos bioativos estudados atualmente em diferentes modelos de pesquisas. A pimenta branca é produzida a partir da mesma espécie, porém, enquanto a pimenta preta é produzida por meio de uma breve cocção e ressecamento dos frutos verdes, a pimenta branca consiste nas sementes maduras secas e descascadas. A piperina faz parte do grupo dos alcaloides, compostos orgânicos nitrogenados encontrados em plantas, fungos e bactérias (MEGHWAL & GOSWAMI, 2013).

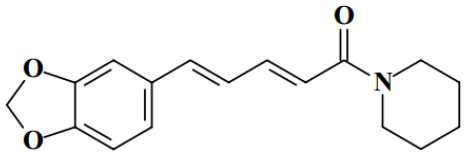


Figura 10. Estrutura química da piperina.

Além da piperina, a pimenta preta ainda conta com a presença de outros compostos bioativos, como ácidos fenólicos, terpenos, esteroides, lignanas, flavonas e os alcaloides (BUTT e cols., 2013; MUSENGA e cols., 2007; MURTHY & BHATTACHARYA, 2008), como a chavicina, piridina e a piperidina (SHAIKH e cols., 2006).

O interesse de estudo pela piperina está, não somente em suas ações benéficas isoladas, mas na sua propriedade em aumentar a biodisponibilidade e eficácia de diversas substâncias, incluindo, antibióticos, anti-inflamatórios e compostos bioativos presentes em alimentos. Os mecanismos associados a esta capacidade não foram completamente elucidados, mas está sugerido que a piperina consiga induzir alterações nas características de permeabilidade e fluidez das membranas de borda em escova do intestino delgado, resultando em aumento da sua superfície absortiva e maior eficiência na absorção através da barreira epitelial (KHAJURIA e cols., 2002).

Recentemente, tem sido descrito o papel da piperina sobre a resistência a múltiplas drogas (MDR, do inglês *Multiple Drug Resistance*) em alguns modelos experimentais como de câncer de mama, pulmão e cólon. Esta substância inibiu a expressão e atividade da bomba

de efluxo da glicoproteína-P (P-gp, do inglês *P-glycoprotein*), responsável por expulsar drogas do meio intracelular para o meio extracelular, em células de câncer de mama MDR. A piperina inibe ainda a expressão e atividade da bomba de efluxo MRP-1 em células de câncer de pulmão MDR (LI e cols., 2011). Este CBA tem mostrado também ser capaz de reverter a resistência à vimblastina, um quimioterápico, por meio da diminuição da atividade da P-gp em células de carcinoma de cólon MDR (OKURA e cols., 2010). Cardoso (2015) demonstrou que a piperina foi capaz de induzir sensibilidade colateral e reverter a resistência ao quimioterápico vincristina em células de leucemia mieloide crônica MDR, sendo que o mecanismo da piperina em promover a sensibilidade colateral parece estar relacionado com a expressão da P-gp pelas células tumorais.

2.5.2.1 Metabolismo e biodisponibilidade da Piperina

Após a ingestão oral, a piperina é absorvida pelo intestino e metabolizada no fígado por enzimas da família do citocromo P450 gerando metabólitos solúveis e de fácil excreção (RANG e cols., 2004).

A absorção intestinal de piperina é relativamente alta, em torno de 96% (SURESH & SRINIVASAN, 2010). Após a administração via oral de 20 mg/Kg de peso de ratos, observou-se que a piperina era rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, podendo ser detectada no plasma sanguíneo após 15 minutos de sua administração. Além disso, este composto permaneceu no sangue desses animais por até 8 horas, no entanto, sua concentração máxima detectável foi obtida após 30 minutos da sua ingestão (BAJAD e cols., 2003). Volak e cols. (2013), mostraram que a concentração sérica de piperina, após a ingestão de 24 mg da especiaria por indivíduos saudáveis, ficou em torno de 6 µM.

2.5.2.2 Efeitos biológicos da piperina

A pimenta preta tem sido utilizada como auxílio no alívio da dor, no tratamento do reumatismo, de gripes, resfriados, dores musculares, febre, no estímulo para o aumento da circulação sanguínea, no estímulo ao aumento da produção de saliva, como estimulante do apetite e no aumento do peristaltismo (MEGHWAL & GOSWAMI, 2013). A piperina também demonstrou melhorar o processo digestivo devido ao aumento da atividade das lipases intestinal e pancreática e a elevação da acidez gástrica (YAFFE e cols., 2014). Ainda,

este CBA tem sido associado a ações imunomodulatórias, anti-carcinogênicas, anti-asmáticas, hepatoprotetora, anti-inflamatória (DARSHAN & DORESWAMY, 2004) e antimicrobianas (YANG e cols., 2002).

Chonpathompikunlert e cols. (2010), em um estudo *in vivo*, mostraram que a utilização da piperina se associa à melhora do comprometimento da memória e da neurodegeneração em hipocampo de ratos, justificado pela queda na peroxidação lipídica e inibição da atividade da acetilcolinesterase, efeitos que poderão ser utilizados no tratamento da Doença de Alzheimer.

A piperina tem sido associada à redução do desenvolvimento do câncer, uma vez que previne ou retarda os danos às células e aos tecidos, inibindo as reações de oxidação, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, causadas por radicais livres (LIU e cols., 2010; MANOHARAN e cols., 2009; VELLAICHAMY e cols., 2009).

Este alcaloide pode inibir aspectos múltiplos associados ao processo de angiogênese em células de câncer, este efeito estaria envolvido na inibição da fosforilação de Akt pela piperina, trazendo expectativas sobre o uso deste CBA como inibidor do processo de geração de vasos em doenças dependentes deste fenômeno (DOUCETTE e cols., 2013).

Entre os efeitos anticâncer da piperina podemos incluir ainda ações quimiopreventivas e quimioterapêuticas. Alguns estudos mostram que a piperina é citotóxica para células tumorais tais como para linhagem B16-F10 de melanoma (PRADEEP & KUTTAN, 2002), células de linfoma e carcinoma (SUNILA & KUTTAN, 2004), impedindo o crescimento destas células em estudos *in vivo*. Ainda, a piperina inibe a migração celular e a invasão em linhagens de fibrosarcoma HT-1080, por meio da diminuição da expressão da enzima matriz metaloproteinase (MMP-9) (HWANG e cols., 2011).

Estudos indicam que a piperina é capaz de induzir células de câncer de cólon e de melanoma à apoptose e ao bloqueio do ciclo celular, e células de pulmão à apoptose (YAFFE e cols., 2014; FOFARIA e cols., 2014). A piperina também sensibiliza células de câncer de mama, que superexpressam o proto-oncogene HER2, para ação da droga anticâncer paclitaxel e, ainda, potencializa o efeito citotóxico da radioterapia em camundongos com melanoma e em células de câncer de cólon, sugerindo um possível uso desse composto como adjuvante na terapia do câncer (DO e cols., 2013; TAK e cols., 2012).

É sugerido ainda que a piperina exacerbe a ação preventiva da curcumina, quando associadas, no tratamento de células normais de mama (WICHA e cols., 2010).

2.5.3 Curcumina

Uma das plantas que tem merecido destaque por suas funções terapêuticas é a cúrcuma, presente na dieta oriental em países como China, Índia, Irã, entre outros. Seu pó utilizado na culinária, como corante, conservante e tempero, vem se associando ao tratamento de algumas doenças crônicas não transmissíveis tais como doenças hepáticas, reumatóides, neurodegenerativas, infecciosas, bacterianas, distúrbios digestivos e DM. Devido ao seu grande potencial antioxidante, a cúrcuma tem também sido associada a atividades anticâncer por seu potencial antioxidante, antinflamatório e antitumoral (BARTOSZ & BARTOSZ, 2014).

A cúrcuma é uma planta herbácea e perene. Atinge uma altura média de 120 a 150 cm de altura, com folhas grandes e enervadas que quando amassadas liberam um perfume agradável, mas é no seu rizoma arredondado que se encontra os óleos essenciais e o corante curcumina (figura 11), um polifenol bioativo lipofílico de grande interesse econômico. A concentração deste é o que determina o valor do produto no mercado mundial, devido sua elevada capacidade antioxidante. Existem ainda outros agentes, em menor quantidade, como a desmetoxicurcumina, bismedetoxicurcumina, que possuem ações diversas. A concentração de princípios ativos da curcumina é dependente de fatores como, solo, manuseio, clima, armazenamento e espécies (BERNARDES, 2000).

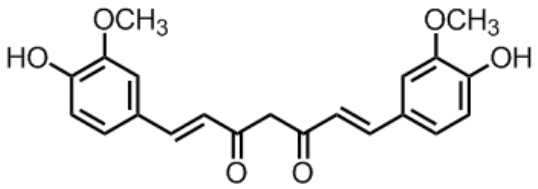


Figura 11. Estrutura química da curcumina.

2.5.3.1 Metabolismo de biodisponibilidade da curcumina

A maioria dos trabalhos que demonstram efeitos benéficos da curcumina no tratamento e controle de diferentes tipos de câncer, até o momento, foram realizados em culturas de células ou em modelos animais da doença. Nos modelos *in vivo* da doença, as

doses deste composto bioativo, que se mostraram efetivas, foram, em geral, altas, devido à baixa solubilidade em água e tempo de meia vida curto da substância, levando assim a uma biodisponibilidade reduzida da curcumina no plasma e em tecidos (LIANDONG e cols., 2014). Estudos em animais demonstraram que a biodisponibilidade oral de curcumina em ratos é de apenas 1% (YAN e cols., 2011).

2.5.3.2 Efeitos biológicos da curcumina

A curcumina tem sido associada a efeitos contra o desenvolvimento de certos tipos de câncer mostrando ações antinflamatórias e antioxidantes. Esta substância ainda possui um papel importante como um agente preventivo sobre o envelhecimento do sistema nervoso central e contra as doenças neurodegenerativas (KURZROCK e cols., 2008; FANG e cols., 2011).

Em humanos, a curcumina age diretamente sobre os radicais livres, reduzindo-os a metabólitos não prejudiciais por meio da doação de um hidrogênio, enquanto que na forma indireta pode induzir ou interferir na sinalização celular para expressão de proteínas antioxidantes (superóxido dismutase, glutationa peroxidase, catalase), as quais são naturalmente produzidas pelo organismo (BARTOSZ & BARTOSZ, 2014).

A curcumina atua ainda na inibição da cascata inflamatória ao modular o Fator Nuclear Kappa-β (NF-kβ), a Proteína Quinase Ativadora de Mutógenos (MAPK), vias da Ciclo-oxigenase-2 (COX) e Lipo-oxigenase (LOX), regulação negativa das citocinas proeminentes como o Fator de Necrose Tumoral (TNF-α), Interleucia 1 (IL-1), Interleucina 6 (IL-6), além de bloquear a expressão de moléculas de adesão celular que são necessárias para interação de leucócitos com células endoteliais e a acetilação de histonas em monócitos (CHIN e cols., 2014).

Genes supressores de tumor desempenham um papel vital e significativo na inibição da formação de tumores e da sua progressão. Caso ocorra uma mutação, esse gene perde sua capacidade de executar sua função. Kanai e cols. (2014) verificaram que a curcumina atua na regulação desses genes em pacientes com câncer pancreático. A curcumina possui ainda um papel vital na regulação positiva dos diferentes genes pró-apoptivos e alguns anti-apoptóticos. Além disso, ela tem a capacidade de modular alvos moleculares, como a NF-kβ que é um complexo protéico encontrado em quase todas as células e tem como função ser um fator de transcrição, contudo, quando sua regulação é incorreta, poderá haver uma associação com o

desenvolvimento de doenças inflamatórias, auto-imunes e ligadas ao câncer (RAHMANI, 2014). Já foi demonstrado que a curcumina pode atuar como um inibidor competitivo da GLO1, podendo assim estar relacionada à ação quimioterápica (SANTEL e cols., 2008).

Embora seus mecanismos de ação ainda não sejam bem conhecidos, a curcumina pode ser capaz de suprimir o desenvolvimento cancerígeno inibindo as enzimas que levam ao surgimento de tumores, além de induzir a apoptose de células cancerígenas, de forma que pode ser administrada isoladamente ou em combinação com outros agentes anticancerígenos, ou seja, ela está relacionada no processo de ativação da morte celular programada de células tumorais incluindo melanoma, linfoma, câncer hepático, de próstata, ovário, carcinomas pancreáticos e câncer de mama (KANAI, 2014; GUPTA, 2013). Algumas pesquisas, em diferentes tipos de câncer, vêm mostrando sinais significativos da eficiência da curcumina, porém, o número de indivíduos ainda é pequeno, a dosagem e os efeitos adversos ainda são desafios, portanto são necessários mais estudos rigorosos e de qualidade para sua comprovação científica.

3 JUSTIFICATIVA

A ação fisiológica dos polifenóis tem sido relacionada com a prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e com o câncer, principalmente por sua elevada capacidade antioxidante (DULAK, 2005; COSERI, 2009).

A quimioterapia é o tratamento mais utilizado para o câncer, porém existem diversos efeitos colaterais, como a toxicidade em células normais. Desta forma, a busca pela utilização de elementos que otimizem o tratamento poderá ser uma alternativa de auxílio à terapia convencional. Apesar das evidências bioquímicas, clínicas e epidemiológicas existentes em relação aos CBAs e o câncer, ainda se faz necessário estabelecer um consenso científico para a utilização desses compostos, seja como agente quimiopreventivo ou quimioterápico.

Em função das células cancerosas apresentarem um intenso metabolismo glicolítico, mecanismos de adaptações mutagênicas surgem, como o aumento da expressão de enzimas do sistema da glioxalase, o que diminui a concentração intracelular dos precursores dos AGEs (THORNALLEY & RABBANI, 2011). Sendo assim, torna-se necessário estudar esta via metabólica e a ação dos CBAs a fim de buscar alvos terapêuticos para o câncer de mama e para outros tipos de tumores.

É possível que os CBAs consigam, minimamente, atuar sobre a atividade da enzima que detoxifica os precursores dos AGEs, o MGO e o GO, impedindo a metabolização destes compostos e colaborando para que suas concentrações fiquem aumentadas, a nível celular. O efeito citotóxico dos α-oxaldeídos acumulados poderá contribuir para a morte das células cancerígenas. Assim sendo, estes mecanismos são possíveis alvos terapêuticos na prevenção e no tratamento do câncer.

Uma vez que não existem trabalhos que associem a ação do resveratrol, da piperina e da curcumina sobre a via da glioxalase nesta linhagem de células de câncer de mama, este estudo poderá gerar melhores perspectivas e novas estratégias terapêuticas para a área de oncobiologia.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos do resveratrol, da curcumina e da piperina, sobre o sistema da glioxalase e a ação destes compostos e dos precursores dos AGEs em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Na cultura de células de câncer de mama MCF-7 iremos:

- Avaliar o efeito do resveratrol, da curcumina e da piperina, isolados ou em combinação, sobre o crescimento celular em meios de alta e baixa concentração de glicose;
- Avaliar o efeito dos precursores dos AGEs sobre o crescimento celular;
- Verificar o efeito dos antioxidantes, GSH e NAC sobre a viabilidade celular;
- Mensurar alterações do potencial de membrana mitocondrial;
- Analisar a atividade da GLO1 nas células tratadas com os CBAs;
- Verificar a formação de D-lactato nas células tratadas com os CBAs.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. O resveratrol, a curcumina, a piperina, o GO, o MGO, a 3-DG, o coquetel de inibidores de proteases, o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio (MTT), a insulina bovina, o fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF), o fluoreto de sódio (NaF), dodecil sulfato de sódio (SDS), a hidrazina, a NAC, a GSH e a sonda fluorescente iodeto de 5,5', 6,6' -tetracloro1, 1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianina (JC-1) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O azul de tripan da VETEC (Brasil). O ácido ocadáico foi adquirido da Roche Applied Science (Indianapolis, IN, EUA). O DMEM (Dulbecco's Modified Eagle´s Medium) e a penicilina/estreptomicina da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA); O soro fetal bovino da Cultilab (Campinas, SP, BR).

5.2 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS CELULARES

As células da linhagem de câncer de mama humano MCF-7, foram cultivadas em garrafas de polietileno e poliestireno com área de 25 cm^2 e 75 cm^2.

O meio utilizado para cultura consiste em DMEM suplementado com 2,0 g/L de tampão HEPES, 3,7 g/L bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino, 5 µg/mL de insulina, 100 unidades/mL de penicilina G e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina bovina.

A linhagem celular MCF-7 foi mantida a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 (JIN e cols. 2009). Para a realização dos experimentos, as células foram subcultivadas na mesma densidade inicial e após alcançarem 70 a 80% de confluência foram tratadas.

5.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR

5.3.1 Tratamento

As células foram subcultivadas em placas com 96 poços ou 24 poços e após, incubadas em diferentes tempos (24 horas ou 48 horas), com concentrações crescentes de MGO e GO (0 a 10000 µM), 3-DG (0 a 20000 µM), resveratrol (0 a 500 µM), curcumina (0 a

100 µM) e piperina (0 a 300 µM), os três últimos CBAs foram diluídos em 0,5% de Dimetilsulfóxido (DMSO).

5.3.2 Redução de MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução de MTT adaptado de Mossman (1983). O ensaio de redução de MTT é baseado na habilidade das células viáveis de reduzirem o MTT, um composto solúvel de coloração amarela, em cristais de formazano, precipitado insolúvel de coloração roxa.

Após a incubação das células com os compostos, o meio foi retirado e as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) a 37°C. Em seguida, foi adicionado 100 µL de MTT diluído em DMEM sem vermelho de fenol e 10% de soro fetal bovino em concentração 1 mg/mL por 1 hora a 37°C. Após a incubação, a solução de MTT foi removida e foi acrescentado 200 µL de DMSO 100%.

A leitura foi realizada por espectrofotometria à 570 nm. A quantidade de MTT reduzido é lida na absorbância de 570 nm e os resultados obtidos em absorbância são expressos em percentagem de células vivas em relação ao controle (considerado como tendo uma viabilidade celular correspondente a 100%).

5.3.3 Contagem celular utilizando teste de exclusão com Azul de Tripan

As análises de viabilidade celular foram realizadas por meio do teste de exclusão pelo corante azul de tripan conforme protocolo descrito por Barile (1994). Foram transferidos 10 µL de células para *eppendorfs*, em seguida, foi adicionado 10 µL de solução de azul de tripan a 0,04 %. Após homogeneização, 10 µL do total foram utilizados para a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer. Esse método de contagem de células é baseado no princípio de que as células viáveis conseguem metabolizar o corante, já as células mortas, em necrose ou apoptose tardia, incorporam esse corante e ficam marcadas, permitindo contagem diferenciada entre células vivas e mortas (BARILE, 1994).

