

EDUARDO ALIPRANDINI

EFEITO DA MELANINA E DO OXIGÊNIO SINGLETE NA MORTE CELULAR E
FLUXO DE CÁLCIO EM CÉLULAS MELAN-A E B16-F10



CURITIBA, 2010

EDUARDO ALIPRANDINI

EFEITO DA MELANINA E DO OXIGÊNIO SINGLETE NA MORTE CELULAR E
FLUXO DE CÁLCIO EM CÉLULAS MELAN-A E B16-F10

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção de grau de Mestre em Bioquímica,
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor
de Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Glaucia Regina Martinez

CURITIBA, 2010

TERMO DE APROVAÇÃO

EDUARDO ALIPRANDINI

EFETTO DA MELANINA E DO OXIGÊNIO SINGLETE NA MORTE CELULAR E
FLUXO DE CÁLCIO EM CÉLULAS MELAN-A E B16-F10

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Glaucia Regina Martínez (Orientadora)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Setor de Ciências Biológicas – UFPR

Prof.^a Dr.^a Sheila Maria B. Winnischer

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Setor de Ciências Biológicas – UFPR

Prof.^a Dr.^a Guilhermina Rodrigues Nolet

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Setor de Ciências Biológicas – UFPR

Prof.^a Dr.^a Sayuri Miyamoto

Departamento de Bioquímica - Instituto de Química – USP

Curitiba, 12 de fevereiro de 2010.

“A chave de todas as ciências é o ponto de interrogação.”

Honoré de Balzac

“Não há lugar para a sabedoria onde não há paciência.”

Santo Agostinho

“Só sei que nada sei”

Sócrates

AGRADECIMENTOS

A Deus e Santo Expedito.

Aos meus pais Paulo e Rosimar e minha irmã Paula pelo constante apoio e incentivo.

À Professora Glaucia R. Martinez pela confiança e orientação na realização deste trabalho.

Às Professoras Sheila, Guilhermina, Sílvia, Maria Eliane e Eva.

Aos colegas do Laboratório de Oxidações Biológicas pelo apoio, discussões, risadas e aventuras.

Aos Professores Paolo Di Mascio e Marisa H. G. Medeiros do Instituto de Química da Universidade de São Paulo por abrirem as portas do laboratório para que fosse realizado um teste de fundamental importância para esse trabalho, além do fornecimento do derivado de naftaleno, indispensável para o tratamento das células. Ao José Pedro F. Angeli por me ajudar na execução dos ensaios de cálcio no IQ-USP.

A CAPES, CNPq, Fundação Araucária e INCT de Processos Redox em Biomedicina - Redoxoma pelo apoio financeiro. A CAPES-REUNI pela bolsa.

SUMÁRIO

TERMO DE APROVAÇÃO.....	ii
AGRADECIMENTOS	iv
SUMÁRIO.....	v
TERMO DE APROVAÇÃO.....	iiiv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELA.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Melanoma.....	3
2.2. Morte Celular	5
2.2.1. Apoptose	5
2.2.2. Morte Independente de Caspases	9
2.2.3. Necrose.....	12
2.3. Melanina e Cálcio.....	13
2.4. Oxigênio Singlete	16
3. JUSTIFICATIVA	18
4. OBJETIVOS.....	19
4.1. Objetivo Geral	19
4.2. Objetivos Específicos	19
5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	20
6. MATERIAIS E MÉTODOS	21
6.1. Materiais Utilizados	21
6.2. Síntese do Gerador de Oxigênio Singlete.....	22
6.3. Cultivo das Células.....	23
6.4. Determinação da Concentração de Proteínas	24
6.5. Estímulo da Melanogênese e Determinação da Produção de Melanina.....	24
6.6. Microscopia de Contraste de Fase.....	25
6.7. Viabilidade Celular após Tratamento com DHPNO ₂	25
6.8. Tratamento das Células para Avaliação dos Parâmetros de Morte Celular e Liberação de Cálcio.....	26

6.9. Avaliação da Morte Celular com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio	27
6.10. Liberação do Citocromo c	28
6.11. Fragmentação do DNA	29
6.12. Determinação da Razão ADP/ATP	30
6.13. Liberação do AIF da Mitocôndria.....	31
6.14. Avaliação dos Níveis de Cálcio Intracelulares.....	32
6.15. Análise Estatística	33
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
7.1. Melanogênese	34
7.2. Viabilidade Celular.....	37
7.3. Avaliação da Morte Celular.....	43
7.4. Liberação do Citocromo c	45
7.5. Fragmentação do DNA.....	48
7.6. Quantificação do ADP e ATP Intracelulares.....	50
7.7. Liberação de AIF da Mitocôndria	53
7.8. Fluxos de Cálcio	56
8. DISCUSSÃO FINAL	61
9. CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Melanoma cutâneo.....	4
FIGURA 2: Representação esquemática da via da apoptose	6
FIGURA 3: Papel da mitocôndria na morte independente de caspases.	10
FIGURA 4: Representação esquemática da síntese de melanina a partir da tirosina.....	13
FIGURA 5: Figura esquemática das estruturas encontradas na molécula de eumelanina. .	15
FIGURA 6: Estratégia experimental.	20
FIGURA 7: Estruturas do DHPN e DHPNO ₂	22
FIGURA 8: Micrografia em microscópio de fluorescência com filtro azul.....	28
FIGURA 9: Curva padrão da concentração de melanina.	35
FIGURA 10: Estímulo da melanogênese após 48 horas.	36
FIGURA 11: Micrografia das células B16-F10 e Melan-a após o tratamento de estímulo da melanogênese por 48 horas.....	37
FIGURA 12: Viabilidade celular após 2 horas.....	38
FIGURA 13: Síntese da melanina segundo esquema Raper-Mason.	39
FIGURA 14: Formação de semiquinonas a partir de intermediários da síntese de melanina....	40
FIGURA 15: Viabilidade celular após 24 horas.....	41
FIGURA 16: Contagem relativa das células coradas com laranja de acridina e brometo de etídio.	44
FIGURA 17: Cromatograma da análise de citocromo <i>c</i> de uma amostra de células	46
FIGURA 18: Determinação da quantidade de citocromo <i>c</i> liberado nas células.	47
FIGURA 19: Análise da fragmentação do DNA em gel de agarose após 2 horas de tratamento.	49
FIGURA 20: Análise da fragmentação do DNA em gel de agarose após 24 horas.....	50
FIGURA 21: Cromatograma da análise de ADP e ATP por HPLC.....	51
FIGURA 22: Relação ADP/ATP das células tratadas com endoperóxido.....	52
FIGURA 23: Liberação de AIF para o citoplasma.....	54
FIGURA 24: Estrutura do fluo-4.....	56
FIGURA 25: Fluorescência relativa ao aumento de cálcio citoplasmático sob tratamento com DHPNO ₂	57
FIGURA 26: Fluorescência relativa ao aumento de cálcio citoplasmático sob tratamento com DHPN.	57
FIGURA 27: Fluorescência emitida pelas células B16-F10 não estimuladas no decorrer do tempo.	58

LISTA DE TABELA

TABELA 1: Características da apoptose e da morte independente de caspase.....	11
TABELA 2: Diferença da viabilidade entre 2 e 24 horas de tratamento.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio Molecular Singlete
ADP	Adenosina Difosfato
AIF	<i>Apoptosis-Inducing Factor</i> – Fator Indutor da Apoptose
AO	<i>Acridine Orange</i> – Laranja de Acridina
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor-1</i>
ATP	Adenosina trifosfato
B16-F1	Células de Melanoma Murino precursoras das B16-F10
B16-F10	Células de Melanoma Murino
B16-F10 Y	Células de Melanoma Murino com melanogênese estimulada
CAD	<i>Caspase Activated DNase</i> – DNase Ativada por Caspase
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
DHPN	<i>N,N'</i> -di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida
DHPNO ₂	Endoperóxido do DHPN
DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
EB	<i>Ethidium Bromide</i> – Brometo de Etídio
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
EGTA	Ácido Etilenoglicol Tetracético
EndoG	Endonuclease G
FasL	Ligante Fas
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
HepG2	Células de Hepatoma Humano
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
ICAD	<i>Inhibitor of CAD</i> – Inibidor da CAD
Melan-a	Células de Melanócito Murino
MGMT	<i>O</i> ⁶ -metilguanina-DNA-metiltransferase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
PMA	Acetato de Forbol Miristato
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsufonil
PSA	Persulfato de Amônio
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RBL	Células de Leucemia Basofílica Murina
ROS	<i>Reactive Species of Oxygen</i> – Espécies Reativas de Oxigênio
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
TFA	Ácido Trifluoracético
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> tetrametiletlenodiamina
TNFR1	Receptor 1 do TNF
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
TRAIL-R	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligant Receptor</i> – Receptor do Ligante Indutor de Apoptose relacionado ao TNF
UV	Ultra Violeta
UVA	Ultra Violeta A
α -MSH	Hormônio Estimulante de Melanócitos- α
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
ϵ	Coefficiente de Extinção Molar
λ	Comprimento de onda

RESUMO

O melanoma é um tipo de câncer bastante relevante já que as opções de tratamento eficazes são limitadas. A presença da melanina protege os indivíduos de pele escura contra os efeitos da radiação solar, a principal causa de formação do melanoma pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Porém, a melanina também pode ter um papel duplo, que é a de gerar espécies reativas durante sua síntese que podem prejudicar a célula. Portanto, o objetivo deste trabalho foi a avaliação das características de morte celular causadas por uma ROS, o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), nas células de melanoma murino B16-F10 com e sem estímulo para produção de melanina e nas células de melanócito murino Melan-a. O estímulo para a síntese de melanina foi obtido incubando-se as células por 48 horas com meio RPMI 1640 enriquecido com 400 $\mu\text{mol/L}$ de L-tirosina e 10 mmol/L de cloreto de amônio. A concentração de melanina aumentou em mais de nove vezes nas células B16-F10 e as células Melan-a tiveram aumento de menos de duas vezes. Foi utilizado o endoperóxido DHPNO₂ 10 mmol/L por 2 horas para a geração de $^1\text{O}_2$. Essa condição causou queda na viabilidade avaliada pelo método do MTT para 78,0% nas células B16-F10, 70,2% nas B16-F10 estimuladas (B16-F10 Y) e 79,3% nas Melan-a. O ensaio foi feito após 24 horas do início do tratamento com DHPNO₂ e a viabilidade caiu para 49,7% nas B16-F10, 53,3% nas B16-F10 Y e 72,5% nas Melan-a. A avaliação da morte celular utilizando laranja de acridina e brometo de etídio mostrou que após o tratamento por 2 horas, somente as células B16-F10 tiveram aumento significativo na quantidade de células em apoptose, e as B16-F10 Y tiveram leve queda na quantidade de células viáveis, com tendência ao aumento de células em apoptose. As células Melan-a não tiveram diferença entre os tratamentos. A liberação do citocromo *c* foi determinada por HPLC e mostrou-se que após 2 horas, as células B16-F10 tratadas com $^1\text{O}_2$ tiveram mais citocromo *c* liberado para o citoplasma comparado com o controle. Nos demais grupos, não houve alteração com o tratamento. Porém, as células controle com mais melanina tiveram maior liberação de citocromo *c* comparado com o controle das células não estimuladas, mostrando que as células estavam sofrendo algum dano inerente da síntese de melanina. A análise da fragmentação do DNA após 2 e 24 horas mostrou que não houve aparecimento de quebras características de apoptose pelo tratamento com $^1\text{O}_2$ em nenhum dos grupos testados. As células B16-F10 Y controle apresentaram DNA fragmentado inespecificamente, representado como um arraste no gel de agarose, que não foi alterado pelo tratamento. A razão entre ADP e ATP foi quantificada para avaliar o estado energético da célula, que pode refletir algumas características de morte. Nenhuma das células teve diferença estatística após o tratamento de 2 horas com $^1\text{O}_2$, mas foi observado que as razões ADP/ATP das células controle B16-F10 com e sem estímulo apresentaram valores acima do valor considerado para células viáveis/proliferativas. Os resultados da célula Melan-a foram bem próximos dos valores ditos normais. O fluxo de cálcio também foi avaliado e o $^1\text{O}_2$ foi capaz de liberar cálcio das reservas intracelulares para o citoplasma nas células B16-F10, sendo que nas células estimuladas, o aumento do cálcio citoplasmático foi menor, indicando a possível recaptção do cálcio pela melanina. As células Melan-a não sofreram grandes alterações na quantidade de cálcio liberado para o citoplasma. Não houve diferença na liberação de AIF em nenhuma das células. Em conjunto, os resultados mostram que a síntese da melanina estimulada pela suplementação do meio foi deletéria às células, pois causou fragmentação no DNA, liberação de citocromo *c* e aumentou a razão ADP/ATP para valores considerados de célula em apoptose. Por outro lado, a presença da melanina parece ter protegido as células da ação do $^1\text{O}_2$, pois alguns resultados indicam uma tendência de melhora dos parâmetros avaliados.