5.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS BIOATIVOS NA PRESENÇA DE ANTIOXIDANTES

5.4.1 Tratamento para o ensaio de citotoxicidade

As células MCF-7 foram subcultivadas em placas de 96 poços e a viabilidade foi avaliada nas culturas tratadas com GSH (nas concentrações de 50 a 300 µM) e NAC (nas concentrações de 0,5 a 5 mM) por 24 horas. Igualmente, as células foram tratadas com os antioxidantes por 30 min e em seguida foram adicionados o resveratrol ou a curcumina ou a piperina nos seus valores de IC50 previamente estabelecidos (131 µM, 24,5 µM e 94,5 µM, respectivamente). Como controle, as células foram tratadas com 0,5% de DMSO, veículo dos compostos.

5.4.2 Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de viabilidade celular realizado foi por quantificação da redução do MTT como descrito no item 5.3.2.

5.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLIOXALASE I

5.5.1 Tratamento para dosagem da atividade da GLOI

As células MCF-7 foram subcultivadas em garrafas de 75 cm^2 e os valores de IC50 de cada CBA, previamente estabelecidos, foram adicionados na presença ou ausência de 100 µM de GSH, adicionados 30 minutos antes da exposição ao CBA. O tratamento seguiu por 24 horas de incubação. Como controle, as células foram tratadas com 0,5% de DMSO, veículo dos compostos.

5.5.2 Obtenção dos extratos celulares

Após o tempo de incubação, o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS gelado e lisadas com a adição de nitrogênio líquido. Em seguida, foi adicionado tampão de lise contendo: Tris-HCl 5 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, fluoreto de sódio

5 mM, ácido ocadáico 1 µM, coquetel de inibidores de proteases em concentração final de 1 mM (Aprotinina A, Leupeptina, Bestatina e Pepstatina, E-64 e PMSF).

As células foram removidas dos recipientes utilizando *cell scraper*. Os extratos celulares foram colocados em um tubo tipo *eppendorff*, o qual foi centrifugado por 5 minutos a 4 ºC e 10.000 rpm. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY e cols., 1951) usando como padrão albumina de soro bovino (BSA). O lisado celular foi armazenado em tubo *eppendorff* e estocado, para análises posteriores.

5.5.3 Ensaio de atividade da GLO1

A solução para o ensaio de atividade da GLO1 continha 0.1 M de tampão sódio-potássio, pH 6.6, 2 mM de MGO e 2 mM de GSH. A reação foi monitorada por espectrofotometria seguindo a absorbância de 240 nm e 25 ºC, devido a formação de S-D-lactoilglutationa. A atividade foi calculada em unidades/mg de proteína (IU/mg), onde IU é definido pela quantidade da enzima que catalisa a formação de 1 µmol de S-D-lactoilglutationa/min na concentração saturada do substrato (HANSEN e cols., 2012).

5.6 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL (ΔΨM)

5.6.1 Tratamento para a determinação do (ΔΨm)

As células MCF-7 foram subcultivadas e após 24 horas foram tratadas com os valores de IC50 de cada CBA, previamente estabelecido, ou com 24,5 µM de cada CBA, para comparação entre os grupos. Como controle, as células foram tratadas com 0,5% de DMSO, veículo dos compostos.

5.6.2 Ensaio para determinação do ΔΨm

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado pela utilização da sonda flurescente JC-1 marcador utilizado para mensurar o ΔΨm. O JC-1 é uma sonda catiônica mitocondrial vital, lipofílica que se acumula na mitocôndria proporcionalmente ao ΔΨm. Dessa forma, em altos ΔΨm, ela forma agregados no interior da mitocôndria, com mudanças nas suas propriedades fluorescentes. No estado monomérico, o corante fluoresce verde, enquanto no

estado agregado o corante fluoresce vermelho. Em células com danos mitocondriais ou alterações no ΔΨm, o corante não se agrega, mantendo sua forma monomérica e emitindo uma fluorescência verde. A despolarização mitocondrial é indicada por uma diminuição na proporção de intensidade de fluorescência vermelho/verde.

Após a incubação por 24 horas, as células MCF-7 foram lavadas em tampão PBS e incubadas com 10 μg/mL de JC-1 por 10 minutos, no escuro, à 37°C. Em seguida, o JC-1 foi retirado e as células foram lavadas com PBS. Os valores de ΔΨm foram obtidos por espectrofluorimetria nos seguintes comprimentos de onda: 480 e 530/590 nm excitação e emissão, respectivamente. Os valores foram expressos pela razão da emissão entre a fluorescência vermelho/verde (590/530).

5.7 ANÁLISE DO POTENCIAL SINÉRGICO OU ANTAGÔNICO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS EM ASSOCIAÇÃO

5.7.1 Tratamento

Para avaliar a citotoxicidade dos CBAs em combinação, as substâncias foram associadas em pares nas concentrações indicadas por Yang & Liu (2009) onde, de acordo com o IC50 de cada composto, aquele que obteve, isoladamente, um efeito melhor sobre a viabilidade celular da MCF-7, ficou definido por uma concentração menor de IC50, sendo então testado nas seguintes concentrações: 0,125 x IC50; 0,25 x IC50; 0,5 x IC50; 0,75 x IC50; 1,0 x IC50; e 1,25 x IC50. O composto associado foi combinado ao anterior nas seguintes concentrações: 0,125 x (IC50)/2; 0,25 x (IC50)/2; 0,5 x (IC50)/2; 0,75 x (IC50)/2; 1,0 x (IC50)/2; e 1,25 x (IC50)/2.

5.7.2 Índice de Combinação (IC) para determinação do efeito sinérgico, aditivo ou antagônico

Após a análise de viabilidade celular, a determinação dos valores de IC50 e IC para 50% de inibição celular foi determinado pelo método descrito por Chou (1991) utilizando o programa CalcSyn (Biosoft). Para a análise dos compostos usados em combinação foi utilizada a equação do isobolograma clássico, onde: (D)1 e (D)2 são as doses de dois compostos utilizados em combinação e (Dx)1 e (Dx)2 são as doses de dois compostos

utilizados isoladamente. Para a análise da combinação, IC < 1, IC = 1 e IC > 1 indicam, respectivamente, efeito sinérgico, aditivo e antagônico.

$$IC = ((D)1/(Dx)1) + ((D)2/(Dx)2)$$

5.8 DOSAGEM DE D-LACTATO

Após o tratamento das células por 24 horas com os CBAs, nas concentrações de IC50 previamente estabelecidas, a mensuração de D-lactato foi realizada em um meio hidrazina/glicina, pH igual a 9,2, contendo 5 mg/ml de β-NAD e 15 unidades/ mL de lactato desidrogenase para um volume final de 200 µL. A absorbância sobre a formação de NADH foi monitorada em espectrofotômetro à 340 nm e os resultados foram correlacionados com a presença de lactato nas amostras em comparação a uma curva padrão. Como controle positivo do experimento foi realizada a incubação com Antimicina-A (AMOEDO e cols., 2011).

5.9 WESTERN BLOTTING

A obtenção dos extratos celulares para o *Western blotting* foi realizada conforme item 5.5.2.

Quantidades iguais das amostras de extratos celulares (100 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) 10% ou 12% (LAEMMLI, 1970) e as proteínas foram transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (Immobilon P, Millipore, Bedford, MA, EUA) (TOWBIN et al., 1979). As membranas foram bloqueadas por 18 horas a 4°C em tampão Tris-salino contendo 1% de Tween 20 (TBS-T) e 5% de leite em pó desnatado e incubadas por 2 horas com os anticorpos primários (1:1000). Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (1:5000) por 1 hora. A imunodetecção das bandas foi visualizada por quimioluminescência, utilizando o kit ECL *Western Blotting Detection System* (*GE Healthcare, Buckinghamshire, UK*), de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram utilizados como controle interno para verificação do carregamento de proteínas no gel. Foi utilizado o anticorpo primário monoclonal anti-GLO1 na diluição de 1 x 1000 (*Sigma*

Aldrich). A quantificação das bandas foi determinada por análise densitométrica, utilizando o programa Image J versão 1.43p (NIH, USA).

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos experimentos foram submetidos à análise estatística descritiva, média e erro padrão, análise de variância (ANOVA), usando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Resultados com valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6 RESULTADOS

Inicialmente foi realizado o ensaio de citotoxicidade pela técnica de MTT com os precursores dos AGEs (MGO, GO e 3-DG) ou os CBAs (resveratrol, curcumina e piperina) na linhagem celular de câncer de mama MCF-7 para a determinação do IC50 (Figura 12).

Em 24 horas de tratamento foram observados os seguintes valores de IC50: GO 2800 µM (Figura 12A), MGO 2780 µM (Figura 12B), resveratrol 131 µM (Figura 12D), curcumina 24,5 µM (Figura 12E) e piperina 94,5 µM (Figura 12F). Já em 48 horas de tratamento, os valores foram os seguintes: GO 1500 µM (Figura 12A), MGO 1460 µM (Figura 12B), resveratrol 83,9 µM (Figura 12D), curcumina 11,4 µM (Figura 12E) e piperina 38,3 µM (Figura 12F) conforme apresentado na tabela 1.

MCF-7		
Composto	**IC50 (µM)24 horas**	**IC50 (µM)48 horas**
Metilglioxal	2780	1460
Glioxal	2800	1500
Resveratrol	131,0	83,9
Curcumina	24,5	11,4
Piperina	94,5	38,3

Tabela 1. Valores do IC50 dos precursores de AGEs e dos compostos bioativos na viabilidade da linhagem celular de mama MCF-7 em 24 horas e 48 horas. Células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio D-MEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de CO_2. As substâncias: MGO, GO, resveratrol, curcumina e piperina foram adicionadas a diferentes concentrações. O valor do IC50 foi calculado a partir da equação da regressão linear mensurado pelo programa GraphPadPrism 5.

Esses dados indicam que a viabilidade celular diminuiu de maneira dose e tempo dependente em relação às células que não foram tratadas tanto com os α-oxaldeídos quanto com os CBAs, sugerindo assim, que as substâncias testadas apresentam um efeito citotóxico para as células MCF-7. Estes dados também demonstram que tanto o GO quanto o MGO tiveram uma mesma ação citotóxica sobre a MCF-7 (figura 12A e 12B). A ação citotóxica dos CBAs foi maior ao comparar com os α-oxaldeídos. Entre os CBAs, a curcumina apresentou o

melhor efeito de citotoxicidade sobre a viabilidade da MCF-7 (figura 12E). A 3-DG não demonstrou efeito citotóxico sobre a viabilidade celular da MCF-7, esses resultados estão apresentados na figura 12C.

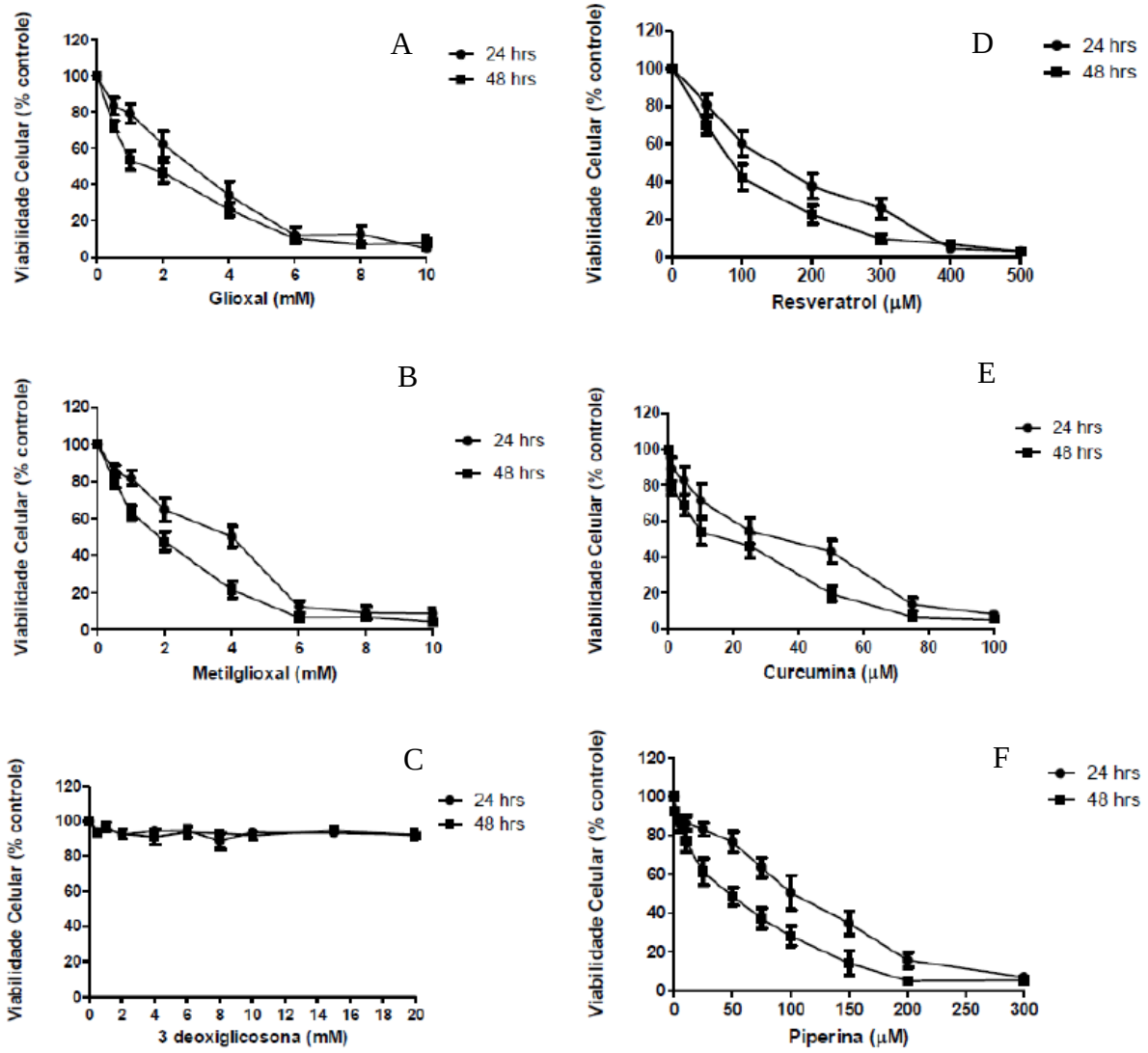


Figura 12. Efeito dos α-oxaldeídos e dos compostos bioativos na viabilidade das células MCF-7 em 24 horas e 48 horas. Células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio D-MEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de CO_2. As substâncias: GO (A), MGO (B), 3-DG (C), resveratrol (D), curcumina (E) e piperina (F) foram adicionadas a diferentes concentrações como indicado nas abcissas. As células foram incubadas com as substâncias por 24(●) e 48 (■) horas. Os resultados são expressos como % comparados com o controle. Os valores representam médias ± SE (n = 3).

A fim de confirmar os resultados de citotoxicidade celular obtidos por meio do método de MTT, foram realizados testes de citotoxicidade por um outro método, o ensaio de exclusão do azul de tripan, que baseia-se na incorporação do corante azul de tripan pelas células em apoptose tardia ou necrose, possibilitando a diferenciação entre células vivas e mortas. Para isso, a linhagem MCF-7 foi tratada com as concentrações de IC50 determinadas pelo método MTT de cada CBA, para cada um deles, por 24 horas (figuras 13, 14 e 15). Desta forma, tentamos avaliar, no ensaio de exclusão do azul de tripan, se estas concentrações gerariam um efeito de citotoxicidade semelhante ao encontrado por meio do método de MTT. Para fins de comparação entre os grupos, realizamos três experimentos, sendo que em cada um deles o valor de concentração do CBA foi igual para todos os compostos, resveratrol, curcumina e piperina, baseado nos resultados de IC50 pelo método MTT: Figura 13, concentração igual ao IC50 da curcumina (24,5 µM), figura 14, concentração igual ao IC50 da piperina (94,5 µM) e figura 15, concentração igual ao IC50 do resveratrol (131 µM). Após as 24 horas de tratamento foi feita a contagem celular utilizando o azul de tripan. A viabilidade celular na linhagem MCF-7 no tratamento com os α-oxaldeídos não foi avaliada pelo método azul de tripan.

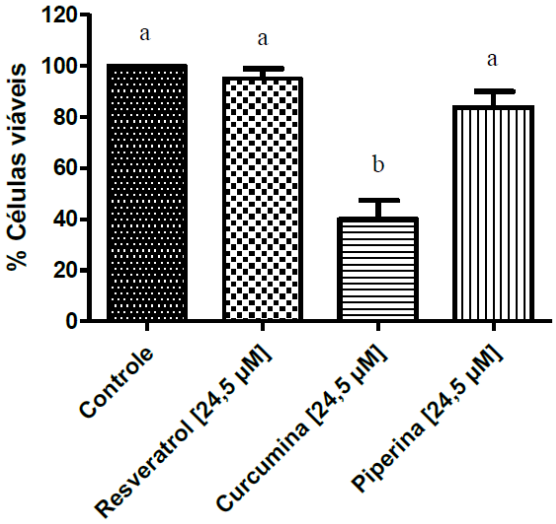
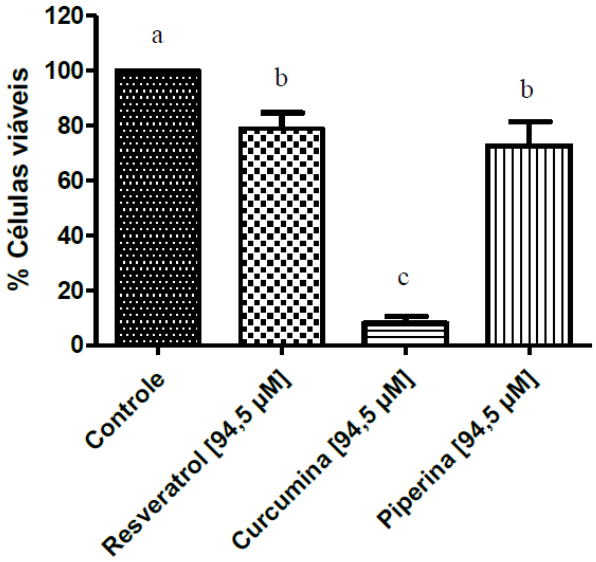


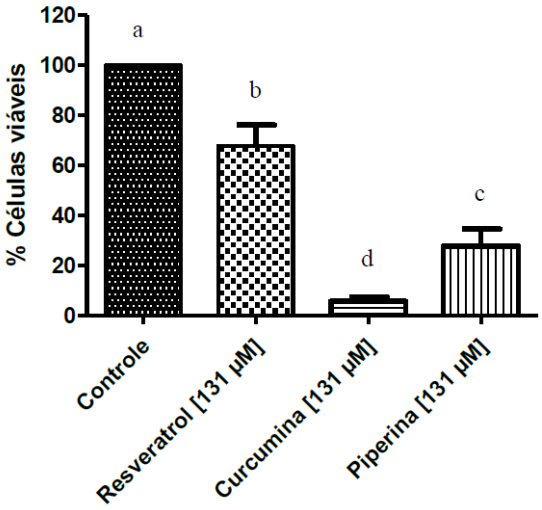
Figura 13. Efeito do resveratrol, da curcumina e da piperina, na concentração de 24,5 µM, sobre a contagem de células MCF-7 em 24 horas de tratamento. As células MCF-7 foram incubadas com azul de tripan (0,04 %) após 24 horas do tratamento com 24,5 µM de resveratrol ou curcumina ou piperina. Os dados representam a média ± erro padrão de 3 experimentos independentes. * Nível de significância de $p < 0,05$.