ABSTRACT

Melanoma is a relevant type of cancer since the options for efficient treatment are limited. The presence of melanin protects the dark-skinned people against the effects of solar radiation, the main cause for melanoma development by the generation of reactive species of oxygen (ROS). However, melanin may also have a role on the generation of reactive species during its synthesis, which may harm the cell. So, the objective of this work was the evaluation of the characteristics of cell death caused by a ROS, the singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) on murine melanoma cells B16-F10 with or without stimulation for synthesis of melanin and on murine melanocytes cells Melan-a. The stimulus for the synthesis of melanin was obtained treating the cells for 48 hours with medium RPMI 1640 supplemented with 400 $\mu\text{mol/L}$ of L-Tyrosine and 10 mmol/L of ammonium chloride. The concentration of melanin increased more than nine times in the B16-F10 cells and the Melan-a cells increase was almost twice the amount of the control. It was used the endoperoxide DHPNO₂ 10 mmol/L for 2 hours for the generation of $^1\text{O}_2$. This condition caused the decrease in the viability determined by the method of MTT to 78% in B16-F10, 70,2% in B16-F10 that were stimulated (B16-F10 Y) and 79,3% in Melan-a cells. The test was performed after 24 hours from the beginning of the treatment with DHPNO₂ and the viability decreased to 49,7% in B16-F10, 53,3% in B16-F10 Y and 72,5 % in Melan-a. The evaluation of cell death using acridine orange and ethidium bromide showed that after the two-hour treatment, only the B16-F10 cells had a significant increase of the number of apoptotic cells, and the B16-F10 Y cells had a slight decrease of the amount of viable cells, with the tendency of the increase of apoptotic cells. Melan-a cells did not show difference among the treatments. The release of cytochrome *c* was determined by HPLC and it showed that after two hours, B16-F10 cells had more cytochrome *c* released to the cytoplasm compared to the control. There was not any alteration for other groups of cells with the treatment. However, the control cells that had more melanin showed increased cytochrome *c* release compared to the control of the not-stimulated cells, demonstrating that the previous cells were suffering some kind of damage from the melanin synthesis. The analysis of DNA fragmentation revealed the absence of typical apoptosis fragmentation in any of the groups. B16-F10 Y control cells displayed unspecific DNA damage observed as a smear in the agarose gel, which was not altered by $^1\text{O}_2$ treatment. The same result was observed after the treatment for 2 and 24 hours. The ratio between ADP and ATP was quantified to evaluate the energetic state of the cell, which may reflect some characteristics of cell death. None of the cells showed results statistically significant after the two-hour treatment $^1\text{O}_2$, but it was shown that the values of ADP/ATP ratio of the B16-F10 control cells with and without stimulation were above of the threshold accepted for viable/proliferative cells. The results of Melan-a cells were very close to the values considered normal. The calcium flux was also evaluated and it was evidenced that $^1\text{O}_2$ was capable of releasing calcium from the intracellular stores to the cytoplasm in B16-F10 cells, and the release of calcium was lower in B16-F10 Y, indicating the possibility of the binding of the metal to melanin. The Melan-a cells did not showed much increase in the quantities of calcium released to the cytoplasm. There was no difference in the release of AIF in any group. Over all, the results support that the synthesis of melanin that was stimulated by the supplementation of the medium was deleterious to the cells, since it caused DNA fragmentation, release of cytochrome *c* and increase of the ratio ADP/ATP to values of cells in apoptosis. On the other hand, the presence of melanin seemed to protect the cells against the action of $^1\text{O}_2$, because some results indicate a tendency of improvement in the parameters evaluated.

1. INTRODUÇÃO

A morte celular é um evento bastante estudado, quer seja para a compreensão do efeito natural ou para o entendimento do efeito de uma droga sobre a célula. Nesse sentido, várias substâncias têm sido testadas quanto aos efeitos na morte de células tumorais, visto que o câncer é uma doença grave que atinge cada vez mais pessoas.

O melanoma é um dos tipos de câncer mais agressivos, com frequente ocorrência de metástase. O tratamento para esse tipo de câncer ainda não é satisfatório e depende de quimioterapia ou cirurgias para retirada do tumor (FOUNDATION SKIN CANCER, 2008).

Em relação ao tratamento, muitas doenças dermatológicas, como linfoma de célula-T cutâneo, carcinoma de célula escamosa, psoríase e infecções fúngicas são tratadas com a chamada terapia fotodinâmica. O mecanismo de ação da terapia fotodinâmica envolve a geração de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) pela utilização de um fotossensibilizador e luz.

O $^1\text{O}_2$ é uma espécie reativa de oxigênio que apresenta bons resultados na morte das células transformadas. Essa técnica poderia ser utilizada para o tratamento do melanoma com algumas vantagens (ser de fácil aplicação e não ser invasiva) se não fosse a grande quantidade de melanina presente nessas células que absorve a maior parte da luz necessária para formação do $^1\text{O}_2$ (FERNÁNDEZ-GUARINO *et al.*, 2007).

As células de melanoma produzem uma grande quantidade do pigmento melanina. A função natural da melanina é proteger o DNA contra os raios ultravioletas. Porém, há estudos que mostraram que durante a melanogênese, ocorre a produção de espécies reativas que podem ser liberadas para o citoplasma (GIDANIAN *et al.*, 2008). A melanina também tem a propriedade de se ligar ao cálcio intracelular, e acredita-se que o melanossomo (local da síntese da melanina) esteja ativamente relacionado com a regulação de cálcio. Além disso, níveis elevados de cálcio intracelular estão relacionados com a apoptose (alta concentração de cálcio colabora na liberação do citocromo *c*) (MATTSON e CHAN, 2003).

Já foi provado que o $^1\text{O}_2$ induz morte celular em células HepG2 através da liberação do citocromo *c* (característica importante da apoptose), mas os eventos seguintes, que são os esperados, como a ativação das caspases, não ocorrem, mostrando que essa espécie reativa causa uma apoptose atípica nessa célula (OTSU *et al.*, 2005).

Pouco se sabe sobre os mecanismos de ativação da morte celular pelo $^1\text{O}_2$ em células de melanoma. Portanto, seria importante entender o mecanismo pelo qual o $^1\text{O}_2$ causa morte nas células de melanoma para a compreensão dos efeitos dessa espécie reativa nas células produtoras de melanina.

Este trabalho teve como foco a avaliação da morte celular e fluxos de cálcio em células de melanoma com e sem estímulo da melanogênese e de melanócitos após tratamento com $^1\text{O}_2$.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.MELANOMA

O desenvolvimento de tumores cutâneos, como o carcinoma celular escamoso, o carcinoma basocelular e o melanoma está associado à radiação ultravioleta do sol (PERLIS e HERLYN, 2004). O melanoma é o tipo de câncer de pele menos frequente dos tumores de pele (representa 10% deles), mas sua popularidade ocorre em função da sua alta letalidade (80% dos casos de câncer de pele), pois é um câncer agressivo e apresenta alta possibilidade de metástases (IVES *et al.*, 2007; FOUNDATION SKIN CANCER, 2009). Acomete regiões pouco expostas ao sol, o que indica que a intensidade da radiação pode ser mais importante que a frequência no aparecimento do melanoma, sendo que a última está mais envolvida com carcinoma de celular escamoso e basocelular (PERLIS e HERLYN, 2004).

Pode se desenvolver em indivíduos mais jovens, sendo uma das doenças malignas mais frequentes em pessoas entre 25-40 anos (SMALLEY e EISEN, 2003). É um tumor que se origina nos melanócitos, quando estes se tornam malignos.

Os melanócitos produzem a melanina, pigmento que determina a cor da pele, o qual é atribuído um papel protetor contra os efeitos nocivos da radiação UV, já que este pigmento absorve esta radiação (KORYTOWSKI *et al.*, 1987; SETLOW *et al.*, 1993; MOAN; DAHLBACK e SETLOW, 1999; PERLIS e HERLYN, 2004). Por outro lado, alguns estudos sugerem que a radiação absorvida pela melanina nos melanócitos possa favorecer a formação do processo carcinogênico pela transferência da energia absorvida pela melanina para outras moléculas, podendo gerar espécies reativas e indução de danos ao DNA (SETLOW *et al.*, 1993; MOAN; DAHLBACK e SETLOW, 1999).

O diagnóstico clínico do melanoma é muitas vezes realizado por características das lesões conhecidas como ABCDE, sendo que cada letra corresponde a uma característica: A de Assimetria, B de Bordas irregulares, C de variação da Cor, D de Diâmetro > 6 mm e E de Evolução, ou mudança, o que representa uma mudança significativa no tamanho, forma, tonalidades de cor ou sintomas (como aparecimento de coceira) (figura 1). A avaliação histológica é de extrema importância, que pode confirmar a doença e indicar o prognóstico (MARKOVIC *et al.*, 2007).

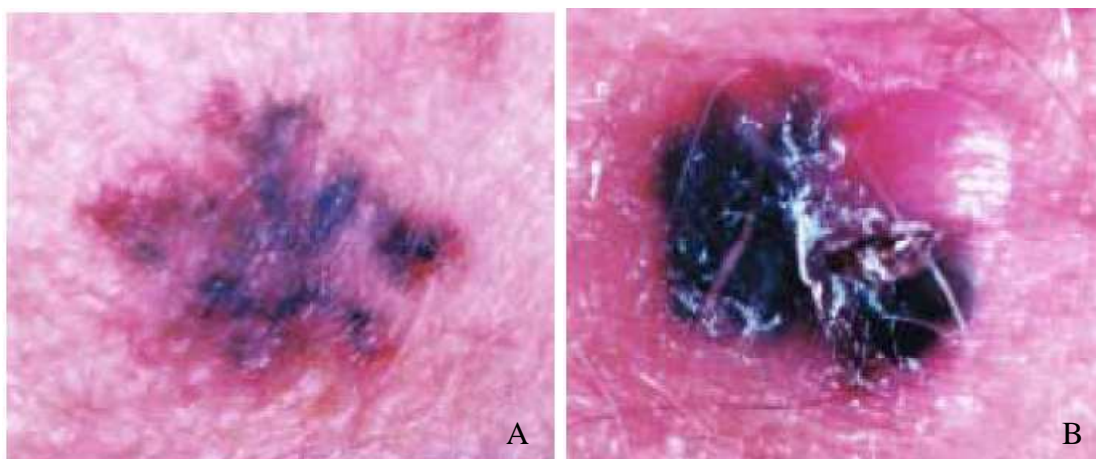


FIGURA 1: Melanoma cutâneo

FONTE: MARKOVIC *et al.* (2007)

NOTA: É possível notar nessas imagens características importantes da lesão de melanoma, como a variação na coloração (A) e a irregularidade das bordas e da superfície (B).