O resultado observado na figura 13 demonstra que a curcumina, na concentração de 24,5 µM (IC50 determinado pelo método MTT), foi citotóxica para a MCF-7, ratificando os dados encontrados no ensaio de MTT. Nesta concentração, o resveratrol e a piperina não se demonstraram citotóxicos à MCF-7.



F**igura 14. Efeito do resveratrol, da curcumina e da piperina, na concentração de 94,5 µM, sobre a contagem de células MCF-7 em 24 horas de tratamento.** As células MCF-7 foram incubadas com azul de tripan (0,04 %) após 24 horas do tratamento com 94,5 µM de resveratrol ou curcumina ou piperina. Os dados representam a média ± erro padrão de 3 experimentos independentes. * Nível de significância de $p < 0,05$.

Assim como no experimento anterior, as células foram tratadas pelos CBA´s, mas desta vez na concentração de 94,5 µM (IC50 da piperina estabelecido por meio do ensaio de MTT). Conforme pode ser visto na figura 14, observa-se que, nesta concentração, a curcumina se torna extremamente citotóxica à MCF-7, enquanto o resveratrol e a piperina passam a demonstrar um efeito citotóxico sobre esta linhagem de células, novamente ratificando os dados encontrados com a piperina pelo ensaio de MTT.



F**igura 15. Efeito do resveratrol, da curcuina e da piperina, na concentração de 131 µM, sobre a contagem de células MCF-7 em 24 horas de tratamento.** As células MCF-7 foram incubadas com azul de tripan (0,04 %) após 24 horas do tratamento com 131 µM de resveratrol ou curcumina ou piperina. Os dados representam a média ± erro padrão de 3 experimentos independentes. * Nível de significância de $p < 0,05$.

Adicionalmente, as células foram tratadas por 24 horas com a concentração de 131 µM (IC50 do resveratrol determinado pelo ensaio de MTT) para todos os CBAs (figura 15). A curcumina, nesta concentração, novamente se demonstrou bastante citotóxica. A piperina apresentou uma citotoxicidade aumentada em relação à concentração utilizada no experimento anterior (igual a 94,5 µM), enquanto o resveratrol ratificou os dados encontrados por meio do ensaio de MTT. No entanto, notou-se uma diferença entre a viabilidade da linhagem celular MCF-7 pelo ensaio de redução do MTT em relação ao método de contagem celular com azul de tripan. Esses ensaios apresentam diferentes princípios metodológicos, portanto essa distinção poderia ser justificada dessa forma. Além disso, no ensaio de MTT foi feita uma curva de concentração, enquanto que no experimento com azul de tripan foram testados apenas três concentrações pontuais dos CBAs, em cada experimento.

A fim de entender as razões da citotoxicidade gerada pelos CBAs à linhagem MCF-7, e entendendo que a mitocôndria possui um papel importante no metabolismo glicolítico, sendo organelas essenciais para vida e morte celular, tornou-se importante investigar qual seria o efeito do tratamento da MCF-7 com os valores de IC50 dos CBAs sobre o $\Delta\Psi m$ com a carbocianina catiônica lipofílica JC-1, nos comprimentos de onda 480 e 530/590 nm de excitação e emissão, respectivamente. Quando o $\Delta\Psi m$ está intacto, a diferença de potencial gerada através da membrana mitocondrial interna (negativa do lado interno) leva ao acúmulo

de substâncias solúveis. No entanto, em altos ΔΨm, o corante lipofílico JC-1 se acumula e forma agregados, com mudanças nas suas propriedades fluorescentes. No estado monomérico, o corante fluoresce verde, enquanto no estado agregado o corante fluoresce vermelho. A emissão de fluorescência vermelha derivada da formação de agregados é, portanto, indicativa de um alto ΔΨm. Em células com danos mitocondriais ou alterações no ΔΨm, o corante não se agrega, mantendo sua forma monomérica e emite uma fluorescência verde. Assim, a formação e a manutenção de agregados são dependentes do gradiente eletroquímico, sendo a razão entre a fluorescência vermelha/verde (590/530), a representação do ΔΨm.

Assim sendo, nas células MCF-7 incubadas por 24 horas com os valores de IC50 dos CBAs previamente estabelecidos, foi observado que os grupos tratados com resveratrol ou curcumina ou piperina, este último em menor efeito, tiveram uma redução do seu ΔΨm quando comparadas com as células do grupo controle (Figura 16), indicando que os CBAs causaram danos à mitocôndria da célula estudada.

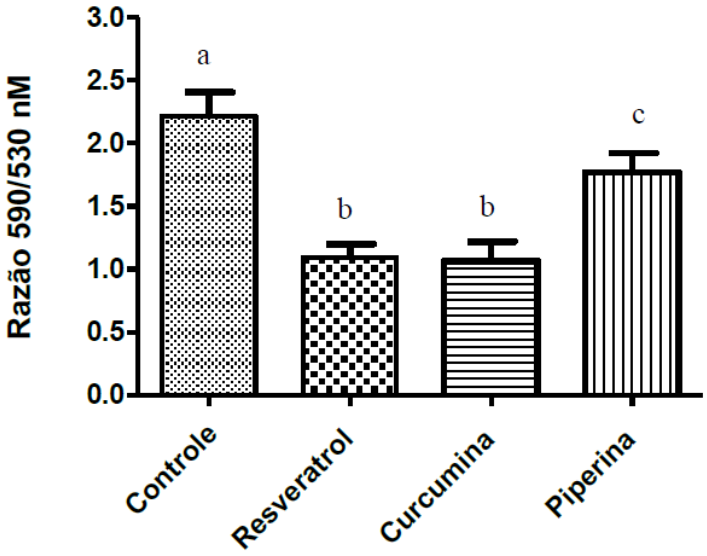


Figura 16. Avaliação do ΔΨm da célula MCF-7 tratada com os valores de IC50 dos compostos bioativos. Células MCF-7 foram semeadas em placas de 96 poços em meio D-MEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de CO_2. O resveratrol ou a curcumina ou a piperina foram adicionados nos seus valores de IC50 pré-estabelecidos: resveratrol [131 µM]; curcumina [24,5 µM]; piperina [94,5 µM]. As células foram incubadas durante 24 horas. Os resultados são expressos por meio da comparação com o resultado controle e os valores representam médias ± SE (n = 5). ANOVA $p \leq 0,05$.

Para correlacionar estes dados com os resultados de citotoxicidade previamente descritos, repetimos o experimento utilizando uma concentração padrão para cada CBA. Sendo assim, foi eleita a concentração de IC50 da curcumina (24,5 µM) para todos os CBAs, por ser a menor concentração.

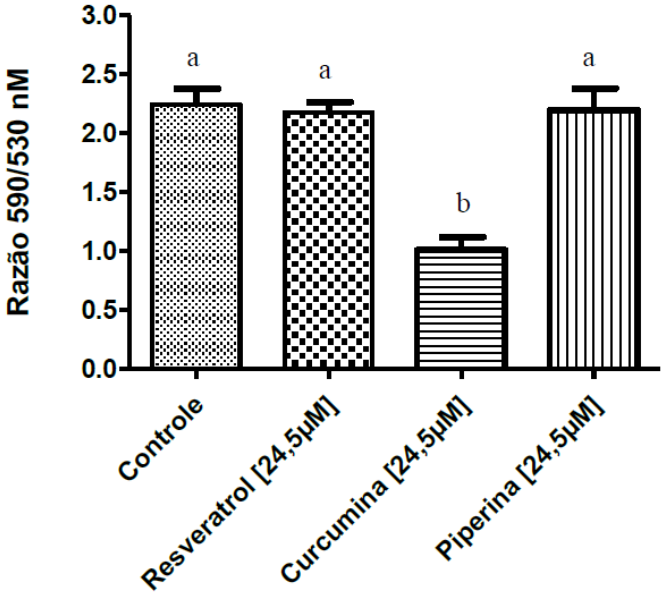


Figura 17. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial da célula MCF-7 tratadas com os compostos bioativos na concentração de 24,5 µM. Células MCF-7 foram semeadas em placas de 96 poços em meio D-MEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de CO_2. O resveratrol ou a curcumina ou a piperina foram adicionados na concentração final de 24,5 µM. As células foram incubadas durante 24 horas. Os resultados são expressos através da comparação com o resultado controle e os valores representam médias ± SE (n = 5). ANOVA $p \leq 0,05$.

Como é possível observar na figura 17, na concentração de 24,5 µM, o resveratrol e a piperina não demonstraram efeitos sobre o $\Delta\Psi m$, concordando com os dados de citotoxicidade celular previamente demonstrados.

O acúmulo excessivo de MGO pode induzir modificações em proteínas mitocondriais levando a disfunção da mitocôndria e aumento nos níveis de EROs. A partir do entendimento de que o aumento nos níveis de EROs ou da glicação de proteínas mitocondriais poderá desencadear a diminuição do potencial de membrana mitocondrial, já elucidado na literatura (BOTA & DAVIES, 2001; RABBANI & THORNALLEY, 2011; GALLUZI e cols., 2013), foi investigado se alguns antioxidantes poderiam demonstrar um efeito protetor sobre a viabilidade das células tratadas. O GSH é um conhecido antioxidante, encontrado na maioria

das células e amplamente utilizado em pesquisas com sistemas biológicos, com a finalidade de avaliar o estado redox. O GSH faz parte do sistema da glioxalase, atuando como cofator da GLO1, na primeira etapa da reação (THORNALLEY, 1999).

Para isso, com o intuito de descartar a interferência do GSH na viabilidade das células MCF-7, estas foram incubadas com concentrações crescentes de GSH por 24 horas e o ensaio de MTT foi realizado. O resultado, apresentado na figura 18, mostra que não houve alteração na viabilidade celular das células MCF-7 quando tradadas apenas com GSH nas concentrações que variaram de 50 a 300 µM.

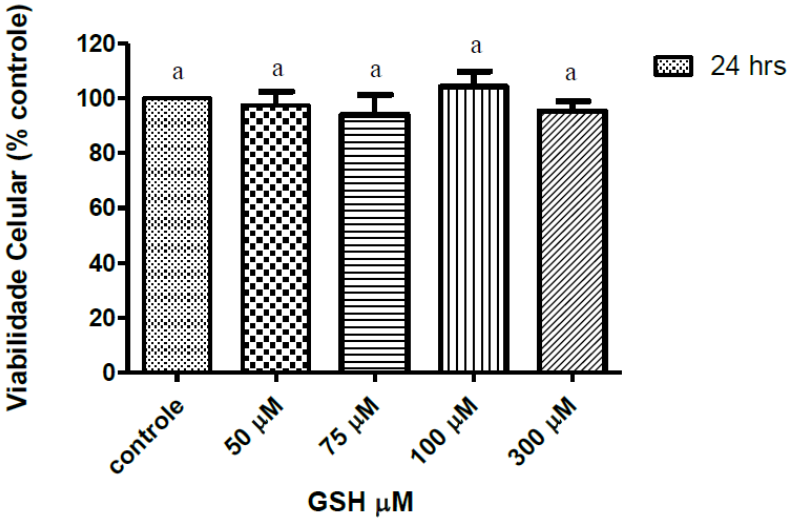


Figura 18. Viabilidade celular da MCF-7 tratada com diferentes concentrações de GSH. Células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio D-MEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de CO_2. GSH foi adicionado a diferentes concentrações como indicado nas abcissas. As células foram incubadas com GSH durante 24 horas. Os resultados são expressos como % comparados com o controle e os valores representam médias ± SE (n = 3).

Após observarmos que diferentes concentrações de GSH não alteram a viabilidade das células MCF-7, avaliamos se o pré-tratamento com GSH protegeria as células MCF-7 do efeito dos CBAs sobre a viabilidade celular. Para isso, as células MCF-7 foram pré-tratadas por 30 minutos com diferentes concentrações de GSH e, em seguida, foram adicionados os CBAs nos seus valores de IC50 pré-estabelecidos, deixando incubar por mais 24 horas.

Na figura 19 é possível observar que, nos grupos pré-tratados com o GSH, conforme se aumenta a concentração do antioxidante aumenta a viabilidade celular, apesar de que nenhum grupo atingiu os 100% do controle. Previamente demonstramos que em 24 horas de tratamento com os CBAs houve queda no percentual de células viáveis. Nas células tratadas

com curcumina e GSH (Figura 19B), é possível observar que na concentração de 100 µM, o pré-tratamento com GSH protegeu integralmente a célula do efeito citotóxico da curcumina. Nas células tratadas com resveratrol e piperina, também foi possível observar um efeito protetor do antioxidante (Figura 19A e 19C). Esses dados podem sugerir que este efeito protetor do GSH ocorre em razão do controle sobre a geração de EROs, possivelmente associada ao tratamento com os CBAs, ou pela otimização do sistema da glioxalase com a suplementação do seu cofator, o GSH. Percebe-se ainda que na concentração de 300 µM de GSH, o grupo tratado com curcumina teve uma queda na viabilidade celular. Podemos especular que a presença do GSH em adição a curcumina, nesta concentração, poderia estar gerando algum efeito de citotoxicidade, não observado na curva estabelecida inicialmente, mas talvez estimulado pela presença do CBA por meio de um efeito sinérgico.

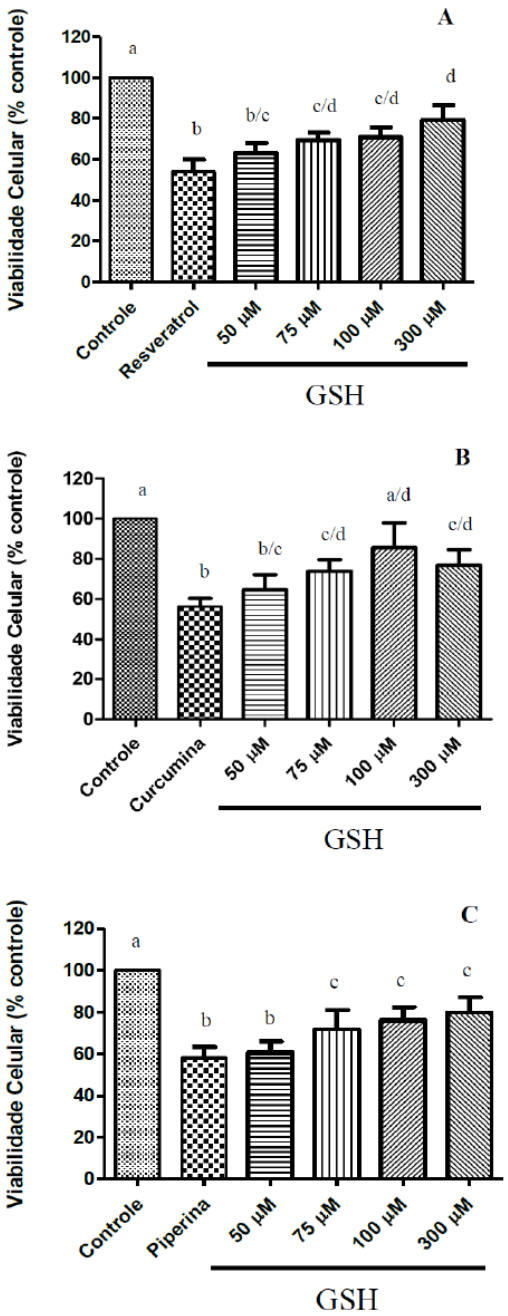


Figura 19. Viabilidade celular da MCF-7 tratada com resveratrol ou curcumina ou piperina e diferentes concentrações de GSH. Células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio D-MEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de CO_2. GSH foi adicionado em diferentes concentrações como indicado nas abcissas, por 30 min, e, posteriormente, o resveratrol (A), ou curcumina (B) ou piperina (C), nos seus valores de IC50 pré-estabelecidos por 24 horas. Os resultados são expressos como % comparados com o controle e os valores representam médias ± SE (n = 3). "a" ≠ de "b" ≠ de "c" ≠ de "d" $p \leq 0,05$.

A NAC é um antioxidante não enzimático que age, principalmente, bloqueando a cadeia de peroxidação lipídica, eliminando oxigênio ou quelando íons metálicos (THORNALLEY, 1999). A NAC promove a síntese do GSH aumentando a disponibilidade de cisteína, elevando assim os níveis de gama-glutamil-cisteína-sintetase, enzima limitante sobre a rota de formação de GSH (KUMAR e cols., 2014). Desta forma, a fim de entender se a NAC, assim como o GSH, teria um efeito protetor sobre a viabilidade das células tratadas com os CBAs, o mesmo ensaio foi realizado com este antioxidante.

Primeiramente, as células MCF-7 foram tratadas com concentrações crescentes de NAC por 24 horas e o teste de viabilidade celular foi executado. Foi verificado que diferentes concentrações de NAC não foram capazes de alterar a viabilidade celular da MCF-7 (Figura 20).