O melanoma está dentre os tipos de câncer mais resistentes ao tratamento, e além de cirurgia, não existe terapia aceita para melanoma metastático disponível (GIDANIAN *et al.*, 2008). A resistência ao tratamento pode ocorrer por algumas modificações no metabolismo da célula maligna, como por exemplo, redução da concentração intracelular da droga, ou defeitos da via da apoptose (SMALLEY e EISEN, 2003). Alguns autores citam que no melanoma ocorre expressão aumentada da proteína Bcl-2, que é uma proteína anti-apoptótica (HAKANSSON *et al.*, 2003). Como resultado, a célula não sofre apoptose e se prolifera indefinidamente (que é uma das características principais das células cancerígenas).

A principal droga utilizada no tratamento do melanoma metastático é a dacarbazina que é um agente alquilante que produz O^6 -metilguanina. Essa base alterada pode parear com timina durante a síntese do DNA e causar mutações (MA *et al.*, 2003). A taxa de resposta desse agente ao tratamento é de cerca de 15-25% (MOUAWAD *et al.*). Uma explicação para a baixa resposta ao tratamento com esse tipo de agente é a alta expressão de O^6 -metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT) em melanomas metastáticos de vários pacientes. Essa enzima de reparo é capaz de transferir o grupo metil da base nitrogenada para um resíduo de cisteína da sua própria estrutura, recuperando a estrutura da guanina (MA *et al.*, 2003).

Devido à grande preocupação com o melanoma, inúmeros trabalhos são realizados para tentar compreender melhor esse assunto. Um modelo de estudo bastante estabelecido é a utilização das células de melanoma murino B16-F10. Estas células foram obtidas de camundongos da linhagem C57BL/6. A partir desses camundongos,

também foi isolada a linhagem Melan-a, que são melanócitos. Já que as duas células foram isoladas da mesma linhagem de camundongos, é possível utilizá-las em estudos comparativos entre células normais e tumorais (BENNETT; COOPER e HART, 1987).

2.2. MORTE CELULAR

2.2.1. Apoptose

A apoptose é um processo altamente regulado de morte celular que tem um papel importante na manutenção da homeostase tecidual em organismos adultos (FADEEL e ORRENIUS, 2005) ou no desenvolvimento embrionário do sistema nervoso, em que o número de células nervosas é ajustado para o número de células-alvo que necessitam de inervação, sendo que as células “desnecessárias” são mortas por apoptose (ALBERTS *et al.*, 2004). Pode ainda ocorrer como um mecanismo de proteção quando células são comprometidas por doenças ou substâncias químicas nocivas. Considera-se que o estímulo para o desencadeamento da apoptose possa ser tanto fisiológico, quanto patológico (ELMORE, 2007).

Uma célula em apoptose apresenta características típicas, como diminuição do volume celular, fragmentação do DNA, condensação da cromatina, exposição de fosfatidilserina na camada externa da bicamada lipídica da membrana, colapso da estrutura do citoesqueleto e eventual formação dos corpos apoptóticos, em que a célula inteira se fragmenta em estruturas menores sem a liberação do conteúdo de lisossomos, evitando assim, danos em células vizinhas. Estes corpos apoptóticos são posteriormente fagocitados e eliminados (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). A apoptose, incluindo a fagocitose dos corpos apoptóticos, não causa reação inflamatória já que o conteúdo das células apoptóticas não é liberado nos tecidos vizinhos e as células são prontamente fagocitadas pelas células vizinhas, não produzindo citocinas inflamatórias (KUROSAKA *et al.*, 2003).

Na apoptose (figura 2) ocorre a ativação de um grupo de proteases chamadas caspases, que são sintetizadas como pró-caspases (forma inativa) e ativadas a partir de um estímulo da apoptose. As caspases ativas conseguem ativar outras pró-caspases para amplificar a resposta. Estas proteínas têm atividade proteolítica e clivam proteínas em resíduos de ácido aspártico. Todas elas apresentam três domínios em comum: subunidade grande (20 kDa), subunidade pequena (10 kDa) e a região NH₂-terminal. Já

foram descritas caspases de grande importância para a apoptose e elas são divididas em iniciadoras (caspases-2, -8, -9, -10) e efetoras (caspases-3, -6, -7).

Existem duas vias de iniciação da apoptose, a via extrínseca e a intrínseca, que podem ser interligadas. Tanto a via intrínseca quanto a extrínseca convergem para a fase efetora da apoptose, que se inicia pela clivagem da pró-caspase-3 e resulta em fenômenos característicos da apoptose, como fragmentação de DNA, degradação das proteínas do núcleo e do citoesqueleto e formação de corpos apoptóticos (ELMORE, 2007).

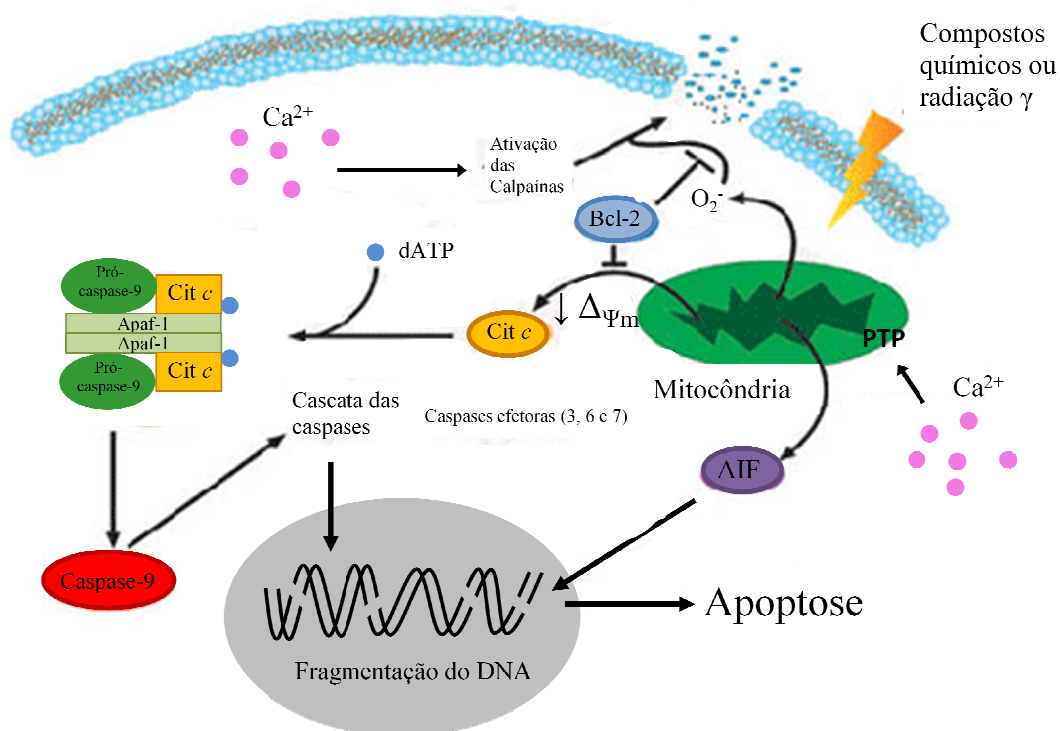


FIGURA 2: Representação esquemática da via da apoptose

FONTE: Adaptado de Sigma-Aldrich (2009)

NOTA: O aumento de cálcio citoplasmático oriundo de organelas armazenadoras pode induzir a formação do poro de transição de permeabilidade (PTP), que causa a liberação de fatores apoptogênicos da mitocôndria, como o citocromo c que inicia uma cascata proteolítica que culmina com a morte celular por apoptose. Além disso, o cálcio pode ativar proteases como as calpains que estão envolvidas na degradação de proteínas do citoesqueleto. Os processos representados na figura estão explicados no texto mais detalhadamente.

A via extrínseca é importante na manutenção do equilíbrio tecidual, especialmente no sistema imune. É iniciada por receptores na membrana chamados receptores da morte, que são ativados por citocinas como FasL, Fator de Necrose Tumoral Alfa ($\text{TNF-}\alpha$), entre outros (BUYTAERT; DEWAELE e AGOSTINIS, 2007). Para a ligação do ligante (Fas, por exemplo), os receptores se unem e formam estruturas

triméricas, sendo que no citoplasma forma-se o domínio de morte, onde se ligam proteínas citoplasmáticas, que variam de acordo com o ligante que inicia o processo. A esse complexo associa-se a pró-caspase-8 e forma-se o complexo DISC (do inglês, *Death-Inducing Signaling Complex*). Isso causa a ativação autocatalítica da pró-caspase-8 (e formação da caspase-8), com consequente desencadeamento da fase efetora da apoptose (KISCHKEL; HELLBARDT e BEHRMANN, 1995).

A via intrínseca é responsável pela apoptose causada por estímulos externos e lesões internas, como danos no DNA. Pode ocorrer pela ausência de fatores de crescimento, hormônios e citocinas que causam a perda de estímulos supressores da apoptose, ativando-a. Estímulos como radiação, toxinas, hipóxia, hipertermia, infecções virais e radicais livres também podem iniciar esse processo de morte. Essa via é dependente da mitocôndria e, de alguma forma, os estímulos citados causam aumento da permeabilidade mitocondrial, perda do potencial transmembrana e liberação de fatores pró-apoptóticos para o citosol (FADEEL e ORRENIUS, 2005).

A permeabilidade mitocondrial está relacionada com a abertura de canais de alta-condutância ou poros de permeabilidade de transição que permitem a passagem de solutos de até 1500 Da da matriz para fora da mitocôndria. Esse processo é bastante favorecido pela entrada de cálcio na mitocôndria e exposição desta aos efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio (BUYTAERT; DEWAELE e AGOSTINIS, 2007), como consequência ocorre perda do potencial transmembrana ($\Delta\Psi_m$), *swelling* mitocondrial que pode romper a membrana mitocondrial externa, e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria.

A estrutura do poro de transição ainda é incerta, mas acredita-se que seja composto por proteínas pré-existentes nas membranas externa e interna, principalmente pelo transportador de adenina nucleotídeo (ANT, do inglês *adenine nucleotide transporter*) proveniente da membrana interna, do canal aniônico voltagem dependente (VDAC, do inglês *voltage dependent anion channel*) da membrana externa e da ciclofilina D (CypD, do inglês *cyclophilin D*) da matriz, sendo que essa proteína é o local de ligação da ciclosporina A, um importante inibidor da formação do poro de permeabilidade de transição (LEMASTERS *et al.*, 2009).

A abertura dos poros na membrana externa pode ocorrer pela formação de canais protéicos pela polimerização de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, que podem apresentar quatro domínios (BH1 a BH4) (TSUJIMOTO e SHIMIZU, 2000). Porém, a família de proteínas Bcl-2 é composta também por proteínas anti-apoptóticas,

que são Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, por exemplo. Estas se localizam na membrana da mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo, voltadas para o citoplasma. As pró-apoptóticas são subdivididas em proteínas multidomínio BH123, como Bax, Bak, e proteínas “BH3-*only*”, como Bid e Bad (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

A proteína Bax apresenta-se no citoplasma como um monômero que se oligomeriza na membrana mitocondrial externa após estímulo para a apoptose. Esse efeito é contraposto ao da proteína anti-apoptótica Bcl-2, que inibe o efeito das proteínas pró-apoptóticas através da regulação de permeabilidade da membrana da mitocôndria (ANTIGNANI e YOULE, 2006). Seu efeito inibidor da apoptose ocorre pela ligação e formação de heterodímeros com Bax. Portanto, a melhor avaliação das quantidades de Bax ou Bcl-2 ocorre quando se analisa a razão entre seus níveis (Bax/Bcl-2) (UZDENSKY, 2008).

Um importante fator pró-apoptótico liberado na apoptose é o citocromo *c*, que é uma heme proteína com grupo prostético heme *c* que transporta elétrons do citocromo *c*₁ para citocromo oxidase na cadeia respiratória (SKULACHEV, 1998). A atividade pró-apoptótica do citocromo *c* acontece pela ligação com Apaf-1 (Fator apoptótico ativador de protease 1), que forma um complexo heptamérico chamado apoptossomo que ativa a caspase-9, que é capaz de ativar a caspase-3, uma das caspases efetoras (BUYTAERT; DEWAELE e AGOSTINIS, 2007). Ocorre então a ativação das pró-caspases -3, -6 e -7, que resulta na ativação e amplificação dos sinais da apoptose com as mudanças morfológicas e bioquímicas características (EARNSHAW; MARTINS e KAUFMANN, 1999).