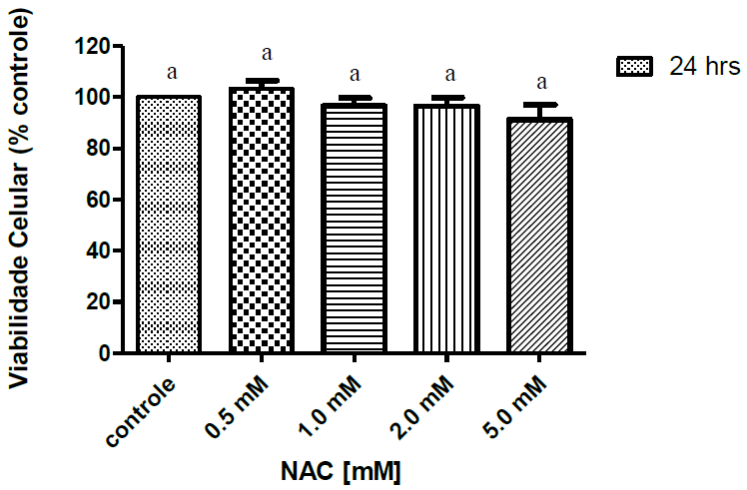


Figura 20. Viabilidade celular da MCF-7 tratada com diferentes concentrações de NAC. Células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio D-MEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de CO_2. NAC foi adicionada a diferentes concentrações como indicado nas abcissas. As células foram incubadas com NAC durante 24 horas. Os resultados são expressos como % comparados com o controle e os valores representam médias ± SE (n = 3).

Obtendo este resultado, como feito com GSH, foi observado se o pré-tratamento com NAC protegeria as células MCF-7 do efeito dos CBAs sobre a viabilidade celular. Para isso, as células MCF-7 foram tratadas com concentrações de NAC que variaram entre 0,5 mM a 5,0 mM e, após 30 minutos, foram adicionados os CBAs nos seus valores de IC50 pré-estabelecidos, deixando incubar por mais 24 horas.

Como é possível observar na figura 21, a pré-incubação com a NAC também demonstrou um papel protetor na viabilidade celular comparada a ação dos CBAs, mostrando uma reversão na viabilidade celular em relação ao controle nos grupos tratados com resveratrol (Figura 21A) e piperina (Figura 21C), e parcial, no grupo tratado com a curcumina (Figura 21B). O efeito positivo da NAC pode estar associado ao seu papel como antioxidante, minimizando a presença de EROs, possivelmente gerada em razão da presença dos CBAs. A NAC pode também estar gerando substrato para formação da GSH e, desta forma, otimizando a atividade da GLO1 sobre a detoxificação dos α-oxaldeídos. Ressalta-se ainda que a NAC não demonstrou um efeito protetor tão expressivo no grupo tratado com a curcumina como visto na pré incubação com GSH.

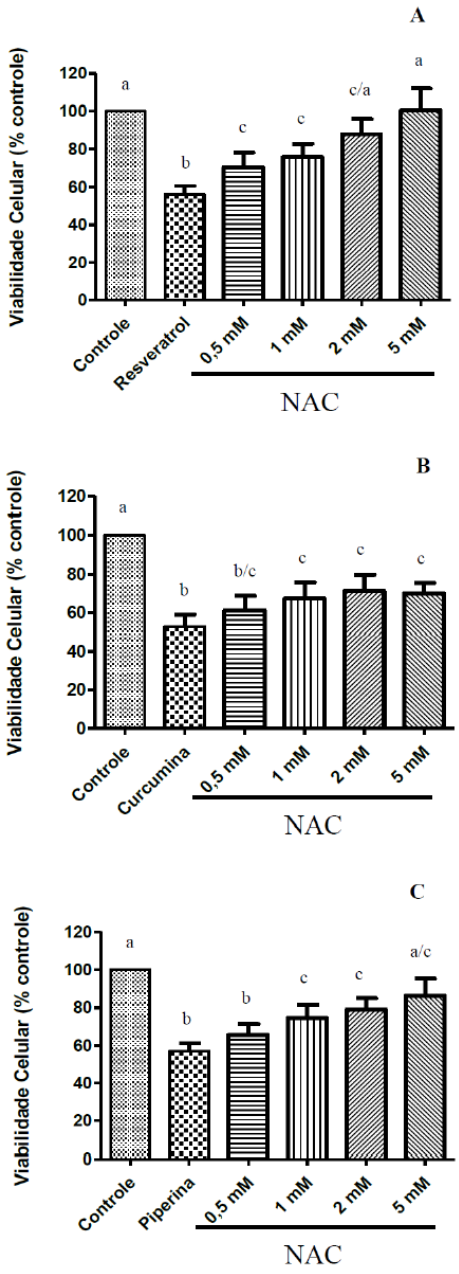


Figura 21. Viabilidade celular de MCF-7 tratada com resveratrol ou curcumina ou piperina diferentes concentrações de NAC. Células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio D-MEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de CO_2. NAC foi adicionada em diferentes concentrações como indicado nas abcissas na presença do resveratrol (A), da curcumina (B) e da piperina (C), nos seus valores de IC50 pré-estabelecidos. As células foram incubadas com NAC por 30 min e, posteriormente, com os CBAs durante 24 horas. Os resultados são expressos como % comparados com o controle e os valores representam médias ± SE (n = 3). “a” ≠ de “b” ≠ de “c” $p \leq 0,05$.

Como já descrito, a GLO1 é uma das enzimas componentes do sistema da glioxalase, um sistema fisiológico de detoxificação do GO e MGO (KUMAR e cols., 2014). Em razão da extensa utilização da via glicolítica por células cancerosas, menciona-se a mutação no gene da GLO1 com consequente aumento de sua expressão objetivando otimizar a detoxificação dos α-oxaldeídos gerados na glicólise (GATENBY & GILLIES, 2004). Considerando, desta forma, que a GLO1 seja uma enzima importante sobre a vida e morte celular, foi investigado se sua atividade enzimática poderia sofrer alteração com o uso dos CBAs. Assim, as células MCF-7 foram tratadas por 24 horas com os valores de IC50 dos CBAs, previamente estabelecidos, e o extrato protéico obtido das amostras foi utilizado para o ensaio de atividade da GLO1.

Foi possível observar, como apresentado na figura 22, que o resveratrol e a curcumina, assim como a piperina, em menor grau de inibição, mostraram uma diminuição da atividade da GLO1. Sugere-se, desta forma, um comprometimento da detoxificação dos α-oxaldeídos pelo sistema da glioxalase e, justifica-se a citotoxicidade previamente demonstrada. Quando os grupos são pré-tratados com a GSH na concentração de 100 µM, eleita a melhor concentração de proteção à ação citotóxica dos CBAs no ensaio de viabilidade celular, à exceção do tratamento com a piperina, novamente observamos um efeito protetor do antioxidante à ação dos CBAs, mostrando total reversão da atividade enzimática (figura 22A e 22B). Conseguimos associar, ainda, os dados de citotoxicidade com os de atividade enzimática no grupo tratado com piperina, uma vez que percebe-se que a proteção do GSH ao efeito citotóxico foi menor no grupo tratado com piperina em relação aos grupos tratados com o resveratrol e com a curcumina. Este dado corrobora com o resultado sobre a atividade enzimática (figura 22C), onde nota-se que a atividade da enzima no grupo tratado com piperina não é protegida no pré-tratamento com o mesmo antioxidante.

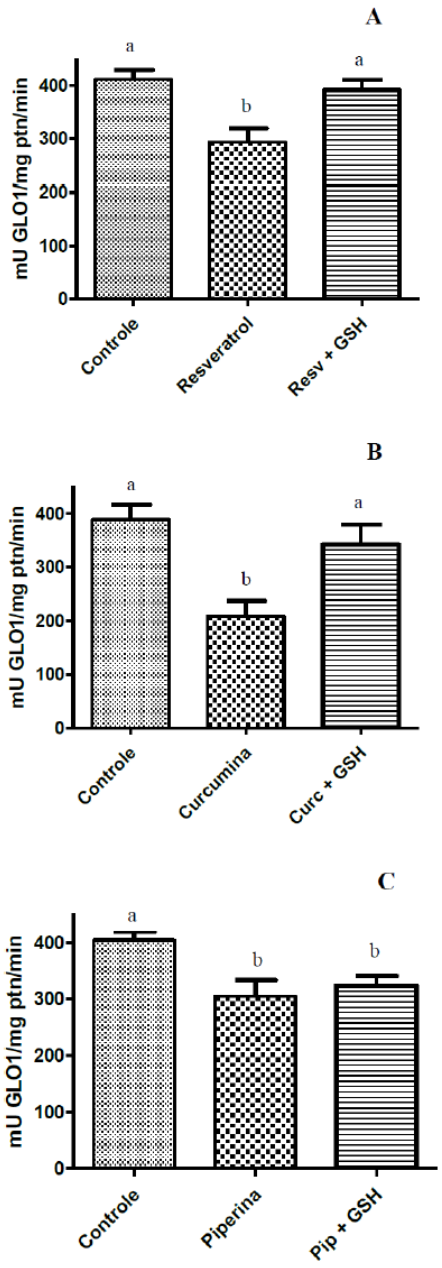


Figura 22. Atividade da GLO1 em células MCF-7 pré-tratadas com GSH e pós-tratadas com resveratrol ou curcumina ou piperina por 24 horas. As células foram incubadas com os valores de IC50 do resveratrol (A), curcumina (B) e piperina (C) pré-estabelecidos ou veículo (DMSO 0,5%) por 24 horas e pré-tratadas com GSH, na concentração de 100 µM por 30 minutos, e logo após incubadas com os valores de IC50 do resveratrol (A), curcumina (B) e piperina (C) pré-estabelecidos por 24 horas. Após o tratamento, as células foram lisadas, os extratos obtidos e a atividade da GLO1 foi determinada. Os resultados em mU de GLO1/ mg de proteína/ minuto comparados com o controle e os valores representam médias ± SE (n = 3). “a” ≠ de “b” ≠ de “c” $p \leq 0,05$.

Uma vez obtido o dado de que os CBAs interferem sobre a atividade da GLO1, tornou-se importante avaliar o efeito de diferentes concentrações dos CBAs sobre a atividade da mesma enzima. Neste sentido, as células MCF-7 foram novamente tratadas por 24 horas com os valores de IC50 dos CBAs previamente estabelecidos, em concentrações aproximadamente 30% menores que seus valores de IC50 e em concentrações aproximadamente 30% maiores que seus valores de IC50, como observado na figura 23.

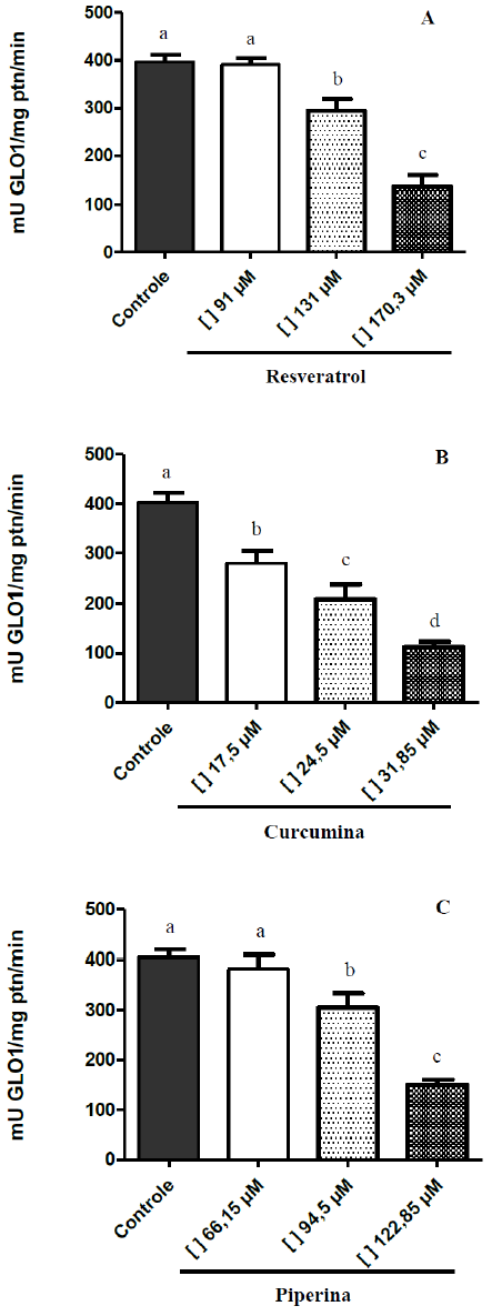


Figura 23. Atividade da GLO1 em células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações de resveratrol ou curcumina ou piperina por 24 horas. As células foram incubadas com resveratrol, nas concentrações de 91 µM, 131 µM e 170,3 µM (A), curcumina, nas concentrações de 17,5 µM, 24,5 µM e 31,85 µM (B) e piperina, nas concentrações de 66,15 µM, 94,5 µM e 122,85 µM (C) ou veículo (DMSO 0,5%) por 24 horas. Após o tratamento, as células foram lisadas, os extratos obtidos e a atividade da GLO1 foi determinada. Os resultados são expressos em mU de GLO1/ mg de proteína/ minuto comparados com o controle e os valores representam médias ± SE (n = 3). “a” ≠ de “b” ≠ de “c” ≠ “d”, $p \leq 0,05$.

É possível observar que a ação dos CBAs sobre a atividade da GLO1 parece ser dose dependente, isto é, quanto maior a concentração do CBA, menor a atividade da enzima. Estes dados culminam com os dados de citotoxicidade vistos previamente, onde observamos que quanto maior a concentração do composto, mais citotóxico ele se torna. É possível que a ineficiência da GLO1 das células tratadas com concentrações maiores de CBAs seja limitante no processo de detoxificação dos α-oxaldeídos, e que estas substâncias estejam, em razão deste evento, aumentadas, justificando o efeito citotóxico dos CBAs à MCF-7.

Uma vez obtido o dado de que os CBAs interferem sobre a atividade da GLO1, tornou-se importante avaliar o efeito de tais CBAs sobre a expressão da mesma enzima. Neste sentido, as células MCF-7 foram novamente tratadas por 24 horas com os valores de IC50 dos CBAs, previamente estabelecidas, e o ensaio de *Westtern Blotting*, com o uso do anticorpo antiGLO1, foi realizado, conforme pode ser observado na figura 24.

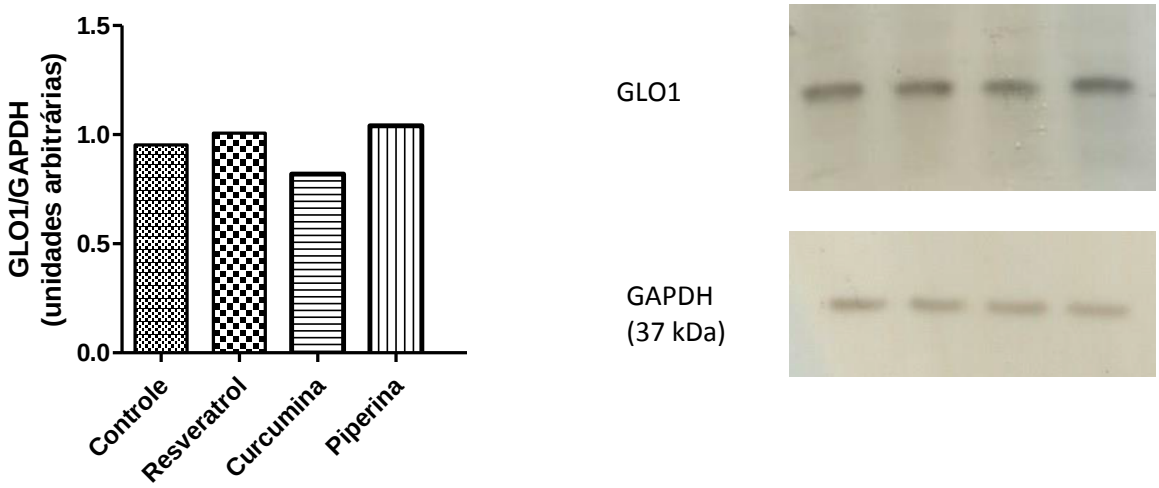


Figura 24. Expressão da GLO1 em células MCF-7 tratadas com resveratrol ou curcumina ou piperina por 24 horas. As células foram pré-incubadas com os valores de IC50 dos compostos bioativos pré-estabelecidos ou veículo (DMSO 0,5%) (1- controle/veículo; 2- resveratrol; 3- curcumina; 4- piperina) por 24 horas. Após o tratamento, as células foram lisadas, os extratos obtidos e foi realizado o Western Blotting com o anticorpo anti-GLO1. A quantificação das bandas foi determinada por análise densitométrica, utilizando o programa Image J versão 1.43p.

Analisando a figura 24, é possível observar que não houve efeito sobre a expressão da GLO1 nas células MCF-7 tratadas com o resveratrol e com a piperina em relação ao grupo controle, mas é possível observar uma pequena queda sobre a expressão da GLO1 no grupo tratado com a curcumina. Desta forma, sugere-se que o resveratrol e a piperina influenciam a atividade da GLO1 de forma pós traducional, uma vez que não alteram sua expressão.

Variações na concentração de lactato podem ocorrer como consequência de distúrbios em qualquer estágio da via glicolítica. Desta forma, em continuidade aos experimentos, para confirmar o dado exposto anteriormente e entendendo que o metabólito final da via da glioxalase é o D-Lactato, tornou-se importante avaliar a liberação desta substância após o tratamento da MCF-7 com os valores de IC50 dos CBAs, como observado nas figuras 25, 26 e 27.

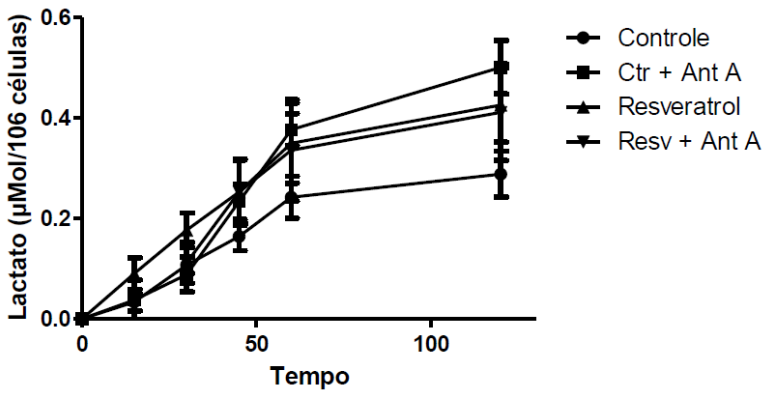


Figura 25. Dosagem de D-Lactato produzido por células MCF-7 tratadas com resveratrol por 24 horas. As células foram incubadas com resveratrol, na concentração de 131 µM ou veículo (DMSO 0,5%) por 24 horas. Após o tratamento, alíquotas do meio de cultura foram coletadas nos tempos 0, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos e incubadas em um tampão de hidrazina, pH 9,2, com NAD^+ e lactato desidrogenase (LDH) para mensuração da liberação de lactato. Como controle positivo do experimento, no 30º minuto foi adicionado 2 µg/ mL de antimicina-A ao meio. Os resultados são expressos como µMol de lactato/ 10^6 células comparados com o controle e os valores representam médias ± SE (n = 3).

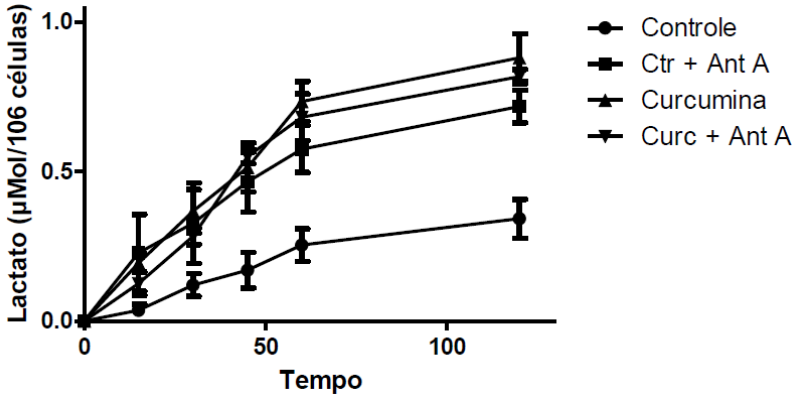


Figura 26. Dosagem de D-Lactato produzido por células MCF-7 tratadas com curcumina por 24 horas. As células foram incubadas com curcumina, na concentração de 24,5 µM ou veículo (DMSO 0,5%) por 24 horas. Após o tratamento, alíquotas do meio de cultura foram coletadas nos tempos 0, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos e incubadas em um tampão de hidrazina, pH 9,2, com NAD^+ e lactato desidrogenase (LDH) para mensuração da liberação de lactato. Como controle positivo do experimento, no 30º minuto foi adicionado 2 µg/ mL de antimicina-A ao meio. Os resultados são expressos como µMol de lactato/ 10^6 células comparados com o controle e os valores representam médias ± SE (n = 3).

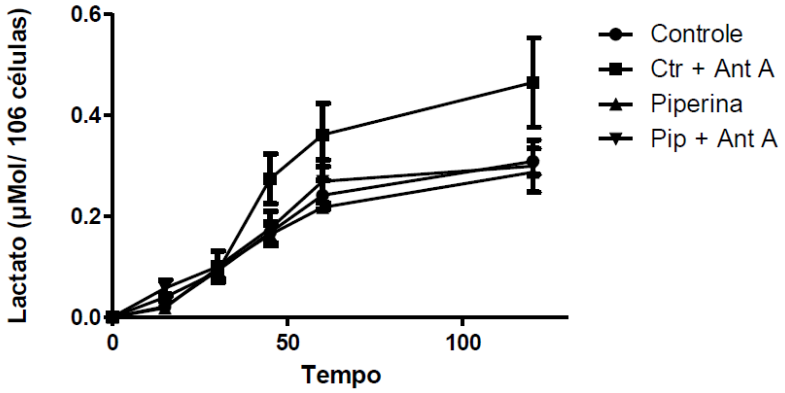


Figura 27. Dosagem de D-Lactato produzido por células MCF-7 tratadas com piperina por 24 horas. As células foram incubadas com piperina, na concentração de 94,5 µM ou veículo (DMSO 0,5%) por 24 horas. Após o tratamento, alíquotas do meio de cultura foram coletadas nos tempos 0, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos e incubadas em um tampão de hidrazina, pH 9,2, com NAD^+ e lactato desidrogenase (LDH) para mensuração da liberação de lactato. Como controle positivo do experimento, no 30º minuto foi adicionado 2 µg/ mL de antimicina-A ao meio. Os resultados são expressos como µMol de lactato/ 10^6 células comparados com o controle e os valores representam médias ± SE (n = 3).

Conforme é possível observar nas figuras 25, 26 e 27, quando as células do grupo controle foram expostas a antimicina-A no 30º minuto da curva realizada, observou-se uma diferença na liberação de lactato no meio de cultura das células controle em relação às células controle antimicina-A, que demonstraram uma produção aumentada de lactato. A antimicina-A inibe o complexo III da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial gerando um aumento na produção de lactato pelas células por inibir a fosforilação oxidativa e, por esta razão, este resultado é esperado, sendo utilizado como um controle positivo e indicando o bom funcionamento das mitocôndrias. Porém, nossos resultados mostram que o mesmo estímulo não ocorre nas células tratadas com o resveratrol ou curcumina ou piperina nos grupos expostos à antimicina-A, não havendo diferença sobre a liberação de lactato em relação ao grupo tratado apenas com um dos CBAs, indicando, desta forma, um possível dano a mitocôndria da célula, gerado pela presença dos CBAs. Este resultado corrobora com nosso dado, previamente demonstrado, sobre a alteração no potencial de membrana mitocondrial da MCF-7, pós-exposição aos CBAs, por 24 horas.

Como a geração de α-oxaldeídos está associada à alta utilização de glicose pelas células, tornou-se importante avaliar se o meio de incubação teria influência sobre a citotoxicidade induzida pelos CBAs. Sendo assim, diferente do meio de cultura utilizado nos demais experimentos, incubamos as células em um meio contendo alta concentração de glicose, e sem insulina (figura 28).

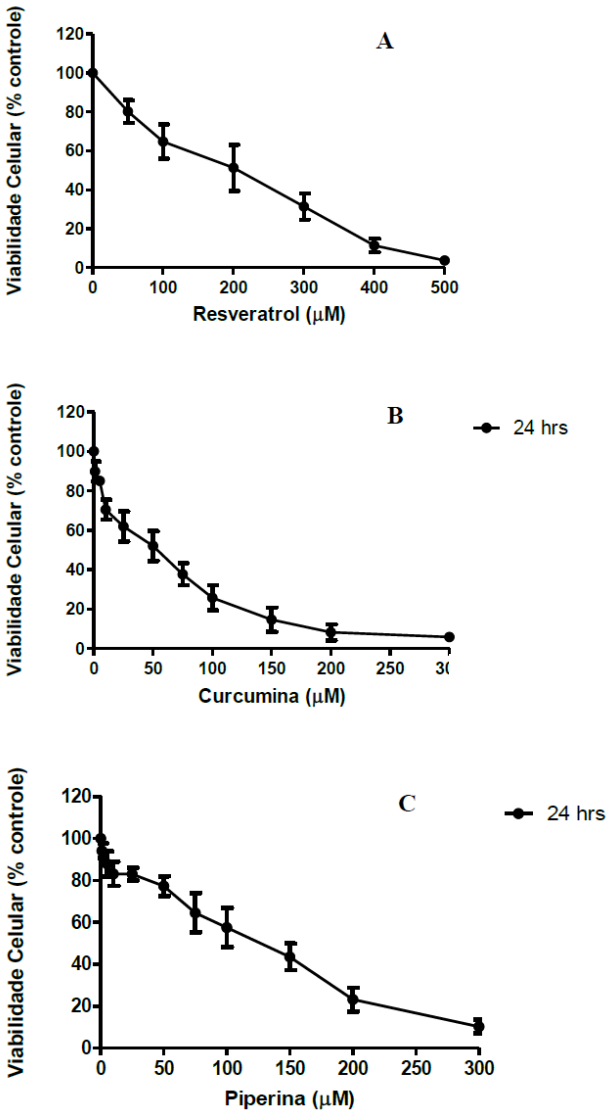
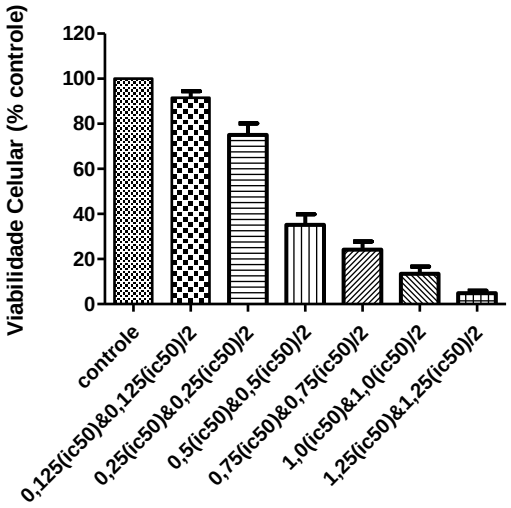


Figura 28. Efeito dos α-oxaldeídos e dos compostos bioativos na viabilidade das células MCF-7 em 24 horas em meio com alta glicose e sem insulina. Células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio D-MEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de CO_2. Os CBAs: Resveratrol (A), Curcumina (B), Piperina (C) foram adicionados em diferentes concentrações como indicado nas abcissas. As células foram incubadas com as substâncias por 24 h. Os resultados são expressos como % comparados com o controle. Os valores representam médias ± SE (n = 3).

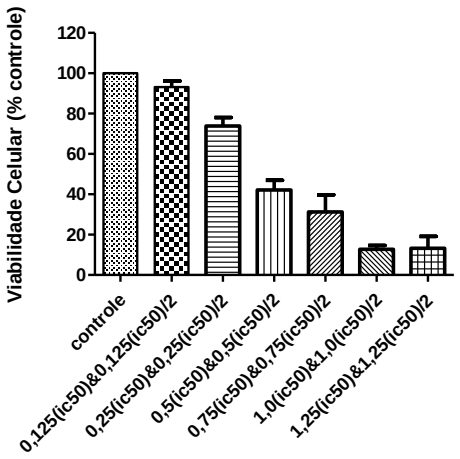
As curvas expressas na figura 28 geraram os seguintes valores de IC50: para o resveratrol de 158 µM, para curcumina de 35,97 µM e para piperina de 106,9 µM. Estes valores não ficaram distantes dos valores de IC50 estabelecidos no tratamento com os CBAs em um meio com baixa glicose por 24 horas, iguais a: Resveratrol 131 µM, curcumina 24,5

µM e piperina 94,5 µM. Entende-se, desta forma, que o meio utilizado não influenciou a citotoxicidade induzida pelos CBAs à MCF-7.

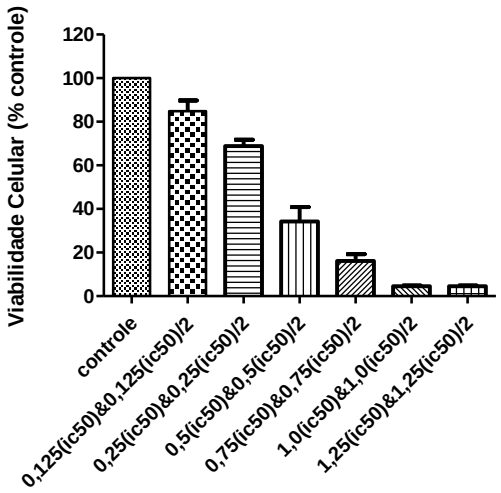
A fim de entendermos se a associação dos CBAs pode ou não apresentar efeito sinérgico ou antagônico sobre a linhagem MCF-7, tornou-se importante combinar os compostos bioativos em pares, segundo Yang & Liu (2009). Para isso, de acordo com o IC50 de cada composto previamente determinado, aquele que obteve, isoladamente, um efeito melhor sobre a viabilidade celular da MCF-7, definido por uma concentração menor de IC50, foi testado nas seguintes concentrações: 0,125 x IC50; 0,25 x IC50; 0,5 x IC50; 0,75 x IC50; 1,0 x IC50; e 1,25 x IC50. O composto associado foi combinado ao anterior nas seguintes concentrações: 0,125 x (IC50)/2; 0,25 x (IC50)/2; 0,5 x (IC50)/2; 0,75 x (IC50)/2; 1,0 x (IC50)/2; e 1,25 x (IC50)/2 (figura 29, 30 e 31).



F**igura 29. Efeito da combinação entre a curcumina e o resveratrol na viabilidade das células MCF-7 em 24 horas.** Células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio D-MEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de CO_2. As substâncias curcumina e resveratrol foram associadas, onde a concentração do CBA mais citotóxico à MCF-7 (curcumina) é associada a outro CBA menos citotóxico na mesma concentração, porém dividido por 2 (resveratrol). Os resultados são expressos como % comparados com o controle. Os valores representam médias ± SE (n = 3).



F**igura 30. Efeito da combinação entre a curcumina e a piperina na viabilidade das células MCF-7 em 24 horas.** Células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio D-MEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de CO_2. As substâncias curcumina e piperina foram associadas, onde a concentração do CBA mais citotóxico à MCF-7 (curcumina) é associada a outro CBA menos citotóxico na mesma concentração, porém dividido por 2 (piperina). Os resultados são expressos como % comparados com o controle. Os valores representam médias ± SE (n = 3).



F**igura 31. Efeito da combinação entre a piperina e o resveratrol na viabilidade das células MCF-7 em 24 horas.** Células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio D-MEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de CO_2. As substâncias piperina e resveratrol foram associadas, onde a concentração do CBA mais citotóxico à MCF-7 (piperina) é associada a outro CBA menos citotóxico na mesma fração, porém dividido por 2 (resveratrol). Os resultados são expressos como % comparados com o controle. Os valores representam médias ± SE (n = 3).

Conforme observado nas figuras 29, 30 e 31, os três resultados de associação entre os CBAs apresentaram o mesmo perfil. Diante deste dado, utilizamos o programa Calcsym para realizar os cálculos sobre sinergismo e antagonismo conforme pode ser observado na tabela 2. Esta tabela indica que todas as combinações entre os CBAs, realizadas neste trabalho, demonstraram um efeito de sinergismo sobre a ação citotóxica dos CBAs às células de câncer de mama MCF-7.

CBAs	Efeito da combinação	Ação
Curcumina + Resveratrol	0,5862	Sinergismo
Curcumina + Piperina	0,6666	Sinergismo
Piperina + Resveratrol	0,4759	Sinergismo

Tabela 2. Efeito da combinação entre os CBAs na viabilidade das células MCF-7 em 24 horas. Células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio D-MEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de CO_2. As substâncias curcumina e resveratrol, curcumina e piperina e piperina e resveratrol foram associadas, onde a concentração do CBA mais citotóxico à MCF-7 é associada a outro CBA menos citotóxico na mesma concentração porém dividido por 2. O cálculo de sinergismo foi realizado por meio do programa Calsym.

7 DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos têm sugerido que o elevado consumo de frutas e hortaliças demonstra um efeito protetor às doenças cardiovasculares e ao desenvolvimento de câncer e, neste sentido, diversas hipóteses podem ser elucidadas para explicar o efeito benéfico do consumo contínuo destas substâncias (ARTS & HOLLMAN, 2005; WANG e cols., 2014).

Os níveis de MGO e GO, em adultos saudáveis, são controlados através do equilíbrio entre sua geração endógena, consumo exógeno e sua degradação por meio de um sistema enzimático conhecido como sistema da glioxalase. O consumo elevado dos α-oxaldeídos é resultado do abuso de escolhas alimentares indevidas, como o consumo de alimentos fritos e assados, ricos em açúcares, assim como, pela alta exposição à poluição e ao tabaco, hábitos típicos da sociedade moderna (WANG & CHANG, 2010).

Este estudo investigou a ação dos compostos bioativos, resveratrol, piperina e curcumina, sobre as células de câncer de mama MCF-7. Investigou-se ainda, o efeito dos α-oxaldeídos, GO, MGO e da 3-DG, precursores dos AGEs, sobre a mesma linhagem celular. Foi possível identificar que todos os compostos, com exceção da 3-DG, se apresentaram citotóxicos à MCF-7, sendo o efeito de citotoxicidade tempo e dose dependente. Entre os CBAs, a curcumina demonstrou-se com o maior efeito citotóxico uma vez que apresentou o menor valor de IC50 entre todos os CBAs em 24 horas e 48 horas de tratamento. A piperina, em 48 horas de tratamento, demonstrou o maior aumento sobre sua toxicidade em relação aos demais CBAs. Este resultado não foi interferido pela quantidade de glicose no meio de cultura. Mukherjee e cols. (2013) descreveram o efeito citotóxico da curcumina em tecido de câncer de mama humano, demonstrando, pela primeira vez, que a curcumina inibe a migração de células de câncer de mama induzindo defeitos no processo de transição por meio do epitélio-mesenquimal. Greenshields e cols. (2015) também descreveram atividades citotóxicas da piperina às células de câncer de mama MDA-MB-231, por meio de inibição do crescimento celular, indução a apoptose e impedimento de migração.

Os α-oxaldeídos, GO e MGO, apresentaram efeitos muito menos tóxicos em comparação aos CBAs às células MCF-7. O efeito tóxico destes compostos em células saudáveis tem sido bastante referenciado na literatura (BROWNLEE, 2005; GAENS e cols., 2013; CHIAVARINA e cols., 2014). Concentrações fisiológicas de MGO são relatadas entre 1 a 2 µM em humanos. Em células humanas saudáveis, como células de Schwann, células da retina, do glomérulo renal e células do tecido nervoso, valores entre 200 µM a 1000 µM

demonstram efeitos deletérios (THORNALLEY e cols., 1999; JAN e cols., 2005; RABBANI & THORNALLEY, 2008; SCHMIDT e cols. 2010).

O aumento da quantidade de α-oxaldeídos nas células é dado tanto pela geração destes durante processos metabólicos, quanto por meio da via de glicólise. Estes compostos se ativam após sua ligação ao receptor para os AGEs (RAGE ou AGER, do inglês *Advanced Glycation End-products Receptor*), uma proteína de aproximadamente 45 kDa. O RAGE é um membro da superfamília das imunoglobulinas de superfície celular, expresso em vários tipos celulares como, por exemplo, endotélio vascular, músculo liso, monócitos, macrófagos, células do epitélio glomerular e células neuronais, porém em baixos níveis em homeostase (TAKINO e cols., 2010). Em situações de aumento de atividade celular ou estresse, como no desenvolvimento do DM, na inflamação, na doença de Alzheimer e no câncer, a expressão do RAGE é aumentada. Nos últimos anos, estudos mostraram que o RAGE pode possuir uma função central na regulação de tumores (SPARVERO e cols., 2009; PAN e cols., 2014; QIAN e cols., 2014). Neste estudo, em 24 horas de tratamento, encontramos um valor de IC50 de aproximadamente 2,8 mM para o GO e o MGO. Estes valores aumentados para o efeito de citotoxicidade podem ser justificados pela otimização do sistema de detoxificação desenvolvidos pelas células de câncer durante seu processo mutagênico.