A fragmentação do DNA, uma das características da célula em apoptose ocorre pela presença e ativação de um fator chamado DNase ativada por caspase (CAD, do inglês *Caspase-Activated DNase*). Esse fator é sintetizado com a ajuda de ICAD, o inibidor da CAD, que serve como chaperona específica para CAD, sendo que na célula CAD está complexado com ICAD. Esse complexo é desfeito após ativação da caspase-3 durante o processo de apoptose, que cliva a fração ICAD, liberando a CAD capaz de clivar DNA (esta enzima tem preferência pela quebra em regiões ricas em adenina e timina) (NAGATA, 2000). A principal característica da quebra do DNA são os fragmentos de 180 a 200 pares de bases, que aparecem de maneira característica numa eletroforese em gel de agarose, chamado padrão “escada de DNA” (*DNA ladder*) (BORTNER; OLDENBURG e CIDLOWSKI, 1995).

O encontro entre as vias extrínseca e intrínseca ocorre pela clivagem da proteína Bid (um membro da família Bcl-2) pela caspase-8 e gera a forma truncada de Bid, que se desloca até a mitocôndria e induz a liberação do citocromo *c* (LUO *et al.*, 1998). Alguns estudos mostraram que Bid pode não ser essencial para a morte celular, mas que a interligação entre as duas vias amplifique um sinal apoptótico fraco (ZHANG *et al.*, 2004).

A liberação do citocromo *c* descrita acima interrompe o fluxo de elétrons pela cadeia respiratória, com consequente queda dos níveis citosólicos de ATP (por conta da mitocôndria não estar acoplada). Além disso, a apoptose é um processo que consome ATP, já que alguns processos relacionados são mediados às custas de gasto energético (VIVES-BAUZA; YANG e MANFREDI, 2007), como a condensação da cromatina, movimentação da cromatina para a periferia do núcleo, formação de corpos apoptóticos (KASS *et al.*, 1996). Tsujimoto, (1997) considera que a apoptose é um processo que consome energia, enquanto que a necrose não, já que é um processo passivo que ocorre por danos diretos, tanto tóxicos como físicos. Portanto, a determinação da quantidade de ATP e a relação com a de ADP pode ser um indício do tipo de morte celular (BRADBURY *et al.*, 2000).

2.2.2. Morte Independente de Caspases

Alguns autores descrevem um tipo de morte celular que não depende da ativação das caspases (LORENZO e SUSIN, 2004; WILKINSON *et al.*, 2004). Esse mecanismo, dito independente de caspases leva a célula à morte principalmente pela perda da função mitocondrial graças à permeabilização da membrana mitocondrial externa, sendo que isso ocorre em etapas independentes da ativação das caspases, mesmo durante a apoptose (LORENZO e SUSIN, 2004) (figura 3).

A permeabilização da membrana mitocondrial leva à liberação de proteínas como o citocromo *c*, AIF (Fator Indutor da Apoptose), Endo G, Smac/DIABLO, HtrA2/Omi. As duas últimas estão envolvidas com a inativação de um inibidor endógeno das caspases -3, -7 e -9, o XIAP (Inibidor da Apoptose ligado ao cromossomo X, do inglês *X chromosome-linked inhibitor of apoptosis*) (SUZUKI *et al.*, 2001). As duas primeiras estão envolvidas com a cadeia de transporte de elétrons. Gradualmente, ocorre a perda do potencial de membrana que culmina com a diminuição da síntese de ATP e morte da célula (TAIT e GREEN, 2008). Nas células em apoptose, esse processo

também ocorre, porém com maior rapidez, já que ocorre clivagem da subunidade p75 do complexo I da cadeia respiratória mediada pela caspase-3, que leva à interrupção do transporte de elétrons. Por isso, a morte em que as caspases estão ativas é mais rápida comparada com a independente dessas enzimas (RICCI *et al.*, 2004).

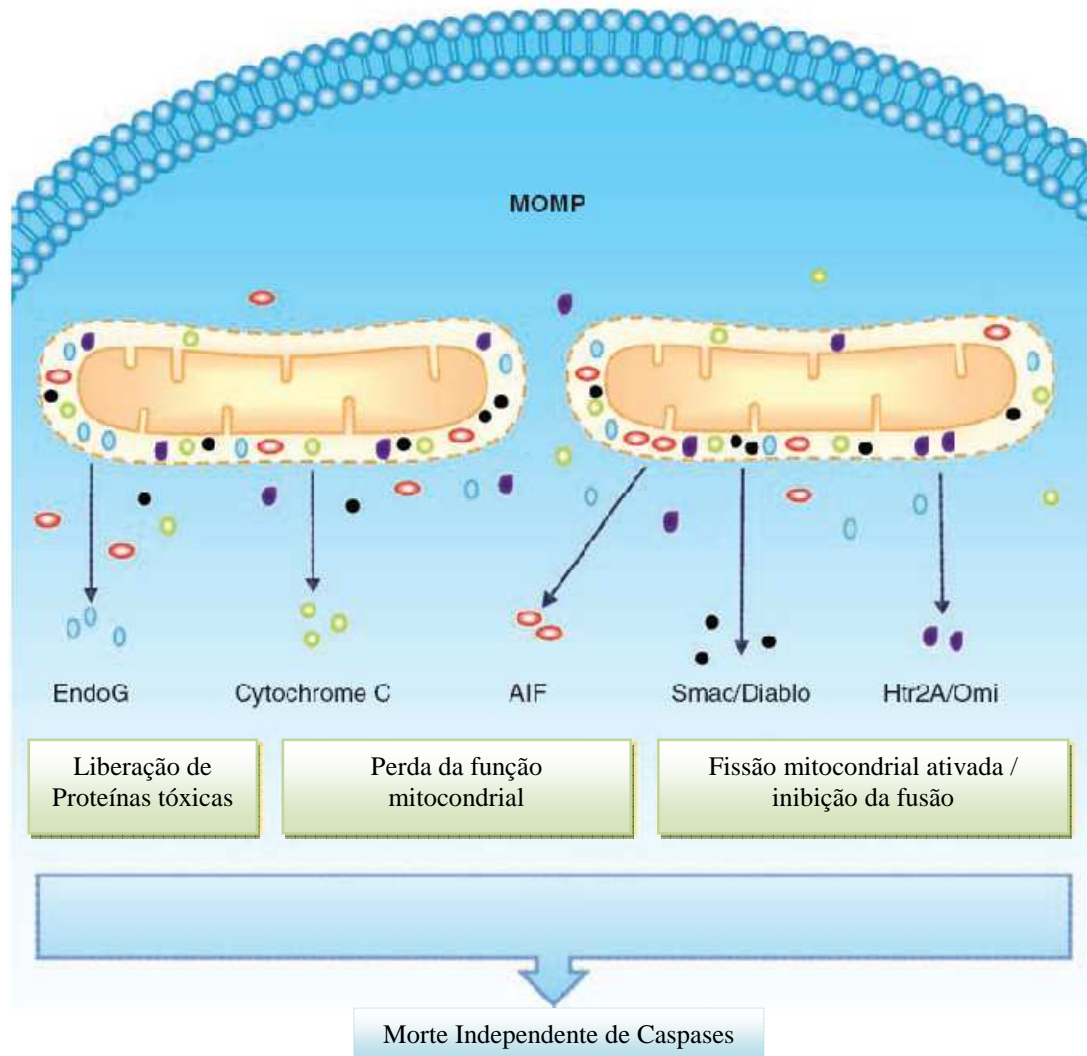


FIGURA 3: Papel da mitocôndria na morte independente de caspases.

FONTE: TAIT E GREEN (2008)

NOTA: Após permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP, do inglês *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*), ocorre a liberação de várias proteínas do espaço intermembranas que causam perda da função mitocondrial e contribuem para a morte celular. Além disso, ocorre perda da morfologia da mitocôndria pela ativação da fissão e inibição da fusão.

A tabela 1 exemplifica os contrastes e semelhanças entre a apoptose e a morte independente de caspases.

TABELA 1: Características da apoptose e da morte independente de caspase.
 FONTE: TAIT e GREEN (2008).

	Apoptose	Morte Independente de Caspase
Núcleo	Clivagem de alvos das caspases Fragmentação característica do DNA Fragmentação nuclear Condensação da cromatina	Condensação parcial da cromatina Marginalização da cromatina Sem fragmentação característica do DNA Diminuição do tamanho do núcleo, mas sem fragmentação
Mitocôndria	Permeabilização da membrana externa Clivagem de alvos das caspases Perda rápida do potencial de membrana Ativação da fissão / Inibição da fusão	Permeabilização da membrana externa Inchamento das cristas Perda gradual do potencial de membrana Ativação da fissão / Inibição da fusão
Citoplasma	Clivagem de alvos das caspases Aumento da concentração de Ca ⁺⁺ Condensação	Autofagossomos abundantes Presença de agregados de ribossomos Vacuolização
Membrana Plasmática	Clivagem de alvos das caspases Perda da assimetria da membrana de fosfolipídios Teste da Anexina V positivo Formação de <i>blebbing</i>	Membrana irregular Teste da Anexina V negativo
Célula	Queda na proliferação Descolamento da matriz Fagocitose das células em processo de morte	Queda na proliferação Geralmente mantêm-se aderidas à matriz Meio de remoção indeterminado
Cinética	Variável até a permeabilização da membrana externa Execução rápida após a permeabilização	Variável até a permeabilização da membrana externa Execução lenta após a permeabilização

A ativação da fissão e inibição da fusão mitocondriais causam a fragmentação da mitocôndria, colaborando para a perda da função e morte celular. Esses dois processos ocorrem naturalmente em mitocôndrias, o que garante a plasticidade dessa organela. A fissão corresponde à divisão da organela (sem a perda da função) e a fusão à união de duas mitocôndrias. Quando em equilíbrio, esses dois processos opostos garantem a manutenção da forma e função da organela. Já foi descrita a fragmentação mitocondrial pela permeabilização da membrana externa por Bax/Bak, que libera, além de citocromo *c*, outras proteínas envolvidas da ativação da fissão e inibição da fusão mitocondriais (ARNOULT, 2007).

Dentre as proteínas liberadas pela mitocôndria, o AIF tem sido uma das mais estudadas. É uma flavoproteína que normalmente está presente no espaço intermembranas da mitocôndria e está relacionada com o transporte de elétrons do complexo I ao III da cadeia respiratória. Com a permeabilização da membrana externa, ocorre sua saída e translocação para o núcleo, onde é capaz de condensar a cromatina e causar a fragmentação do DNA (fragmentos de cerca de 50.000 pares de bases). A interação com o DNA para originar essas características é explicada pela presença de aminoácidos com carga positiva na superfície da proteína, colaborando com a interação

com o DNA (MODJTAHEDI *et al.*, 2006). Considera-se que a liberação do AIF favoreça a liberação da pró-caspase-9 da mitocôndria e aja como um ponto de ligação com a morte dependente de caspases (LORENZO e SUSIN, 2004).

Alguns autores mostraram que a liberação do AIF, bem como de EndoG (endonuclease mitocondrial envolvida em fragmentação do DNA nuclear) somente ocorre após a ativação das caspases. A ação de fatores pró-apoptóticos da família Bcl-2 liberariam somente alguns fatores apoptogênicos, como citocromo *c*, Smac/DIABLO entre outras, porém não seriam capazes de permitir a saída de AIF, que somente seria liberado após a ativação de caspases pelos primeiros fatores liberados (ARNOULT *et al.*, 2003).