Conforme descrito anteriormente, por otimizar a via glicolítica, uma das principais vias de formação de α-oxaldeídos, as células de câncer poderiam sofrer os efeitos da toxicidade induzida pelo MGO e GO, porém, está demonstrado na literatura, que o aumento da expressão da via da glioxalase, em diversos modelos de tumores, torna mais eficiente o processo de detoxificação destes compostos, gerando proteção à célula cancerosa (GATENBY & GALLIES, 2004), o que pode justificar a concentração dos α-oxaldeídos tão aumentada para efeito citotóxico nesta linhagem celular neste trabalho. No tratamento às células MCF-7 com o α-oxaldeído 3-DG, não observamos efeito sobre a viabilidade das células. A 3-DG não é um metabólito utilizado com frequência nestes modelos experimentais, pois não apresenta potencial citotóxico tão expressivo quanto o GO e o MGO. Sato e cols. (2013) demonstraram que 3-DG não apresenta efeito citotóxico às células de Schwann. Por outro lado, Loarca e cols. (2013) observaram que o tratamento com MGO e 3-DG reduziram a migração, invasão e adesão de células de câncer de fígado, linhagens Huh-7 e HepG2, mas sem efeito na linhagem Hep3B, mostrando que estes compostos apresentam efeitos diferentes em linhagens celulares diferentes.

As EROs são moléculas formadas após uma redução incompleta de O_2 dentre as quais se destacam o O_2- e o radical hidroxila (HO•). O H_2O_2 é outra molécula reativa de oxigênio de importância biológica, formada pela redução parcial do O_2. As EROs são produzidas constantemente na cadeia mitocondrial de transporte de elétrons e são conhecidos subprodutos da respiração celular e produto final de várias reações metabólicas (BRIEGER e cols., 2012).

Por ser quimicamente mais reativas que o O_2, as EROs causam danos oxidativos a proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Porém, ao longo das últimas décadas, há uma crescente valorização sobre o papel das EROs como mediadores de sinalização intracelular regulando numerosas respostas fisiológicas e biológicas (SENA & CHANDEL, 2012).

Desde a descoberta de que alterações na membrana interna mitocondrial representam um passo crítico na regulação da via apoptótica intrínseca, as mitocôndrias têm sido vistas como organelas importantes no que se refere ao controle de proliferação e morte celular, bem como vários aspectos da sobrevivência da célula. Está descrito que o aumento nos níveis de EROs pode desencadear a diminuição do $\Delta\Psi m$ (GALLUZI e cols., 2013) e este fato levar a célula à morte. Há evidências de que a taxa de produção de EROs está aumentada em células de câncer quando comparadas às células normais. Além disso, a regulação e sinalização redox desempenham atribuições tanto na origem do tumor quanto na resposta à sua terapêutica. Desta forma, as EROs apresentam funções distintas na tumorigênese, podendo se associar as vias de bloqueio deste processo. Por outro lado, células normais possuem uma taxa menor de geração de EROs e, desta forma, sofrem menos com esse desequilíbrio do que as células cancerosas (CAIRNS, 2011).

Neste sentido, o aumento da atividade e da expressão de enzimas antioxidantes, bem como, a utilização de substâncias com estas atividades se inserem nas perspectivas de controle da tumorigênese. Antioxidantes minimizam as taxas de oxidação mesmo em baixas quantidades, podendo atuar tanto na prevenção da geração de EROs, quanto no controle e reparo de sua ação deletéria (RAHAL e cols. 2014).

Os resultados deste trabalho mostram que tanto o resveratrol, quanto a piperina e a curcumina, reduziram o $\Delta\Psi m$. O acúmulo excessivo de MGO pode induzir modificações em proteínas mitocondriais, como a Bcl-2 e o citocromo c, levando a disfunção da mitocôndria e aumento nos níveis de EROs. A partir do entendimento de que o aumento nos níveis de EROs ou da glicação de proteínas mitocondriais poderá desencadear a diminuição do potencial de membrana mitocondrial, já elucidado na literatura (BOTA & DAVIES, 2001; RABBANI & THORNALLEY, 2011; GALLUZI e cols., 2013), é provável que o efeito citotóxico do

resveratrol e da curcumina, e em menor escala, da piperina, tenha gerado perda de ΔΨm e esse fato esteja relacionado ao aumento da produção de EROs intracelular em função do aumento dos α-oxaldeídos causado pela diminuição da atividade da GLO1. É importante considerar que a concentração intracelular de α-oxaldeídos não foi avaliada e este fato é tido como uma limitação deste trabalho. Nass e cols. (2014) mostraram que células MCF-7 resistentes ao tamoxifeno, um potente quimioterápico, tratadas com GO e MGO, se tornaram menos resistentes ao estresse oxidativo, o que pode ser explicado pelo aumento da produção de EROs e redução na expressão do sistema de defesa antioxidante nos grupos tratados com os α-oxaldeídos. A ação pró-oxidante do MGO pode ser prevenida com inibidores de AGEs, aumentando a razão Bax/Bcl-2 e a ativação das caspases 3 e 9 (FIGAROLA e cols, 2014).

Compostos polifenólicos como o resveratrol e a curcumina possuem um papel sobre o estado redox intracelular. Estes compostos atuam como importantes antioxidantes celulares e seus efeitos são dependentes da concentração utilizada e do tipo de célula em que atuam. Porém, é proposto que o resveratrol também possa atuar como um agente pró-oxidante, sendo este um dos mecanismos de ação antineoplásicos envolvidos na morte de células tumorais. Do mesmo modo, já foi demonstrado que o resveratrol diminui o ΔΨm e aumenta a geração de EROs, promovendo apoptose (AZMI e cols., 2006).

Os antioxidantes, tais como a NAC e a GSH, têm sido utilizados como ferramentas para investigar o papel de EROs em numerosos processos biológicos e patológicos. A NAC promove a síntese da GSH aumentando a disponibilidade de cisteína, elevando assim os níveis de gama-glutamil-cisteína-sintetase, enzima limitante sobre a rota de formação de GSH (KUMAR e cols., 2014). Com o intuito de definir um dos mecanismos de toxicidade dos CBAs à MCF-7, e entendendo que algum comprometimento celular associado à presença de EROs no nosso modelo de estudo poderia estar ocorrendo, resolvemos avaliar o efeito dos antioxidantes GSH e do seu precursor, a NAC, neste modelo de pesquisa. Concentrações crescentes de NAC e GSH não interferiram sobre a viabilidade celular da MCF-7, porém, quando a cultura celular foi pré-tratada com o antioxidante e pós-tratada com os CBAs isolados, nos seus valores de IC50 previamente estabelecidos, ocorreu a diminuição do efeito tóxico dos CBAs sobre a viabilidade celular, demonstrando um efeito protetor dos antioxidantes à ação citotóxica dos CBAs. Sugere-se, desta forma, que a ação citotóxica dos CBAs à MCF-7 está associada a atividades pró-oxidantes ou a otimização do sistema da glioxalase na detoxificação dos α-oxaldeídos, MGO e GO, uma vez que este sistema é dependente de GSH.

Células cancerosas apresentam um aumento na demanda por glicose em razão da elevada taxa de mitose que sustenta a proliferação celular. Desta forma, células tumorais apresentam uma elevada taxa glicolítica e aumento da formação de MGO e GO (GATENBY & GALLIES, 2004). Entendendo que a atividade da GLO1 tem uma correlação positiva com as concentrações celulares de GSH (THORNALLEY e cols., 2011), elucidamos sobre a possibilidade da proteção gerada pelo pré-tratamento com os antioxidantes, mostrada anteriormente, estar associada à otimização das vias de detoxificação dos α-oxaldeídos. Para isso, a atividade da enzima GLO1 foi avaliada no tratamento por 24 horas com cada CBA isolado e comparada às células que sofreram o pré-tratamento com o GSH e pós-tratamento com os CBAs isolados. Com os dados gerados, foi possível relacionar o efeito citotóxico dos CBAs sobre a MCF-7 à queda da atividade da GLO1, enzima responsável em converter o citotóxico MGO ao não tóxico D-lactato, utilizando a GSH como cofator da reação enzimática. Observa-se que os CBAs reduzem a atividade da GLO1, e este efeito é dose dependente, isto é, quanto maior a concentração do CBA menor a atividade da enzima. Quando as células foram pré-tratadas com o GSH, antioxidante e co-fator da GLO1, percebemos o mesmo efeito protetor do GSH sobre a ação dos CBAs à atividade da enzima observado sobre a citotoxicidade do CBAs à MCF-7, corroborando os dados achados neste trabalho.

O rápido crescimento dos tumores, bem como sua elevada taxa anabólica, acompanha a regulação de caminhos de geração de ATP que consigam suportar o crescimento e a proliferação celular. O aumento da utilização da via glicolítica, nestas células, se associa ao aumento da geração de lactato, metabólito que cria um ambiente mais ácido e, desta forma, facilita a invasão do tumor. Assim, a alta utilização de glicose por células cancerosas tem por consequencia adaptações seletivas a estes tipos celulares, importantes para sua sobrevivência (AMOEDO e cols., 2011). Entendendo que a liberação de lactato poderia estar influenciada no nosso modelo de pesquisa, tanto em razão do metabolismo glicolítico, quanto pela atividade das enzimas do sistema da glioxalase, que produzem como metabólito final o lactato, tornou-se importante avaliar a liberação de D-lactato pela MCF-7 após o tratamento com o resveratrol ou a curcumina ou a piperina. Assim sendo, após 24 horas de tratamento, observamos que as quantidades de lactato não diferiram entre o grupo controle e o grupo tratado com o CBA, mesmo a atividade da GLO1 estando diminuída no grupo tratado com as substâncias. Entende-se que o sistema da glioxalase não é o principal sistema de geração de lactato pela célula, pois a maior parte do lactato produzido pelas células é por meio da via

glicolítica (KROEMER & POUYSSEGUR, 2008), e, provavelmente, por esta razão, estes valores de concentração final de D-lactato não foram influenciados. Porém, quando comparamos a liberação de D-lactato em uma curva de 0 a 120 minutos, utilizando a antimicina-A, um inibidor do complexo III da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e inibidor da fosforilação oxidativa, percebemos que, nos grupos tratados com os CBAs, em relação aos grupos tratados com os CBAs em adição à antimicina-A, não ocorreu um aumento na liberação de lactato, diferente do grupo controle quando comparado ao grupo controle antimicina-A, que demonstrou um aumento significativo na liberação de D-lactato. Estes dados sugerem que a mitocôndria das células MCF-7 estaria sofrendo prejuízos em razão da ação citotóxica dos CBAs, uma vez que a antimicina-A não ocasionou um aumento da liberação de lactato por essas células. Tal dado corrobora aos resultados de variação do $\Delta\Psi m$, indicando que a ação dos CBAs gera dano a mitocôndria das células MCF-7.

Em razão dos níveis aumentados de MGO, a mutagênese do câncer se associa com o aumento da expressão da GLO1, a fim de detoxificar o excesso de α-oxaldeídos e impedir a morte celular (WARNER e cols., 2010). Neste estudo, mostramos que os CBAs, em 24 horas de tratamento, diminuem a atividade da GLO1, influenciando sua expressão apenas no grupo tratado com curcumina, porém a expressão da enzima não é alterada nos grupos tratados com resveratrol e piperina. Desta forma, sugerimos que o resveratrol e a piperina influenciam a atividade da GLO1 de forma pós traducional, uma vez que não altera sua expressão. O aumento dos α-oxaldeídos intracelulares, gerados pelo prejuízo da atividade da GLO1, poderá comprometer o ciclo celular e ser responsabilizado pela morte da MCF-7 neste modelo de pesquisa. Zhang e cols. (2014) mostraram que a indução ao aumento da expressão e atividade da GLO1 mostrou-se eficaz na citotoxicidade as células de carcinoma hepatocelular HuH-7. Santel e cols. (2008) mostraram que a curcumina, na concentração de 50 µM, pode atuar como um inibidor competitivo da GLO1 em células de câncer de mama JIMT-1, pois diminui sua expressão, podendo assim estar relacionada à ação quimioterápica, uma vez que prejudica o mecanismo de detoxificação do MGO e GO. Apesar de não termos avaliado a concentração intracelular dos α-oxaldeídos, a redução da atividade da GLO-1 a partir da incubação com os CBAs, sugere um possível aumento intracelular de MGO e GO na MCF-7, justificando o dano citotóxico gerado neste trabalho.

Sabemos que os alimentos não são ingeridos isoladamente e a literatura nos mostra que alguns compostos geram um efeito sinérgico quando utilizados em associação a outros (YANG & LIU, 2009; HUQ e cols., 2014). O uso da combinação, em concentrações

reduzidas, de agentes preventivos e terapêuticos se associa a redução de possíveis efeitos tóxicos desta exposição e melhora na eficácia de tratamentos. Teoricamente, a combinação de substâncias, sejam CBAs ou drogas farmacêuticas, pode permitir a administração de concentrações menores de cada composto, minimizando assim possíveis efeitos colaterais aos pacientes (LIU, 2003). Nota-se que na quimioterapia existe uma melhor efetividade quando múltiplas drogas são utilizadas por meio de mecanismos complementares, otimizando os resultados associados aos alvos moleculares em razão da resposta sinérgica do tratamento (SYLVESTER e cols., 2010). Desta forma, finalizamos nosso trabalho demonstrando que a associação do resveratrol e da curcumina, resveratrol e pipeirna e da piperina e curcumina, geraram um efeito sinérgico de citotoxicidade à MCF-7. Khairunnisa e cols. (2015) mostraram que a combinação de gingerol e tocotrienol aumentaram a citotoxicidade e apoptose, sem ativação da caspase-3 em células HT-29 e SW837 de câncer coloretal. Wicha e cols. (2010) demonstraram que a piperina associada à curcumina melhora os efeitos benéficos da segunda em até 2000% em células de mama. No estudo de Hsieh e cols. (2008) também foi observado sinergismo nas atividades pró-apoptóticas do resveratrol e da epigalocatequina-3-galato, quando associados, em células de câncer de mama MCF-7.

8 CONCLUSÕES

Este trabalho possibilitou o acúmulo das seguintes conclusões:

- O resveratrol, a curcumina e a piperina, isolados e associados, bem como o metilglioxal e o glioxal, isolados, reduziram a viabilidade das células MCF-7 em 24 horas de tratamento (tanto quando isolados, quanto quando associados) e em 48 horas de tratamento (quando isolados), indicando um potencial efeito quimioterápico destes compostos à MCF-7;
- A 3-deoxiglicosona não gerou efeito tóxico sobre as células MCF-7, não estando associada a efeitos quimioterápicos a esta linhagem celular neste modelo de estudo;
- A curcumina foi o composto bioativo que apresentou o maior efeito citotóxico à MCF-7 em relação aos outros CBAs testados;
- A associação de resveratrol com a curcumina, do resveratrol com a piperina e da piperina com a curcumina, resultaram na potencialização sinérgica dos efeitos citotóxicos dos compostos às células MCF-7, sugerindo a utilização dos CBAs de maneira associada uma vez que assim seu efeito quimioterápico é potencializado;
- O pré-tratamento com os antioxidantes NAC e GSH protegeu as células MCF-7 ao efeito citotóxico dos CBAs, sugerindo que o mecanismo de citotoxicidade induzida pelos CBAs à MCF-7 está associado à geração de EROs;
- O tratamento com resveratrol ou com a curcumina ou com a piperina diminuiu o potencial de membrana mitocondrial das células MCF-7, sugerindo assim a geração de EROs motivada pela exposição aos CBAs;
- A atividade da GLO1 diminuiu no tratamento da MCF-7 com resveratrol, piperina e curcumina e esta queda foi dose dependente, sugere-se assim que estes CBAs prejudicam a atividade da enzima que metaboliza os α-oxaldeídos, podendo este ser um dos mecanismos de citotoxicidade dos CBAs à MCF-7. É possível ainda que a geração de EROs induzida pela exposição aos CBAs interfira na função do GSH como cofator do sistema da glioxalase, prejudicando o mecanismo de detoxificação dos α-oxaldeídos. Ressalta-se que a avaliação da concentração dos α-oxaldeídos, bem como do GSH nas células tratadas com os CBAs, torna-se importante para consolidação desta hipótese e este fato é uma limitação deste trabalho;
- A curcumina gerou o melhor efeito sobre a queda da atividade da GLO1 em relação aos demais CBAs;
- Em um experimento preliminar, a expressão da GLO1 foi alterada no tratamento por 24 horas com a curcumina;

- O conjunto de resultados obtidos nesta tese propicia o desenvolvimento de um esquema o qual demonstra os efeitos do resveratrol, da curcumina, da piperina e dos α-oxaldeídos nas células MCF-7 (figura 32).

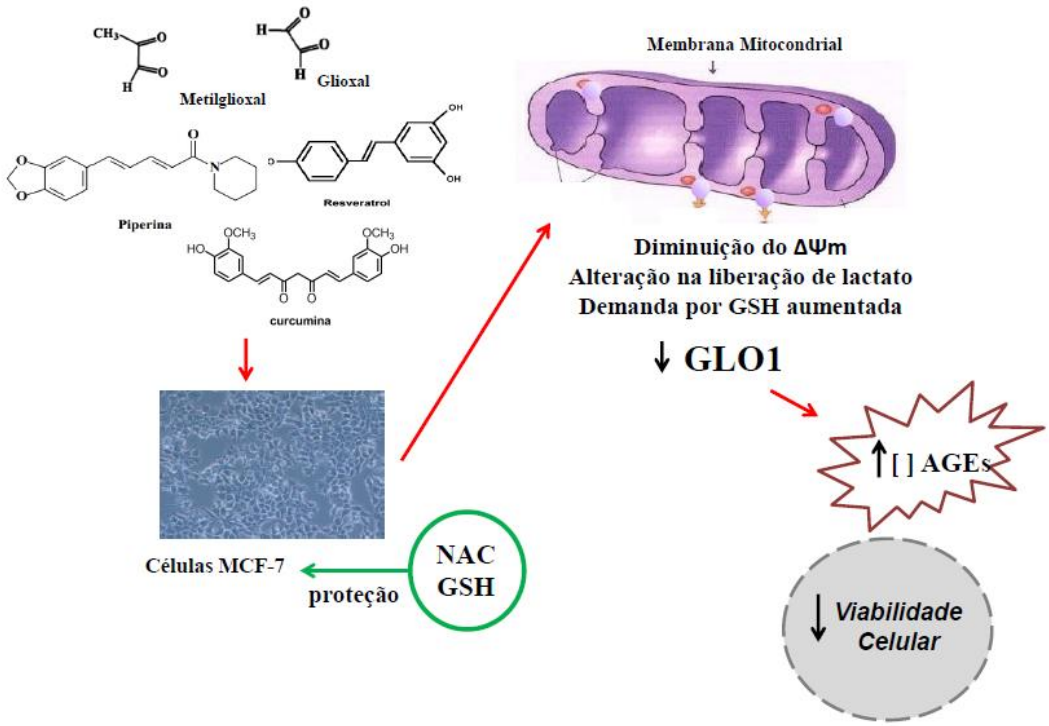


Figura 32. Influência dos CBAs e dos α-oxaldeídos sobre a MCF-7: Dano mitocondrial e prejuízo sobre a atividade da GLO1.

9 REFERÊNCIAS

ABE, R. e cols. Regulation of human melanoma growth and metastasis by AGE-RAGE receptor interactions. **J Invest Dermatol**, 122:461-467, 2004.

ALLAM, I.; BELANGER, M.; MAGISTRETTI, P.J. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. **Front Neurosci**, 9(9):23, 2015.

ALLAVENA, P.; GERMANO, G.; MARCHESI, F. e cols. Chemokines in cancer related inflammation. **Exp Cell Res,** 317:664-673, 2011.

AMOEDO, N.D.; EL-BACHA, T.; RUMJANEK, F.D. e cols. Energy Metabolism in H460 Lung Cancer Cells: Effects of Histone Deacetylase Inhibitors. **Plos One,** 6(7):1-15, 2011.

AMOEDO, N.D.; EL-BACHA, T.; RUMJANEK, F.D. e cols. Cell cycle and energy metabolismo in tumor cells: strategies for drug therapy.Recent Patents on Anti-cancer Drug Discovery, 6(1):15-25, 2011.

AMRI, A.; CHAUMEIL, J. C.; SFAR, S.; CHARRUEAU, C. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? **Journal of Controlled Release**, 158:182–193, 2012.

ANTOGNELLI, C.; MEZZASOMA, L.; FETTUCCIARI, K.; TALESA, V.N. A novel mechanism of methylglyoxal cytotoxicity in prostate cancer cells. **Int J Biochem Cell Biol**, 45:836–844, 2013.

AQUILANO, K.; BALDELLI, S,; CIRIOLO, M.R. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. Front Pharmacol, 26(5):196, 2014.

ARTS, I.C.W.; HOLLMAN, P.C.H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **Am J ClinNutr**, 81:317S–25S, 2005.

ASENSI, M.; MEDINA, I.; ORTEGA, A.; CARRETERO, J.; BAÑO, M. C.; OBRADOR, E.; ESTRELA, J. M. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. **Free Radical Biology and Medicine,** 33:387-98, 2002.

AZMI, A. S.; BHAT, S. H.; HANIF, S. e cols. Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties. **FEBS Letters**, 580:533-538, 2006.

BAIR, W.B.; CABELLO, C.M.; UCHIDA, K. e cols. GLO1 overexpression in human malignant melanoma. **Melanoma Research**, 20:85–96, 2010.

BAJAD, S.; COUMAR, M.; KHAJURIA, R. e cols. Characterization of a new rat urinary metabolite of piperine by LC/NMR/MS studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 19:413-421, 2003.

BARILE, F. A. In vitro cytotoxicology: mechanisms and methods (1ª Ed.). Florida: CRC Press, p. 222, 1994.

BARTOSZ, I.; BARTOSZ, G. Effect of Antioxidants Supplementation on Aging and Longevity. **BioMed Research International**, 17, 2014.

BÉLIVEAU, R.; GINGRAS, D. O flagelo do câncer. Em: Os alimentos contra o câncer. Editora Vozes, Rio de Janeiro, v.1, p. 17-29, 2007.

BERNARDES, A. C. F e cols. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural**, 30(1):171-175, 2000.

BOTA, D.A.; DAVIES, K.J.A. Protein degradation in mitochondria: implications for oxidative stress, aging and disease: a novel etiological classification of mitochondrial proteolytic disorders. **Mitochondrion**, 1:33-49, 2001.

BRIEGER, K.; SCHIAVONE, S.; MILLER, F.J. e cols. Reactive oxygen species: from health to disease. **Swiss Med Wkly**, 17:142, 2012.

BROWNLEE, M. Biochemestry and molecular cell biology of diabetic complication. **Nature,** 414:813-20, 2001.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetes. Unifying mechanism. **Diabetes,** 54:1615-1625, 2005.

BUTT. M. S.; PASHA, I.; SULTAN, M. T.; RANDHAWA, M. A.; SAEED, F.; AHMED, W. Black pepper and health claims: a comprehensive treatise. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 53:875-886, 2013.

CAI, W.; GAO, Q.D.; ZHU, L. e cols. Oxidative stress inducing carbonyl compounds from common foods: novel mediators of cellular dysfunction. **Mol Med**, 8(7):337-46, 2002.

CAIRNS, R.A.; HARRIS, I.S.; MAK, T.W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews Cancer**, 11:85–95, 2011.

CARDOSO, J.Q. Efeito da piperina na indução de sensibilidade colateral e na reversão da resistência à vincristina em células de leucemia resistentes a quimioterápicos. 2015. 79 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) – Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

CHEN, X.; QIAN, Y.; WU, S. The Warburg effect: evolving interpretations of an established concept. **Free Radic Biol Med**, 79:253-63, 2015.

CHENG, W.L.; TSAI, M.M.; TSAI, C.Y. e cols. Glyoxalase-I is a novel prognosis factor associated with gastric cancer progression. PLoS One, 2012.

CHIAVARINA, B.; NOKIN, M.J.; DURIEUX, F. e cols. Triple negative tumors accumulate significantly less methylglyoxal specific adducts than other human breast cancer subtypes. **Oncotarget**, 5(14): 5472-84, 2014

CHIN, D. e cols. Curcumin may impair iron status when fed to mice for six months. **Redox biology,** 2:563–569, 2014.

CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. **Food and Chemical Toxicology**, 48:798-802, 2010.

CHOU, T.C. The median-effect principle and the combination index for quantitation of synergism and antagonism. **Synergism and Antagonism in Chemotherapy**, 86:61-102, 1991.

CIPOLLINI, G.; TOMMASI, S.; PARADISO, S. e cols. Genetic alterations in hereditary breast cancer. **Ann Oncol**, 15(1):7-13, 2004.

COSERI, S. Natural products and their analogues as efficient anticancer drugs. **Mini Rev Med Chem**; 9(5):560-71, 2009.

COURTEN, B.; COURTEN, M.; SCHALKWIJK, C.G. e cols. Dietary Advanced Glycation End Products Consumption as a Direct Modulator of Insulin Sensitivity in Overweight Humans: A Study Protocol for a Double-Blind, Randomized, Two Period Cross-Over Trial. **JMIR Publications;** 4(3): 93, 2015.

DARSHAN, S.; DORESWAMY, R. Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. **Phytother Res**, 18:343–357, 2004.

DAVIDSON, S.D.; CHERRY, J.P. CHOUDHURY, M.S. e cols.. Glyoxalase I activity in human prostate cancer: a potential marker and importance in chemotherapy. **Journal of Urology**, 161:690–1, 1999.

DAY, A. J.; DUPONT, M. S.; RIDLEY, S.; RHODES, M.; RHODES, M. J.; MORGAN, M. R.; e cols. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver betaglucosidase activity. **FEBS Letters**, 436:71–75, 1998.

DEGEN, J.; HELLWIG, M.; HENLE, T. 1,2-Dicarbonyl Compounds in Commonly Consumed Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 60(28):7071-9, 2012.

DELMAS, D.; e cols. Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. **Curr Drug Targets**, 269:243-261, 2006.

DO, M. T.; KIM, H. G.; CHOI, J. H.; KHANAL, T.; PARK, B. H.; TRAN, T. P.; JEONG, T. C.; JEONG, H. G. Antitumor efficacy of piperine in the treatment of human HER2-overexpressing breast câncer cells. **Food Chemistry**, 141:2591-2599, 2013.

DUFFY, M.J. The war on cancer: are we winning? **TumourBiol**, 34(3):1275-84, 2013.

DULAK, J. Nutraceuticals as anti-angiogenic agents: hopes and reality. **J Physiol Pharmacol**, 56(1):51-67, 2005.

DOUCETTE, C.D.; HILCHIE, A.L.; LIWSKI, R. e cols. Piperine, a dietary phytochemical, inhibits angiogenesis. **Journal of Nutritional Biochemistry,** 24:231–239, 2013.

FANG, H.Y.; CHEN, S.B.; GUO, D.J.; e cols. Proteomic identification of differentially expressed proteins in curcumin-treated MCF-7 cells. **Phytomedicine,** 18(8-9):697-703, 2011.

FERRUELO, A.; ROMERO, I.; CABRERA, P.M. e cols. Effects of resveratrol and other wine polyphenols on the proliferation, apoptosis and androgen receptor expression in LNCaP cells. **Actas Urol Esp**, 38:397-404, 2014.

FIGAROLA, J.L.; SINGHAL, J.; RAHBAR, S. e cols LR-90 prevents methylglyoxal-induced oxidative stress and apoptosis in human endothelial cells. **Apoptosis**, 19(5):776-88, 2014.

FINOT, P.A. Historical perspectiveof the Maillard Reaction in food Science. **Ann NY Acad Sci**, 1043:1-8,2005.

FOFARIA, N. M.; KIM, S. H.; SRIVASTAVA, S. K. Piperine causes G1 phase cell cycle arrest and apoptosis in melanoma cells through checkpoint kinase-1 activation. **PLoS One**, 9:e94298, 2014.

FREITAS, M. S.; COSTA, D. C. F.; CASANOVA, F. A. Principais mecanismos de oncogênese. Em: Bases moleculares em clínica médica (ALVES, P. C. C.; DA POIAN, A. T.; ABRAHÃO, A.). Editora Atheneu, São Paulo, v. 1, p. 555-571, 2010.

GAENS, K.H.J; STEHOUWER, C.D.A.; SCHALKWIJK, C.G. Advanced glycation end-products and its receptor for advanced glycation end-products in obesity. **Current Opinion in Lipidology**, 24(1):4-11, 2013.

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; HEIDEN, M.G.; KROEMER, G. Metabolic targets for cancer therapy. **Nat Rev Drug Discov,** 12(11):829-46, 2013.

GATENBY, R.A.; GILLIES, R.J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nat Ver Cancer,** 4:891–9, 2004.

GHOSH, A.; BERA, S.; RAY, S.; e cols. Methylglyoxal induces mitochondria-dependent apoptosis in sarcoma. **Biochemistry,** 76(10):1164-71, 2011.

GOMEZ, A.; GOMEZ, J.; TORRES, M.L. e cols. Cysteine dietary supplementation reverses the decrease in mitochondrial ROS production at complex I induced by methionine restriction. **J Bioenerg Biomembr**,47(3):199-208, 2015.

GOLBERG, T.; CAI, W.; PEPPA, M. e cols. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. **J Am Diet Assoc**, 104(8):1287-91, 2004.

GONÇALVES, P.; ARAÚJO, J.R.; PINHO, M.J., e cols. In vitro studies on the inhibition of colon câncer by butyrato and polyphenolic compound. **Nutr Cancer,** 63(2):282-294, 2011.

GRAVITZ, L. Chemoprevention: First line of defence. Combinations of drugs are showing some promise as therapeutic agents that stop cancer before it starts. **Nature**, 471:S5-S7, 2011.

GREAVES, M.; MALEY, C.C. Clonal evolution in cancer. **Nature**, 481(7381):306-13, 2012.

GREENSHIELDS, A.L.; DOUCETTE, C.D.; SUTTON, K.M. e cols. Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. **Cancer Letters**, 357:129‑140, 2015.

GUPTA, S. C. Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. **The AAPS Journal**, 15(1):195–218, 2013.

HANF, V.; HANF, D. Reproduction and breast cancer risk. **Breast Care**, 9(6):398-405, 2014.

HANSEN, F.; e cols. Methylglyoxal alters glucose metabolism and increases AGEs content in C6 glioma cells. **Metab Brain Dis**, 27:531-539, 2012.

HARMER, V. Breast cancer. Part 2: present and future treatment modalities. **British Journal of Nursing**, 17:1028-1035, 2008.

HOSODA, F.; ARAI, Y.; OKADA, N. e cols. Integrated genomic and functional analyses reveal glyoxalase I as a novel metabolic oncogene in human gastric cancer. **Oncogene**, 2014.

HSIEH, T.C.; WU, J.M. Suppression of cell proliferation and gene expression by combinatorial synergy of EGCG, resveratrol, and γ-tocotrienol in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. **Int J Oncol**, 33:851–859, 2008.

HUQ, F.; YU, J.Q.; BEALE, P. e cols. Combinations of platinums and selected phytochemicals as a means of overcoming resistance in ovarian cancer. **Anticancer Res,** 34(1):541-5, 2014.

HWANG, Y.P.; YUN, H.J.; KIM, H.G. e cols. Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by piperine via the inhibition of PKCα/ERK1/2-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. **Toxicol Lett**, 203:9–19, 2011.

INCA, I.N.d.C.-. *Estimativas 2014: Incidência de Câncer no Brasil*. 2014 [cited 2014 02/02/2014]; Available from: http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/.

INCA, I.N.d.C.-. *Estimativas 2015: Incidência de Câncer no Brasil*. 2015 [cited 2015 10/05/2015]; Available from: http://www.inca.gov.br/estimativa/2015/.

JAN, C.R.; CHEN, C.H.; WANG, S.C. e cols. Effect of methylglyoxal on intracellular calcium levels and viability in renal tubular cells. **Cellular Signalling**, 17:847–855, 2005.

JENKINS, S.; BETANCOURT, A. M.; WANG, J.; LAMARTINIERE, C. A. Endocrine-active chemicals in mammary cancer causation and prevention. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 129:191-200, 2012.

JI, Q.; LIU, X.; FU, X.; e cols. Resveratrol inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells via MALAT1 mediated Wnt/β-catenin signal pathway. PLoS One, 8(11), 2013.

JIN, S. e cols. Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway. **Ann Oncol**, 2009.

JIANG, H.; e cols. Combination treatment with resveratrol and sulforaphane induces apoptosis in human U251 glioma cells. **Neurochem res**, 35, 2010.

KANAI, M. Therapeutic applications of curcumin for patients with pancreatic cancer. **World Journal of Gastroenterology**, 20(28):9384-9391, 2014.

KALAPOS M.P. Methylglyoxal in living organisms. Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. **Toxicol Lett,** 110:145-175, 1999.

KANIKARLA-MARIE, P.; JAIN, S.K. L-Cysteine supplementation reduces high-glucose and ketone-induced adhesion of monocytes to endothelial cells by inhibiting ROS. **Mol Cell Biochem,** 391(1-2):251-6, 2014.

KHAIRUNNISA, M.Y.; MAKPOL, S.; JAMAL, R. e cols. γ-Tocotrienol and 6-Gingerol in Combination Synergistically Induce Cytotoxicity and Apoptosis in HT-29 and SW837 Human Colorectal Cancer Cells. **Molecules**, 20:10280-10297, 2015.

KHAJURIA, A.; THUSU, N.; ZUTSHI, U. Piperine modulates permeability characteristics of intestine by inducing alterations in membrane dynamics: influence on brush border membrane fluidity, ultrastructure and enzyme kinetics. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, 9:224–31, 2002.

KIM, J.Y.; e cols. Advanced glycation end-products (AGE)-induced proliferation of HEL cells via receptor for AGE-related signal pathways. **Cancer Res Inst**, 33:493-501, 2008.

KOPPENOL, W.H.; BOUNDS, P.L., DANG, C.V. Otto Warburg´s contributions to current concepts of cancer metabolismo. **Nat Rev Cancer**, 11:325-337, 2011.

KOSCHINSKY, T.; MITSUHASHI, T.; BUCALA, R. e cols. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): na environmental risk factor in diabetic nephrophaty. **Proc Natl Acad Sci USA,** 94(12):6474-9, 1997.

KOZLOWSKA, A.; SZOSTAK-WEGIEREK, D. Flavonoids – food sources and health benefits. **Rocz Panstw Zakl Hig**, 65(2):79-85,2014.

KREEGER, P.F.; LAUFFENBURGUER, D.A. Cancer system biology: a network modeling perspective. **Carcinogenesis**, 31(1):2-8, 2010.

KROEMER, G.; POUYSSEGUR, J. Tumor cell metabolism: Cancer's Achilles' heel. **Cancer Cell**, 13(6): 472-82, 2008.

KUHLA, A., LUDWIG, S.C., KUHLA, B., MÜNCH,G., VOLLMAR, B. Advanced glycation end-products are mitogenic signals and trigger cell cycle reentry of neurons Alzheimer´s disease brain. **Neurobiology of Aging**, 1-9, 2014.

KUMAR, S.M.; SWAMINATHAN, K.; CLEMENS, D.L.; e cols. Modulation of GSH with exogenous agents leads to changes in glyoxalase-1 enzyme activity in VL-17A cells exposed to chronic alcohol plus high glucose. **Food Funct,** 2014.

KUNDU, J.K.; SURH, Y.J. Cancer Chemopreventive And Therapeutic Potential Of Resveratrol: Mechanistic Perspectives. **Cancer Letters**, 269:243-261, 2008.

KURZ, A.; RABBANI, N.; WALTER, M. e cols. Alpha-synuclein deficiency leads to increased glyoxalase I expression and glycation stress. **Cell Mol Life Sci,** 68:721–733, 2011.

KURZROCK, R., e cols. Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. **Clin Cancer Res**, 14:4491-4499, 2008.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227(5259):680-5, 1970.

LAPOLLA, A.; REITANO, R.; SERAGLIA, R. e cols. Evaluation of advanced glycation end products and carbonyl compounds in patients with different conditions of oxidative stress. **Mol Nutr Food Res**, 49(7):685-90, 2005.