2.2.3. Necrose

A morte celular por necrose foi por muito tempo considerada como morte acidental após um trauma sofrido pela célula. Ultimamente, evidências têm sido propostas para descrever uma forma regulada de necrose. De qualquer maneira, as características desse tipo de morte são inchamento do citoplasma (oncoses), ruptura da membrana plasmática, inchamento de organelas citoplasmáticas e condensação moderada da cromatina (KROEMER *et al.*, 2009). Com o inchamento e ruptura de organelas, pode ocorrer vazamento de proteases de lisossomos que estão envolvidas em desnaturação de proteínas celulares, incluindo as histonas. Dessa forma, a estrutura do nucleossomo se desfaz e o DNA pode ser clivado em sítios aleatórios, gerando a forma característica de arraste (*smear*) em eletroforese com gel de agarose (POTTEN e WILSON, 2004).

Alguns autores consideram que a necrose pode se ativar por receptores de domínio de morte como TNFR1 (do inglês, *TNF Receptor 1*, Receptor 1 de TNF) e TRAIL-R (do inglês, *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor*, Receptor de ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF), que dependem de uma proteína quinase RIP1. Esses receptores ativam a necrose na presença de inibidores de caspases (HOLLER *et al.*, 2000). A partir dessas evidências, o termo “necroptose” começou a ser usado para descrever a necrose orquestrada por receptores e vias sinalizadoras (que não foram claramente esclarecidas) (TAIT e GREEN, 2008; KROEMER *et al.*, 2009).

2.3. MELANINA E CÁLCIO

A melanina é um pigmento presente nos melanócitos produzida a partir da oxidação do aminoácido L-tirosina (figura 4). Ela pode ser de dois tipos, eumelanina e feomelanina, sendo que nessa última há utilização do aminoácido L-cisteína em sua síntese. Sua produção ocorre em organelas conhecidas como melanossomos. Esses melanossomos são transportados dos melanócitos para os queratinócitos que estão próximos a eles e se depositam ao redor do núcleo para a proteção do DNA contra a radiação UV nas células em divisão (KOBAYASHI *et al.*, 1998).

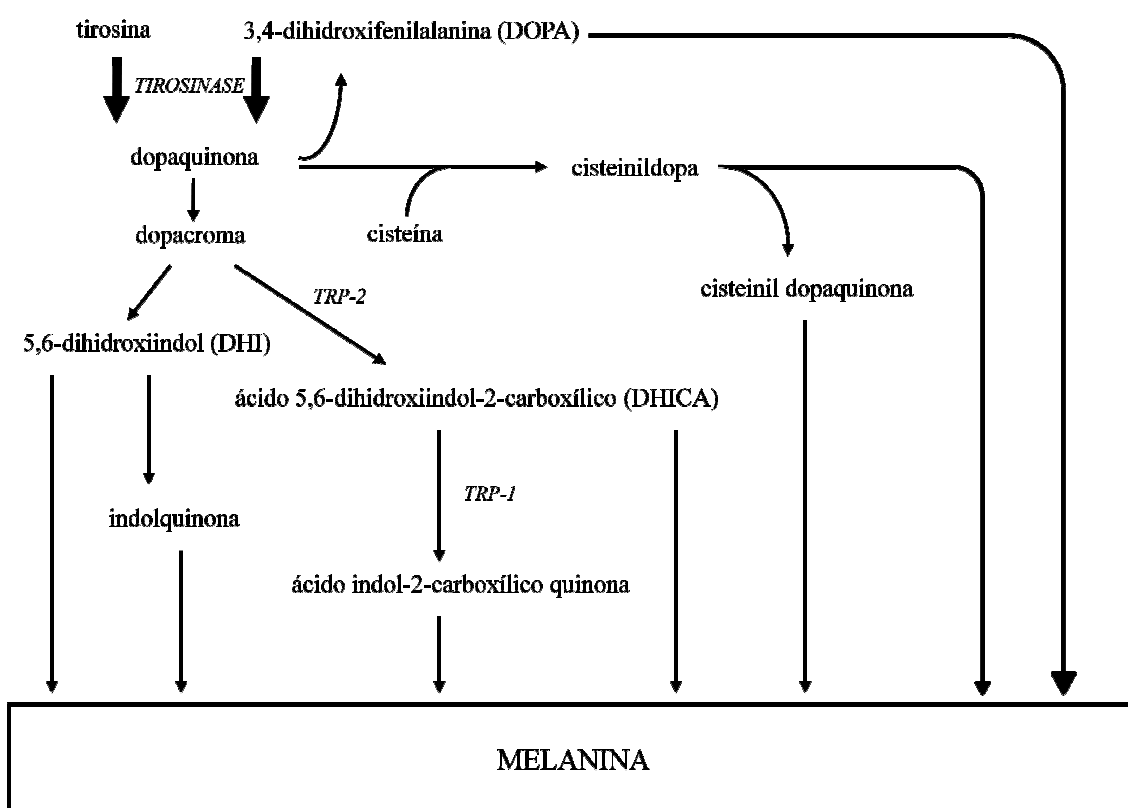


FIGURA 4: Representação esquemática da síntese de melanina a partir da tirosina.

FONTE: RILEY (1997).

NOTA: A figura mostra os principais intermediários tanto da eumelanina quanto da feomelanina, indicando que todos podem ser incorporados no polímero final.

Este pigmento apresenta ainda função de sequestrador de espécies reativas de oxigênio (ROS) que incluem o radical hidroxila, superóxido, oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio, e também protege a célula contra os efeitos da radiação UV. Porém, sabe-se que a síntese da melanina envolve a oxidação de seus precursores e com isso, existe grande chance de que se formem espécies reativas de oxigênio. Além disso,

o consumo de L-cisteína na síntese da feomelanina pode diminuir a capacidade de proteção da célula contra agentes oxidantes, uma vez que este aminoácido tem ação antioxidante (RÓZANOWSKA *et al.*, 1999; SMIT *et al.*, 2008).

O papel fotoprotetor é atribuído principalmente à eumelanina, pela absorção da luz e neutralização dos radicais livres e oxidantes que pôde ser avaliada pela menor lipoperoxidação induzida pela radiação UV. Com a feomelanina, percebeu-se que a lipoperoxidação era maior quando irradiada, sugerindo-se que esta fração da melanina atue como pró-oxidante. (EZZAHIR, 1989). Foi demonstrado que os dois tipos de melanina geram ânion superóxido ao serem irradiadas com UV, porém a eumelanina tem maior capacidade sequestradora de radicais, portanto seu efeito antioxidante sobressai-se sobre o pró-oxidante (KROL e LIEBLER, 1998).

A melanina tem também um papel importante no controle dos níveis de cálcio intracelulares, já que ela consegue ligar-se a ele através dos grupos carboxila presentes em sua estrutura (figura 5) (GOTTESBERGE, 1988). Em estudos com melanina de *Sepia*, foi possível calcular a constante de associação da melanina ao cálcio que foi de $3,3 (\pm 0,2) \times 10^3/\text{mol/L}$. Esse valor é comparável a outras proteínas com afinidade ao cálcio que servem como tampões intracelulares para esse íon. Exemplos dessas proteínas são caslequestrina e calreticulina, que têm constante de ligação de cerca de $1 \times 10^3/\text{mol/L}$. Ocorrem, respectivamente, no lúmen do retículo sarcoplasmático de células musculares esqueléticas e cardíacas e no lúmen do retículo endoplasmático de células não musculares (BUSH e SIMON, 2007).

A entrada de cálcio no melanossomo foi estudada por Salceda e Sánchez-Chávez (2000) e foi mostrado que o fenômeno não é mediado por uma bomba ATPase comum a do retículo endoplasmático, já que inibidores desse tipo de receptor não impediram a entrada do cátion na organela. É possível que haja uma bomba antiporte $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, pois o melanossomo é uma organela ácida, e a entrada do cálcio ocorre contra o gradiente de concentração, assim como na mitocôndria e no retículo endoplasmático. A liberação de cálcio da organela ocorre por mais de uma via, e destaca-se a ação do inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e de receptores de rianodina, que inicialmente foram descritos no retículo sarcoplasmático de células musculares esqueléticas e lisas (FILL e COPELLO, 2002).

Alguns estudos sugerem que baixa concentração de cálcio extracelular induz a proliferação de melanócitos em cultura (ABDEL, 1999) e elevação na concentração intracelular de cálcio tem efeito inibitório na produção de melanina (CARSBURG *et al.*,

1995). A importância do cálcio nessas células também é considerada na movimentação dos melanosomos para os queratinócitos e na mobilidade celular (GOTTESBERGE, 1988).

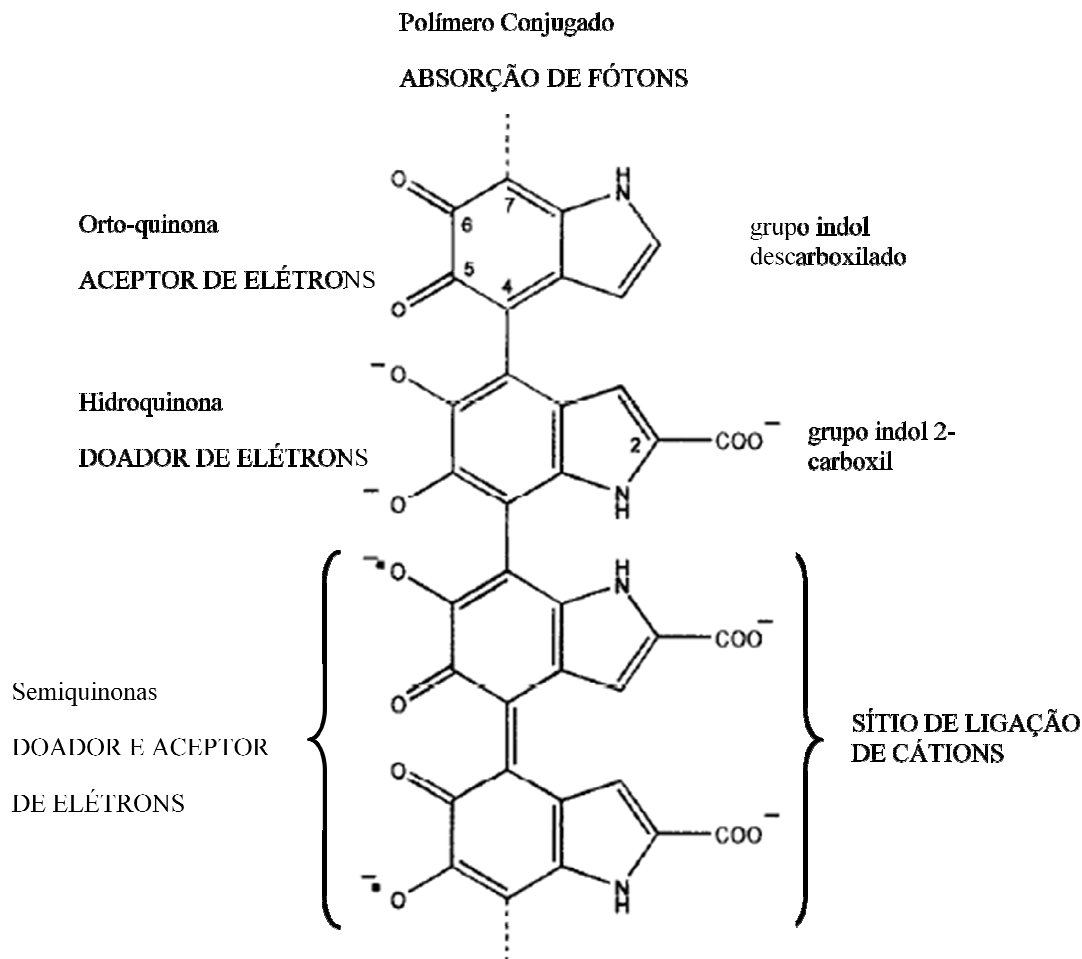


FIGURA 5: Figura esquemática das estruturas encontradas na molécula de eumelanina.
FONTE: RILEY (1997).

NOTE: As três principais funções estão indicadas como reações eletrônicas, que rendem ao polímero capacidade de absorção de fótons, geração e remoção de radicais livres e ligação de cátions pelos grupos carboxila. Pode ainda ocorrer ligações catiônicas envolvendo os grupos hidroxil desprotonados ou semiquinonas.

O efeito da capacidade da melanina em se ligar ao cálcio foi demonstrada por Hoogduijn *et al.* (2003), que avaliou a concentração de cálcio no citoplasma de melanócitos em cultura com diferentes concentrações de melanina. Foi visto que após adição de uma grande quantidade de cálcio no meio extracelular houve aumento da concentração de cálcio citoplasmático de forma inversa à concentração de melanina na célula, ou seja, em melanócitos pouco pigmentados houve grande aumento de Ca^{2+} citoplasmático, comparada com os melanócitos mais pigmentados. Isso ocorreu graças à

maior presença do pigmento nos melanosomos dos melanócitos em que a melanogênese foi estimulada, e a consequente mobilização do íon para essa organela, e no citoplasma a quantidade de cálcio foi menor. Além disso, foi observada a formação de corpos apoptóticos em melanócitos pouco pigmentados com grande concentração de cálcio citoplasmático.

Sabe-se que os níveis de cálcio estão relacionados com a amplificação da resposta à apoptose (MATTSON e CHAN, 2003), pois o aumento global do cálcio no citoplasma causa aumento do influxo de cálcio na mitocôndria que exacerba a permeabilidade da membrana interna com consequente liberação elevada de citocromo *c*. Com isso, ocorre ativação das caspases e o processo de apoptose segue seu curso. De acordo com Mattson e Chan (2003), o citocromo *c* da mitocôndria que é liberado por um estímulo apoptótico liga-se ao receptor de inositol-3-fosfato presente no retículo endoplasmático que causa liberação de cálcio do retículo para o citoplasma amplificando a resposta.

2.4. OXIGÊNIO SINGLETE

O oxigênio singlete é uma forma excitada do oxigênio molecular que apresenta grande reatividade com biomoléculas (MARTINEZ; MEDEIROS e DI MASCIO, 2000). Sua formação pode ocorrer através da radiação UVA (320 – 400 nm) do sol (BRENNER e HEARING, 2008), ou em laboratório através da utilização de substâncias fotossensibilizadoras que absorvem energia de uma fonte artificial de luz e transferem essa energia para o oxigênio (FERNÁNDEZ-GUARINO *et al.*, 2007). Pode-se ainda utilizar a termólise de endoperóxidos derivados do naftaleno para a produção do $^1\text{O}_2$ *in vitro* (MARTINEZ; MEDEIROS e DI MASCIO, 2000).

Dentre os alvos do $^1\text{O}_2$, estão lipídeos (duplas ligações), proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos e grupos tióis. Já foi demonstrado o dano direto ao DNA pelo $^1\text{O}_2$ com formação de aumentada de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina, um importante marcador de lesões oxidativas ao DNA. Foi utilizado endoperóxido marcado com ^{18}O e esse isótopo foi incorporado à guanina, indicando a reação direta entre o $^1\text{O}_2$ e a base nitrogenada (RAVANAT *et al.*, 2000).

Estudos utilizando endoperóxidos para a formação de $^1\text{O}_2$ (OTSU *et al.*, 2005) mostraram que essa espécie reativa é capaz de induzir morte de células HepG2 e linhagem de basófilos derivados de leucemia de rato (RBL) através de apoptose atípica.

Mostrou-se que ocorrem danos na mitocôndria suficientes para a liberação do citocromo *c*, que, em tese, ligar-se-ia com o fator apoptótico ativador de protease 1 (Apaf 1) e formaria o apoptossomo juntamente com a pró-caspase-9. Porém, o processo de apoptose não ocorre como se esperaria. Algumas características morfológicas de uma célula em apoptose estão presentes como a condensação da cromatina, mas não foi observada fragmentação nuclear. Existem hipóteses que indicam a reação do $^1\text{O}_2$ com as caspases, já que estas possuem um resíduo de cisteína no sítio catalítico, que é um alvo em potencial para a oxidação pelo $^1\text{O}_2$. Além disso, especula-se que a inativação das caspases esteja relacionada com a formação do apoptossomo que é sensível ao estado redox (ZECH *et al.*, 2003). Os mesmos autores também sugerem que o $^1\text{O}_2$ elimine a atividade pró-apoptótica do citocromo *c* por reagir com um resíduo de metionina que está associado ao grupo heme (SUTO *et al.*, 2005).

Seu efeito tóxico foi também demonstrado em um estudo com mitocôndrias isoladas de fígado de rato, em que o $^1\text{O}_2$ promoveu danos que foram capazes de diminuir o potencial de membrana da mitocôndria ($\Delta\Psi_m$) (COSSO *et al.*, 2002), o que tornaria possível a abertura dos poros de transição mitocondriais e liberação de fatores apoptogênicos para o citoplasma (BERNARDI e PETRONILLI, 1996).

3. JUSTIFICATIVA

A compreensão dos mecanismos de morte celular causados por uma substância e a comparação desses efeitos com o de outras células tratadas com a mesma substância pode ajudar a entender as particularidades da célula estudada.

O $^1\text{O}_2$ é produzido nas células da pele pela ação da radiação ultravioleta, em especial a radiação UVA. A melanina presente nessas células é capaz de proteger contra os efeitos de espécies reativas, porém também é capaz de causar danos oxidativos. Estudos demonstraram que as células de melanoma apresentam suscetibilidade aos efeitos do $^1\text{O}_2$, com considerável diminuição da viabilidade (SANTOS, 2007). A presença de maior quantidade de melanina pareceu proteger as células contra os efeitos da espécie reativa em questão, o que confirma outro estudo com outra espécie reativa, o peróxido de hidrogênio (HOOGDUIJN *et al.*, 2004), no qual foi mostrado que a maior quantidade de melanina protegeu as células contra o peróxido. Além disso, nesse mesmo estudo, o fluxo de cálcio para o citoplasma foi menor nas células estimuladas. Paradoxalmente, (SANTOS, 2007) ainda relata maior presença de danos em DNA em células estimuladas a produzir melanina.

A geração de $^1\text{O}_2$ tem sido usada para causar morte celular, como no caso da terapia fotodinâmica. Porém, esse efeito em células produtoras de melanina ainda não foi avaliado profundamente.

Portanto, este estudo destina-se ao entendimento dos mecanismos do processo de morte celular após o tratamento com endoperóxido gerador de $^1\text{O}_2$, como uma fonte limpa dessa espécie reativa, em células produtoras de melanina.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo avaliar alguns parâmetros relacionados à morte celular e alterações dos níveis de cálcio intracelulares em células de melanoma com melanogênese estimulada ou não e melanócitos, após o tratamento *in vitro* com endoperóxido gerador de oxigênio singlete.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar características relacionadas à morte celular em células de melanoma com melanogênese estimulada ou não e melanócitos, após o tratamento *in vitro* com endoperóxido gerador de oxigênio singlete como:

- características da morfologia nuclear e integridade da membrana
- fragmentação do DNA
- níveis de ADP e ATP
- liberação do citocromo *c* e do Fator Indutor de Apoptose (AIF) da mitocôndria.

E ainda avaliar a presença do cálcio citoplasmático nas células B16-F10 com diferentes quantidades de melanina e nas Melan-a sob tratamento com oxigênio singlete.

5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Para este trabalho foram utilizadas duas linhagens celulares: células de melanoma murino (B16-F10) e melanócitos murinos (Melan-a). Os melanócitos foram incluídos no trabalho para avaliação das características de morte induzida pelo oxigênio singlete em células normais para a comparação dos efeitos em células tumorigênicas.

O esquema a seguir resume as etapas do trabalho (figura 6). Inicialmente as células serão ou não estimuladas a produzir melanina e posteriormente serão tratadas com uma dose de $DHPNO_2$ a ser definida como tóxica. O $DHPNO_2$ é um endoperóxido que produz oxigênio singlete quando aquecido a $37^\circ C$.

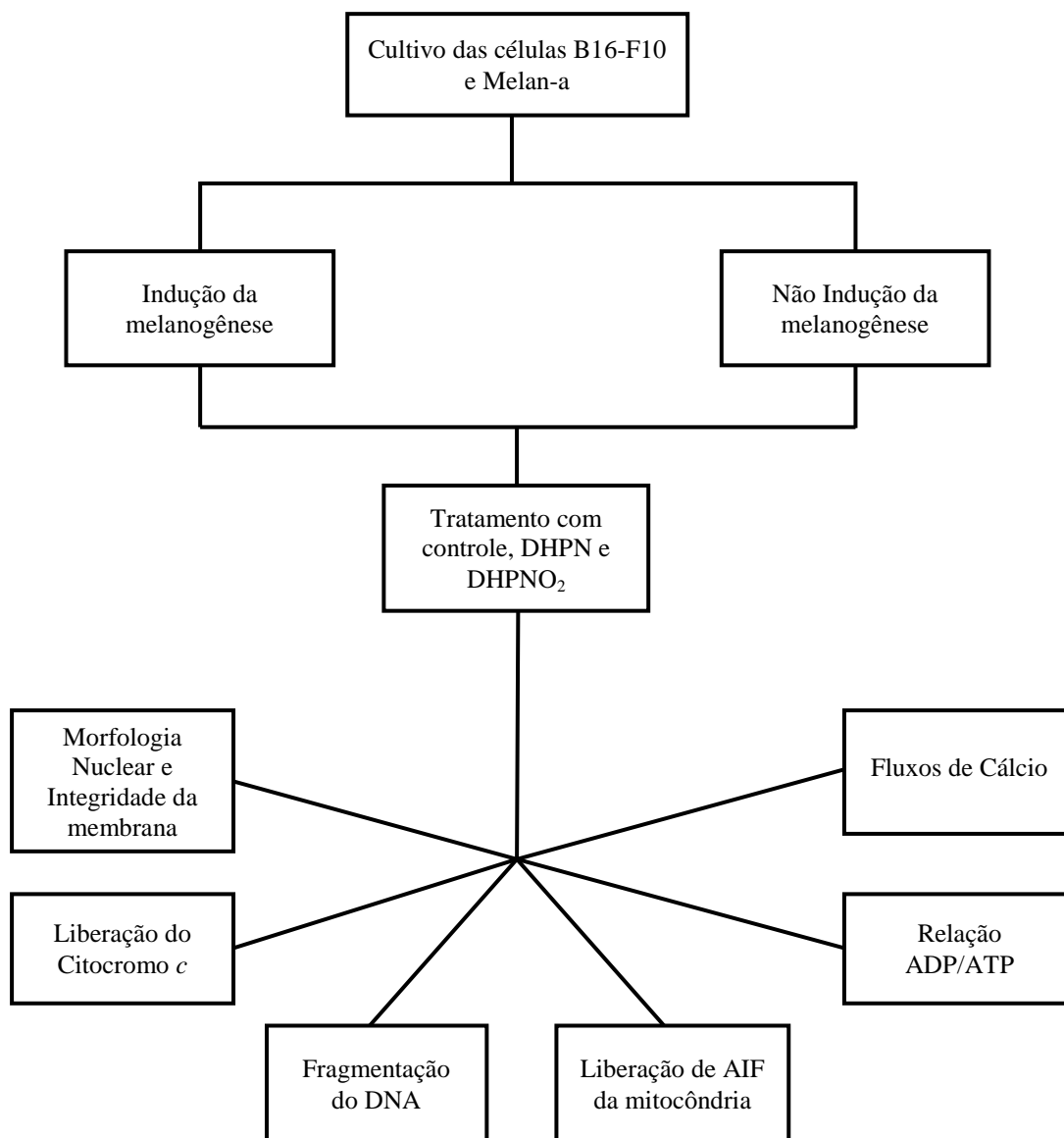


FIGURA 6: Estratégia experimental.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. MATERIAIS UTILIZADOS

As células de melanoma murino B16-F10 e as células de melanócito murino foram cedidas pelo Professor Dr. Roger Chammas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O meio de cultura RPMI 1640 utilizado para o cultivo das células era proveniente da Cultilab. O soro fetal bovino foi comprado da Gibco.