LATRUFFE, N.; DELMAS, D.; JANNIN, B.; CHERKAOUI, M. M.; PASSILY-DEGRACE, P.; BERLOT, J. P. Molecular analysis on the chemopreventive properties of resveratrol, a plant polyphenol microcomponent. **International Journal of Molecular Medicine**, 10:755-760, 2002.

LEE, D.; CHANG, G. Methylglyoxal in cells elicits a negative feedback loop entailing transglutaminase 2 and glyoxalase 1. **Redox Bio,** 2:196-205, 2014.

LI, S.; LIU, Y.; SIGMON, V.K. e cols. High-fat diet enhances visceral advanced glycation end products, nuclear O-Glc-Nac modification, p38 mitogen-activated protein kinase activation and apoptosis. **Diabetes Obes Metab**, 7(4):448-54, 2005.

LI, S.; LEI, Y.; JIA, Y.; LI, N.; WINK, M.; MA, Y. Piperine, a piperidine alkaloid from Piper nigrum re-sensitizes P-gp, MRP1 and BCRP dependent multidrug resistant cancer cells. **Phytomedicine**, 19:83-87, 2011.

LIANDONG, H.; YANJING, S.; HENG, J. e cols. Enhancement of Oral Bioavailability of Curcumin by a Novel Solid Dispersion System. **AAPS PharmSciTech**, 2014.

LIU, R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. **J Nutr**, 134:3479s–3485s, 2003.

LIU, G. e ROBINS, I. A História Natural e a Biologia do Câncer. In: R. W. Pollock (Ed.). UICC Manual de Oncologia Clínica. São Paulo: Wiley. A História Natural e a Biologia do Câncer, p.1-17, 2006.

LIU, Y.; YADEV, V. R.; AGGARWAL, B. B.; NAIR, M. G. Inhibitory effects of black pepper (Piper nigrum) extracts and compounds on human tumor cell proliferation,

cyclooxygenase enzymes, lipid peroxidation and nuclear transcription factor-kappa-B. **Natural Product Communications**, 5:1253-1257, 2010.

LOARCA, L.; SASSI-GAHA, S.; ARLETT, C.M. Two -dicarbonyls downregulate migration, invasion, and adhesion of liver cancer cells in a p53-dependent manner. **Dig Liver Dis**, 45:938–946, 2013.

LORETO S e cols. Methylglyoxal induces oxidative stress – dependent cell injury and up-regulation o interleukin-1β and nerve growth factor in cultured hippocampal neuronal cell. **Brain research,** 1006:157-167, 2004.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. e cols. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193(1):265-75, 1951.

MALHOTRA, A.; NAIR, P.; DHAWAN, D.K. Study to Evaluate Molecular Mechanics behind Synergistic Chemo-Preventive Effects of Curcumin and Resveratrol during Lung Carcinogenesis. **PLoS One**, 4:9(4), 2014.

MALORNI, L.; CACACE, G.; CUCCURULLO, M. e cols. Proteomic analysis of MCF- 7 breast cancer cell line exposed to mitogenic concentration of 17 β-estradiol. **Proteomics**, 6:5973–5982, 2006.

MANOHARAN, S.; BALAKRISHNAN, S.; MENON, V. P.; ALIAS, L. M.; REENA, A. R. Chemopreventive efficacy of curcumin and piperine during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **Singapore Medical Journal**, 50:139-146, 2009.

MARKAVERICH, B.M.; SHOULARS, K.; RODRIGUEZ, M.A. Luteolin Regulation of Estrogen and Cell Cycle Pathways Genes in MCF-7 Human Breast Cancer Cell. **Int J Biomed Sci**, 7(2):101-111, 2011.

MEGHWAL, M.; GOSWAMI, K. T. Piper nigrum and Piperine: An Update. **Phytotherapy Research**, 27:1121-1130, 2013.

MESTER, J.; REDEUILH, G. Proliferation of breast cancer cells: regulation, mediators, targets for therapy. **Anticancer Agents Med Chem**, 8:872-885, 2008.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A. Antioxidant activity of resveratrol in red wine. **Clinical Chemistry**, 41:1789, 1998.

MORCOS, M.; DU, X.; PFISTERE, F.; e cols. Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in Caenorhabditiselegans. **Aging Cell,** 7:260–269, 2008.

MORE, S.S.; VARTAK, A.P.; VINCE, R. Restoration of glyoxalase enzyme activity precludes cognitive dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. **ACS Chem. Neurosci**, 4:330–338, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65:55-63, 1983.

MUKHERJEE, S.; MAZUMDAR, M.; CHAKRABORTY, S. e cols. Curcumin inhibits breast cancer stem cell migration by amplifying the E-cadherin/β-catenin negative feedback loop. **Stem Cell Research & Therapy**, 5:116, 2014.

MURTHY, C. T.; BHATTACHARYA, S. Cryogenic grinding of black pepper. **Journal of Food Engineering**, 85:18-28, 2008.

MUSENGA, A.; MANDRIOLI, R.; FERRANTI, A.; D'ORAZIO, G.; FANALI, S.; RAGGI, M. A. Analysis of aromatic and terpenic constituents of pepper extracts by capillary electrochromatography. **Journal of Separation Science**, 30:612-619, 2007.

NASS, N.; BROMME, H.J.; HARTIG, R. e cols. Differential Response to a-Oxoaldehydes in Tamoxifen Resistant MCF-7 Breast Cancer Cells. **Plos One**, 9:1-13, 2014.

NEDIC, O.; RATTAN, S.I.; GRUNE, T.; e cols. RAGE overexpression confers a metastatic phenotype to the WM115 human primary melanoma cell line. **Biochim Biophys Acta,** 1842(7):1017-1027, 2013.

NEMET, I.; VARGA-DEFTERDAROVIC, L.; TURK, Z. Methylglyoxal in food and living organisms. **Molecular Nutritionand Food Research**, 50(12):1105-17, 2006.

OJIMA, A.; MATSUI, T.; MAEDA, S. e cols. DNA aptamer raised against advanced glycation end products inhibits melanoma growth in nude mice. **S Lab Invest**, 94(4):422-9, 2014.

OKURA, T.; IBE, M.; UMEGAKI, K. e cols. Effects of dietary ingredients on function and expression of P-glycoprotein in human intestinal epithelial cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 33:255-259, 2010.

PAN, H.; HE, L.; WANG. B. e cols. The relationship between RAGE gene four common polymorphisms and breast cancer risk in northeastern Han Chinese. **Sci Rep,** 12(4):4355, 2014.

PAN, M.H.; CHIOU, Y.S.; CHEN, L.H.; HO, C.T. Breast cancer chemoprevention by dietary natural phenolic compounds: Specific epigenetic related molecular targets. **Mol Nutr Food Res,** 59:21-35, 2015.

PATEL, B.S.; JAYAPRAKASHA, G.K.; CHIDAMBARA, M.K.N. e cols. Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. **J Agric Food Chem**, 57(18):8142-60, 2009.

PEREOU, C.M.; SORLIE, T.; EISEN, M.B. e cols. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, 406(6797):747-752, 2000.

PERVAIZ, S. e HOLME, A. L. Resveratrol: Its Biologic Targets and Functional Activity. **Antioxidants & Redox Signaling**, 11:2851-2897, 2009.

PRADEEP, C.R.; KUTTAN, G. Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced B16F-10 melanoma cells in mice. Clin Exp Metastasis, 19:703–8, 2002.

QIAN, F.; SUN, B.L.; ZHANG, W.Y. e cols. Gly82Ser polymorphism of the receptor for advanced glycation end-product (RAGE) potential high risk in patients with colorectal cancer. **Tumour Biol**, 35(4):3171-5, 2014.

RABBANI, N.; THORNALLEY, P.J. Dicarbonils linked to damage in the powerhouse: glycation of mitochondrial proteins and oxidative stress. **Biochem Soc Trans**, 36(5):1045-1050, 2008.

RAGHU, R.; LU, K.H.; SHEEN, L.Y. Recent Research Progress on Garlic (大蒜dàsuàn) as a Potential Anticarcinogenic Agent Against Major Digestive Cancers. **Tradit Complement Med,** 2(3):192–201, 2012.

RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V. e cols. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **Biomed research international**, 1-19, 2014.

RAHMANI, A. H. Curcumin: A Potential Candidate in 20 Prevention of Cancer via Modulation of Molecular Pathways. **Bio Med Research International**, [S.I], 15 p, 2014.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, M. J.; MOORE, K. P. Farmacologia (5ª Ed.). Editora Elsevier, 2004.

RENAUD, S.; DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**, 339:1523-1526, 1992.

RICHARD, T.; POUPARD, P.; NASSRA, M. e cols. Protective effect of ε-viniferin on β-amyloid peptide aggregation investigated by electrospray ionization mass spectrometry. **Bioorg Med Chem**, 19(10):3152-5, 2011.

RULLI, A.; CARLI, L.; ROMANI, R. e cols. Expression of glyoxalase I and II in normal and breast cancer tissues. **Breast Cancer Research and Treatment**, 66:67–72, 2001.

RYAN, F.P. An alternative approach to medical genetics based on modern evolutionary biology. Part 5: epigenetics and genomics. **J R Soc Med**, 102(12):531-537, 2009.

SAKAMOTO, T.; HORIGUCHI, H.; OGUMA, E. e cols. Effects of diverse dietary phytoestrogens on cell growth, cell cycle and apoptosis in estrogen-receptor-positive breast cancer cells. **J Nutr Biochem**, 21:856-864, 2010.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 3:283-294, 2010.

SANTARIUS, T.; BIGNELL, G.R.; GREENMAN, C.D. e cols. GLO1-A novel amplified gene in human cancer. **Genes Chromosomes Cancer,** 49:711–725, 2010.

SANTEL, T.; PFLUG, G.; HEMDAN, N.Y.A. e cols. Curcumin inhibits glyoxalase 1: a possible link to its anti-inflammatory and anti-tumor activity. **PLoS One,** 3, 2008.

SCHMIDT, B.; ASSIS, A.M.; BATTU, C.E. e cols. Effects of glyoxal or methylglyoxal on the metabolism of amino acids, lactate, glucose and acetate in the cerebral cortex of young and adults rats. **Brain Res**, 1315:19-24, 2010.

SENA, L.A.; CHANDEL, N.S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. **Mol Cell**, 48(2):158-67, 2012.

SERVICK, K. Breast cancer.Breast cancer: a world of differences. **Science**, 28(6178):1452-3, 2014.

SHAIKH, J.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R. Microencapsulation of black pepper oleoresin. **Food Chemistry**, 94:105-110, 2006.

SHANGARI, N.; O'BRIEN, P.J. The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress. **Biochem Pharmacol,** 68:1433-1442, 2004.

SHI, Y.; YANG, S; TROUP, S. e cols. Resveratrol induces apoptosis in breast cancer cells by E2F1-mediated up-regulation of ASPP1. **Oncol Rep**, 25:1713-1719, 2011.

SIGNORELLI, P.; GHIDONI, R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 16:449–466, 2005.

SIMSTEIN, R.; BUROW, M.; PARKER, A. e cols. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. **Exp Biol Med,** 228(9):995-1003, 2003.

SMITH C, MARKS A, LIEBERMAN M A. Mark´s Basic Medical Biochemestry a Clinical Approach. 4ª Ed: Lippincott Wlliams e Williams. 2012.

SMITH-BECKERMAN, D.M.; FUNG, K.W.; WILLIAMS, K.E. e cols. Proteome changes in ovarian epithelial cells derived from women with BRCA1 mutations and family histories of cancer. **Molecular and Cellular Proteomics**, 4:156–68, 2005.

SOLEAS, G.J.; DIAMANDIS, E.P.; GOLBERG, D.M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? **Clin Biochem**, 30(2): 91-113, 1997.

SPARVERO, L. e cols. RAGE (Receptor for Advanced Glycation end Product) RAGE ligants and their role in cancer inflammation. **J Trans Med**, 7:17, 2009.

STEBBING, J. J.; GAYA, A. The evidence-based use of induction chemotherapy in breast cancer. **Breast Cancer**, 8:23–37, 2001.

STRATON, M.R. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. **Science**, 25(6024):1553-8, 2011.

SUNILA, E.S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine. **J Ethnopharmacol**, 90:339–46, 2004.

SURESH, D.; SRINIVASAN, K. Tissue distribution & elimination of capsaicin, piperine & curcumin following oral intake in rats. **Indian Journal of Medical Research**, 131:682-91, 2010.

SURH, Y. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature**, 3:768-780, 2003.

SYLVESTER, P.W.; KADDOUMI, A.; NAZZAL, S. e cols. The value of tocotrienols in the prevention and treatment of cancer. **J Am Coll Nutr**, 29:324s–333s, 2010.

TAK, J. K.; LEE, J. H.; PARK, J. W. Resveratrol and piperine enhance radiosensitivity of tumor cells. **BMB reports Online**, 45:242-246, 2012.

TAKINO, J.I.; YAMAGISHI, S.I.; TAKEUCHI, M. Cancer malignancy is enhanced by glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products. **J Oncol**, 2010.

TANIGUCHI, H.; HORINAKA, M.; YOSHIDA, T. e cols. Targeting the glyoxalase pathway enhances TRAIL efficacy in cancer cells by downregulating the expression. of antiapoptotic molecules. **Mol Cancer Ther**, 11:2294–2300, 2012.

THORNALLEY, P.J.; LANGBORG, A.; MINHAS, H.S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. **Biochem. J,** 344:109-116, 1999.

THORNALLEY, P.J. Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. **Ann. N.Y. Acad Sci,** 1043:111-117, 2005.

THORNALLEY, P.; RABBANI, N. Glyoxalase in tumourigenesis and multidrug resistance. **Seminars in Cell & Developmental Biology,** 22:318–325, 2011.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J.Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci USA**,76(9):4350-4, 1979.

TYIHAK, E.; KIRÁLY-VÉGHELY, Z.; MÓRICZ, A.M. Multiple beneficial effects of resveratrol and their chemical-biochemical basis. **Nad Prod Commum**, 6(5):631-638, 2011.

VANDEM, B.W. Epigenetic impact os dietary polyphenols in cancer chemoprevention: lifelong remodeling of our epigenomes. **Pharmacol. Res**, 65:565-576, 2012.

VAN-HEIJST, J.W.; NIESSEN, H.W.; HOEKMAN, K. e cols. Advanced glycation end products in human cancer tissues: detection of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine and argpyrimidine. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1043:725-733, 2005.

VAN POPPE, H.; TOMBAL, B. Chemoprevention of prostate cancer with nutrients and supplements. **Cancer Manag Res**, 3:91-100, 2011.

VELLAICHAMY, L.; BALAKRISHNAN, S.; PANJAMURTHY, K.; MANOHARAN, S.; ALIAS, L. M. Chemopreventive potential of piperine in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 28:11-18, 2009.

VINCENT, T. L.; GATENBY, R. A. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. **International Journal of Oncology**, 32:729-737, 2008.

VISTOLI, G.; MADDIS, D; CIPAK, A.; ZARCOVIC, N.; CARINI, M.; ALDINI, G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): na overviewof their mechanism of formation. **Free Radical Research**, 47:3-27, 2013.

VITRAC, X.; DESMOULIERE, A.; BROUILLAUD, B.; KRISA, S.; DEFFIEUX, G.; BARTHE, N. e cols. Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. **Life Science**, 72:2219–2233, 2003.

VLASSARA, H.; URIBARRI, J. Glycoxidation and diabetic complications: modern lessons and a warning? **Rev Endocr Metab Disord**, 5(3):181-8, 2004.

VOLAK, L.P.; HANLEY, M. J.; MASSE, G.; HAZARIKA, S.; HARMATZ, J. S.; BADMAEV, V.; MAJEED, M.; GREENBLATT, D. J.; COURT, M. H. Effect of a herbal extract containing curcumin and piperine on midazolam, flurbiprofen and paracetamol (acetaminophen) pharmacokinetics in healthy volunteers. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 75:450-462, 2013.

WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M. H.; OATIS, J. E.; WALLE, U. K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, 32:1377–1382, 2004.

WALLE, T. Bioavailability of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1215:9–15, 2011.

WANG, B.; LIU, K.; MI, M. e cols. Effect of fruit juice on glucose control and insulin sensitivity in adults: a meta-analysis of 12 randomized controlled trials. **PLoS One**, 17(4):e95323, 2014.

WANG, J.; CHANG, T. Methylglyoxal Content in Drinking Coffee as a Cytotoxic Factor. **J of Food Sci**, 75(6), 2010.

WARBURG, O.; WIND, F.; NEGELEIN, E. The metabolism of tumors in the body. **J Gen Physiol,** 8:519-530, 1927.

WARNER, B. e cols. GLO1 Overexpression in Human Malignant Melanoma. **Melanoma Res,** 20(2):85–96, 2010.

WEAVER, C.M. Bioactive foods and ingredients for health. **Adv Nutr**, 5:306-311, 2014.

WICHA, M.S. e cols. Targeting breast stem cells with the cancer preventive compounds curcumin and piperine. **Breast Cancer Res Treat**, 122(3):777-85, 2010.

YAFFE, P. B.; POWER COOMBS, M. R.; DOUCETTE, C. D.; WALSH, M.; HOSKIN, D. W. Piperine, an alkaloid from black pepper, inhibits growth of human colon cancer cells via G1 arrest and apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. **Molecular Carcinogenesis**, 2014.

YAN, Y.D.; KIM, J.A.; KWAK, M.K. e cols. Enhanced oral bioavailability of curcumin via a solid lipid-based self-emulsifuing drug delivery system using a spray-drying technique. **Biol Pharm Bull**, 34:1179-86, 2011.

YANG, J.; LIU, R.H. Synergistic effect of apple extracts and quercetin 3-β-D-glucoside combination on antiproliferative activity in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. **J Agric Food Chem**, 57:8581-8586, 2009.

YANG, Y.C.; LEE, S.G.; LEE, H.K. e cols. A piperidine amide extracted from P longum L. fruit shows activity against aedes aegypti mosquito larvae. **J Agr Food Chem**, 50(13): 3765–3767, 2002.

YOSHIOKA, K., ATSUMI, Y., NAKAGAMA, H., TERAOKA, H. Development of cancer-initiating cells and immortalized cells with genomic instability. **J stem cells**, 7(2):483-489, 2015.

ZHANG, S.; LIANG, X.; ZHENG, X. e cols. Glo1 genetic amplification as a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol**, 7(5):2079-2090, 2014.

ZIEGLER, R.G.; HOOVER, R.N.; PIKE, M.C e cols. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. **J Natl Cancer Inst**, 85:1819-1827, 1993.