O derivado de naftaleno DHPN foi sintetizado no laboratório do Professor Dr. Paolo Di Mascio no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Em todos os experimentos utilizou-se água ultrapura proveniente do sistema de purificação Gehaka.

Os seguintes materiais foram adquiridos da Sigma: água deuterada (D_2O), Chelex 100, bicarbonato de sódio, HEPES, acetato de forbol miristato (PMA), brometo tiazol azul de tetrazólio (MTT), laranja de acridina, digitonina, ácido etilenodiamina tetracético (EDTA), Tris, Proteinase K, RNase A, RNase T1, tetrabutilamônio, aprotinina, pepstatina, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), *N,N,N',N'* tetrametiletlenodiamina (TEMED), persulfato de amônio (PSA), ácido etileno glicol tetracético (EGTA), albumina bovina, sulfinpirazona, ácido plurônico, tirosina, dimetilsufóxido (DMSO), azul de trypan, desoxicolato de sódio, Triton X100, menadiona, n-metil-bis-acrilamida, ditioneitol (DTT), kit de revelação quimioluminescente, Coomassie brilliant blue G250, anticorpo anti-actina, bicarbonato de potássio.

Os marcadores de massas de proteínas e de pares de bases de DNA para as eletroforeses foram obtidos da Fermentas.

Os anticorpos utilizados foram comprados da Santa Cruz Biotechnology, Inc.

A membrana para *Western Blotting* foi adquirida da BioAgency.

A probe de cálcio fluo-4-AM foi comprada da Invitrogen. O brometo de etídio e o dodecil sulfato de sódio (SDS) foram comprados da Amersham Biosciences. A gentamicina foi comprada da Neo Química. O cloreto de sódio e hidróxido de sódio eram da Quimex, a acrilamida da Fluka, a acetonitrila da JT Baker, o metanol da Bond Carneiro, a agarose da Agargen. Os filtros de PVDF de 0,22 μm eram da National Scientific.

Da Merck, foram comprados os seguintes produtos: ácido trifluoracético (TFA), ácido perclórico, ácido orto-fosfórico, cloreto de potássio, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio hepta hidratado, glucose, arsenito de sódio, azul de bromofenol, azul de metileno, glicerol, etanol, cloreto de amônio.

6.2. SÍNTESE DO GERADOR DE OXIGÊNIO SINGLETE

O gerador de $^1\text{O}_2$ escolhido para uso foi o DHPNO₂, endoperóxido do *N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida (DHPN). Esse endoperóxido é derivado do naftaleno com substituintes hidrofílicos não-iônicos (figura 7). A produção de $^1\text{O}_2$ ocorre quando o endoperóxido é aquecido e o rendimento do oxigênio produzido no estado singlete é de cerca de 50-60% (DEWILDE *et al.*, 1998).

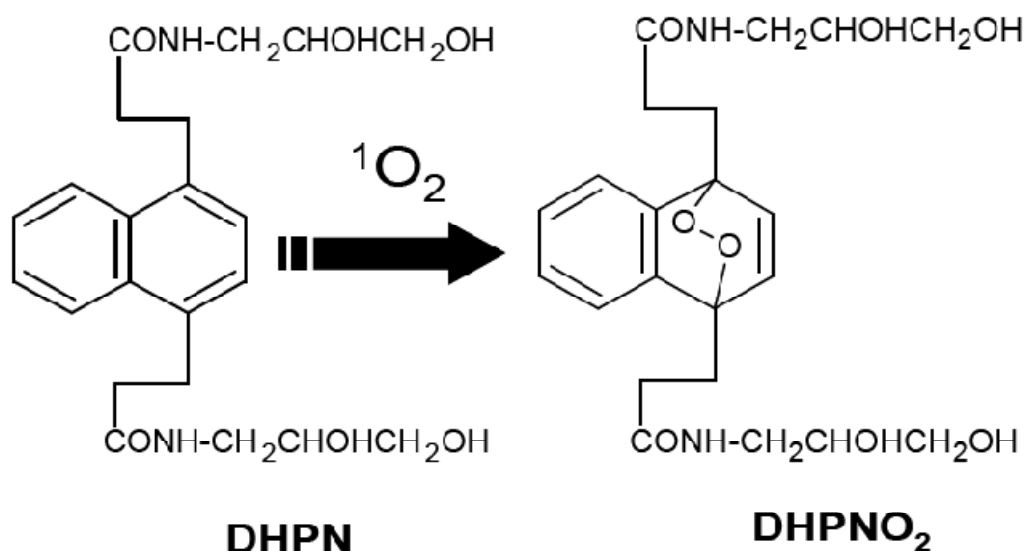


FIGURA 7: Estruturas do DHPN e DHPNO₂.

FONTE: Santos (2007)

NOTA: Representação da formação do endoperóxido DHPNO₂ a partir do derivado naftalênico DHPN e do oxigênio singlete.

O DHPNO₂ foi sintetizado a partir do seu precursor, DHPN, conforme descrito por Di Mascio e Sies (1989), Delwilde *et al.* (1998), Martinez, *et al.* (2000) e Pierlot *et al.* (2000). O DHPN foi dissolvido em D₂O, que aumenta o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ produzido (DEWILDE *et al.*, 1996), e após adição de solução de azul de metileno, a solução foi irradiada com lâmpada de mercúrio (500W), sob borbulho de oxigênio, em banho de gelo a 4°C. A síntese foi monitorada pelo decaimento da leitura da

absorbância em $\lambda = 288\text{nm}$, uma vez que o coeficiente de absorvidade do DHPNO₂ é diferente do coeficiente do DHPN ($\epsilon_{\text{DHPNO}_2} = 140 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{\text{DHPN}} = 7780 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A síntese ocorreu até que a porcentagem de DHPNO₂ fosse de mais de 80%. A pureza é calculada a partir dos valores de absorbância em 288 nm de uma solução 1000 vezes diluída do endoperóxido, sendo que os valores representam a absorbância antes (inicial) e após (final) a decomposição do endoperóxido. A decomposição foi feita deixando-se a solução em banho-maria a 60°C por uma hora:

$$\text{Pureza (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{Abs inicial}_{288}}{\text{Abs final}_{288}} \right) \right] \times 100$$

Após a síntese, foi adicionada resina Chelex 100 e a solução foi mantida sob agitação por 10 minutos, para a remoção do azul de metileno por adsorção na resina. Por fim, a solução de DHPNO₂ foi filtrada utilizando filtro de 0,22 μm de PVDF estéril e aliqüotada em tubos com rosca que foram armazenados em nitrogênio líquido. A concentração final foi determinada considerando a absorbância inicial e a final como descrito anteriormente.

$$\text{Conc (mmol/L)} = \left(\frac{\text{Abs final}_{288} - \text{Abs inicial}_{288}}{7789} \right) \times 10^6$$

Em todos experimentos que o DHPNO₂ foi aplicado, foram feitos controles com o DHPN que foi obtido por prévia decomposição (2 horas a 37°C).

6.3. CULTIVO DAS CÉLULAS

As células de melanoma murino B16-F10 foram cultivadas em garrafas estéreis com meio de cultura RPMI 1640 acrescido de bicarbonato de sódio (concentração final de 0,8 mmol/L) e tampão HEPES (concentração final de 20 mmol/L). Além disso, foram adicionados soro fetal bovino (SFB) para a concentração de 7,5% e 125 μL de gentamicina 40 $\mu\text{g/mL}$ para cada 100 mL de meio de cultura.

As células de melanócito murino Melan-a foram cultivadas nas mesmas condições, mas o meio de cultura foi suplementado com PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) na concentração final de 200 nmol/L. O pH foi ajustado para 7,4. As culturas foram mantidas em estufa (Sanyo), em atmosfera contendo 2,5% de CO₂, com umidade controlada de 95% e temperatura constante de 37°C. Os repiques foram

realizados através dos procedimentos padrões do laboratório em câmara de fluxo laminar.

6.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford, que se baseia na ligação de proteínas ao corante e a mudança no pico de absorção deste (BRADFORD, 1976). Este foi o método de escolha, pois é o que sofre menos interferência com a melanina (BOROVANSKÝ; MELEZÍNEK e BUDĚŠÍNSKÁ, 1986).

A reação foi feita em placas de 96 poços com 5 μ L do lisado de células obtido por sonicação (20Hz por 30 segundos) ou com solução de lise, e 250 μ L da solução de Bradford, composto por 0,01% (p/v) do corante Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,7% (p/v) de etanol e 8,5% (p/v) de ácido orto-fosfórico. A leitura foi feita após cinco minutos e não mais que uma hora da reação, no comprimento de onda de 595 nm. A curva padrão foi feita em todos os testes com soluções de concentração conhecida de albumina bovina e os valores expressos em μ g de proteína por μ L de solução, ou no caso da dosagem de melanina, em mg de proteína por mL de solução.

6.5. ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE E DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA

O estímulo da síntese de melanina das células de melanoma e melanócitos em cultura foi feita pelo tratamento com meio de cultura RPMI 1640 suplementado com L-tirosina e NH_4Cl nas concentrações de 400 μ mol/L e 10 mmol/L, respectivamente (HOOGDUIJN *et al.*, 2004; KONGSHOJ *et al.*, 2007).

As células (5×10^5) foram plaqueadas em placas de 60mm e mantidas nesse meio por 48 horas. Destaca-se que durante esse período de incubação foi utilizado meio de cultura sem PMA para as células Melan-a. Após esse período, as células foram lavadas com PBS (136 mmol/L NaCl; 2,68 mmol/L KCl; 8,1 mmol/L Na_2HPO_4 ; 1,47 mmol/L KH_2PO_4 ; pH 7,4), retiradas das placas com 1 mL de PBS com EDTA (2 mmol/L). Dessa suspensão, retirou-se 100 μ L para dosagem de proteínas pelo método de Bradford após lise por sonicação conforme item 6.4. O restante da suspensão (900 μ L) foi centrifugado a 3000 g por cinco minutos, o sobrenadante descartado e ao pellet

foi adicionado 200 μL de NaOH 1 mol/L. Essa suspensão foi sonicada e incubada *overnight* no escuro. A concentração de melanina foi determinada medindo-se a absorvância em 470 nm. O valor encontrado foi corrigido pelo fator de concentração 0,222, já que a suspensão fora concentrada (de 900 para 200 μL). Foi utilizada uma curva padrão com melanina sintética dissolvida em NaOH 1 mol/L em concentrações conhecidas expressas em μg de melanina por mL de solução (NAGATA *et al.*, 2004). Os resultados foram expressos em μg de melanina/mg de proteína.

6.6. MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE

Após 48h de estímulo da melanogênes, as células foram analisadas em microscópio de contraste de fase (Olympus CK2) e as imagens foram capturadas com uma câmera digital (SONY). As imagens obtidas e o aspecto das células submetidas aos tratamentos foram comparados ao aspecto morfológico das células na condição controle. Todas as imagens foram capturadas em aumento de 400x

6.7. VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM DHPNO₂

A seleção das doses apropriadas para o tratamento foi feita através de teste de viabilidade por brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT) de acordo com Reilly *et al.* (1998). As células foram plaqueadas em placas com 96 poços na quantidade correspondente a 10^4 células por poço. Após cerca de 12 horas, as células aderidas foram tratadas com 50 μL de cada solução, sendo elas: meio de cultura RPMI 1640 sem SFB, meio de cultura RPMI 1640 sem SFB e com água deuterada correspondente ao volume de DHPNO₂ utilizado na maior concentração, DHPN e DHPNO₂ (separadamente) em meio de cultura RPMI 1640 sem SFB nas concentrações de 1, 5 e 10 mmol/L. As soluções foram preparadas a 4°C para evitar a decomposição do DHPNO₂. O tratamento foi de 2 horas em estufa a 37°C. Após esse período, foi realizado o teste de viabilidade por MTT. O mesmo teste foi realizado após 24 horas (22 horas após o tratamento de 2 horas), sendo que nesse teste, foram plaqueadas 5×10^3 células por poço. Nesse caso, após as 2 horas, o meio foi trocado por meio RPMI 1640 com SFB nas células B16-F10 e Melan-a e meio RPMI 1640 suplementado com L-tirosina e NH₄Cl nas células B16-F10 Y.

Após 2 ou 24 horas, o meio foi substituído por uma solução de MTT a 500 µg/mL em HBSS (137 mmol/L NaCl; 5,35 mmol/L KCl; 0,95 mmol/L CaCl₂; 0,81 mmol/L MgSO₄; 0,44 mmol/L NaH₂PO₄; 0,44 mmol/L KH₂PO₄; 5,55 mmol/L glucose; pH 7,4). A placa foi levada à estufa por três horas. Subsequentemente, retirou-se a solução e os cristais formados foram dissolvidos com 200 µL de DMSO. A absorbância foi determinada em leitor de microplaca em 550 nm usando DMSO como branco. A viabilidade foi calculada considerando-se a amostra com meio de cultura RPMI 1640 sem SFB como 100% de viabilidade.

6.8. TRATAMENTO DAS CÉLULAS PARA AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MORTE CELULAR E LIBERAÇÃO DE CÁLCIO

Após determinadas as condições de melanogênese e a dose do endoperóxido, o protocolo de tratamento foi estabelecido. As células foram plaqueadas em diferentes quantidades, de acordo com a necessidade do teste. Após cerca de 12 horas, o meio foi substituído, sendo utilizado RPMI 1640 suplementado com 7,5% de SFB, 10 mmol/L de NH₄Cl e 400 µmol/L de L-tirosina nas células em que o estímulo da melanogênese era desejado e meio RPMI 1640 com 7,5% de SFB e sem PMA nas outras células. Esse meio foi mantido por 48 horas, sendo que após esse período, o tratamento com DHPNO₂ (em meio RPMI 1640 sem SFB) foi feito por 2 horas a 37°C, seguido do protocolo de cada teste. Para as avaliações feitas após 24 horas do início do teste, o meio era substituído após as 2 horas iniciais de decomposição do endoperóxido por meio RPMI 1640 com SFB e sem PMA nas células B16-F10 e Melan-a e meio RPMI 1640 com SFB, L-tirosina e NH₄Cl nas células B16-F10 Y. Esse procedimento foi seguido em todos os testes descritos a seguir.

Para a coleta das células aderidas (quando necessário), estas eram lavadas com PBS a 4°C e soltas utilizando-se 1000 µL de uma solução de EDTA 2 mmol/L em PBS a 4°C por 5 minutos. Quando necessária a dosagem de proteínas, uma alíquota dessa suspensão era retirada e a determinação era feita usando o reativo de Bradford, como descrito no item 6.4.

6.9. AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR COM LARANJA DE ACRIDINA E BROMETO DE ETÍDIO

A morte celular foi avaliada através da contagem de células coradas com laranja de acridina (AO, do inglês *Acridine Orange*) e brometo de etídio (EB, do inglês *Ethidium Bromide*). As células (10^4) foram cultivadas em lamínulas redondas em placas de 24 poços. Após o tratamento de 2 horas, as células foram lavadas com PBS e as lamínulas foram colocadas sobre lâminas com 2 μ L de uma solução formada de partes iguais de laranja de acridina 100 μ g/mL em PBS e brometo de etídio 100 μ g/mL em PBS. A leitura foi feita imediatamente em microscópio de fluorescência com filtro azul, no qual se contaram 300 células de cada lamínula, diferenciando em células viáveis, apoptóticas e necróticas.

As células viáveis são coradas exclusivamente pelo laranja de acridina e mostram fluorescência verde homogênea. O núcleo das células apoptóticas aparece corado de verde com maior intensidade, o que indica condensação da cromatina, uma característica importante de células em processo de morte por esse mecanismo (JÄNICKE *et al.*, 1998), assim como a presença de cromatina condensada depositada na periferia do núcleo. Essas características aparecem também nas células apoptóticas tardias, porém nessas células a membrana plasmática foi comprometida pelo avanço do processo de morte, possibilitando a entrada do brometo de etídio, que cora o núcleo de laranja. As células necróticas são coradas totalmente de laranja devido à grande lesão que ocorre na membrana plasmática dessas células, possibilitando a entrada do corante. A figura 8 ilustra essas marcações (KASIBHATLA *et al.*, 2006a).

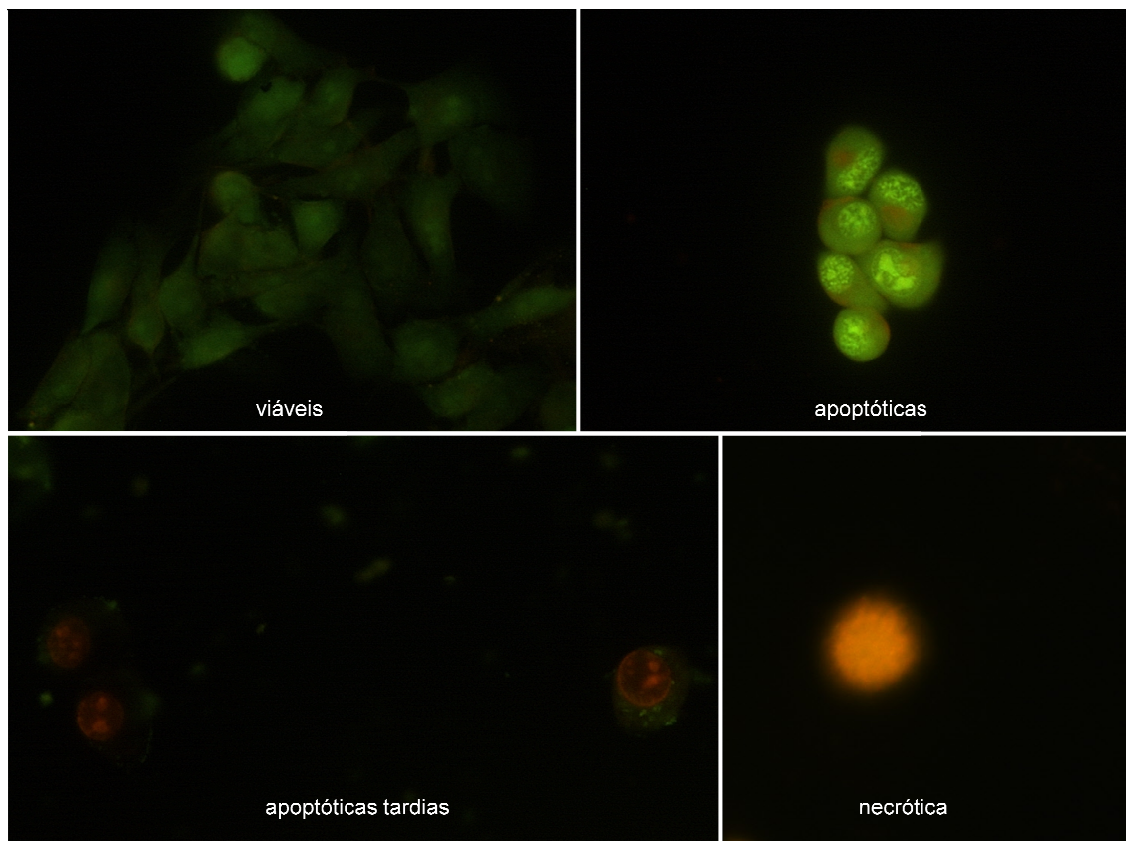


FIGURA 8: Micrografia em microscópio de fluorescência com filtro azul.

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: A figura representa a classificação das células quanto à morfologia relacionada ao tipo de morte celular. Aumento de 400x. A apoptose foi induzida utilizando-se quercetina 10^{-4} g/mL e necrose incubando-se as células a 65°C por 20 minutos (IYER *et al.*, 2009). Em ambas situações foram utilizadas células B16-F10.

6.10. LIBERAÇÃO DO CITOCROMO C

A avaliação da liberação do citocromo *c* foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Picklo *et al.* (1999).

Para esse ensaio foram plaqueadas 5×10^5 células (B16-F10 e Melan-a) em placas de 60mm. Após o tratamento de 48 horas para indução de melanogênese e o de 2 horas com o DHPNO₂, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS e soltas com 1 mL de PBS com 2 mmol/L de EDTA. Dessa suspensão, retirou-se 100 μL para dosagem de proteínas pelo método de Bradford como descrito no item 6.4. O restante da suspensão (900 μL) foi centrifugada, o sobrenadante retirado e ao *pellet* adicionaram-se 200 μL da solução de permeabilização da membrana para extrair o citocromo *c* liberado no citoplasma. Essa solução era composta por 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de digitonina e 80 mmol/L de KCl em PBS. As células foram ressuspensas e mantidas por 10 minutos em gelo para a permeabilização da membrana plasmática (WATERHOUSE *et al.*, 2004). Esse tempo

foi estabelecido para a condição de que até cerca de 95% das células estivessem permeabilizadas que foi acompanhada pela utilização de uma solução 0,4% p/v do corante vital Azul de Trypan em PBS, que marca as células que tiveram a permeabilidade de sua membrana aumentada.

Após esse período, as células foram centrifugadas por 10000 g por 10 minutos e o sobrenadante filtrado em filtro de éster de celulose. O filtrado foi analisado utilizando a separação e detecção do citocromo *c* por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) da empresa Shimadzu (Japão). Utilizou-se uma coluna Jupiter C4 de fase reversa de 5 µm da Phenomenex (150 x 4,6 mm). O gradiente empregado foi composto de uma solução de ácido trifluoracético (TFA) a 0,1% (solvente A) e acetonitrila (solvente B). No início, a concentração do solvente A era de 20% que aumentou para 60% em 12 minutos e manteve-se nessa concentração por mais 5 minutos (17 min). A concentração retornava em 20% após 5 minutos (22 min) e permanecia assim por mais 8 minutos, perfazendo um total de 30 minutos de corrida num fluxo de 1 mL/min. Os picos foram detectados a 393 nm. A área dos picos foi usada para determinação da concentração de citocromo *c* na amostra a partir da curva padrão obtida pela análise de soluções de citocromo *c* preparadas na solução de permeabilização descrita anteriormente. A concentração de citocromo *c* encontrada através da curva de concentração foi corrigida multiplicando o valor pelo fator de concentração 0,222. O resultado foi expresso em quantidade de citocromo *c* liberado em picogramas por quantidade de proteínas, em microgramas.

6.11. FRAGMENTAÇÃO DO DNA

Este estudo foi feito por eletroforese em gel de agarose (KASIBHATLA *et al.*, 2006b). A concentração de células utilizada nesse teste foi de 5×10^5 células/placa em placas de 60 mm. O ensaio foi feito após as 2 horas de tratamento e após as 22 horas de recuperação. As células foram lavadas com PBS e retiradas da placa com PBS com 2 mmol/L de EDTA. A suspensão foi centrifugada por 3000 g por cinco minutos. A extração do DNA foi feita adicionando-se 20 µL do tampão de lise (TES - 20mmol/L EDTA, 100mmol/L de Tris pH 8 e 0,8% SDS) ao *pellet*. As células foram homogeneizadas utilizando-se ponteiras com a ponta cortada (wide-bore) para evitar quebra do DNA. Foram adicionados 10 µL de uma mistura de RNases, contendo 500 U/mL de RNase A e 20.000 U/mL de RNase T1. Deixou-se incubando a 37°C por 2

horas, e após esse período, foram adicionados 10 μL de proteinase K, que permaneceu em incubação a 50°C *overnight*. No dia seguinte, foi dosada a quantidade de DNA utilizando-se o aparelho NanoDrop 1000 da empresa Thermo Scientific (EUA).

Amostras de 10 μg de DNA foram aplicadas no gel de agarose 1,5% sem o tampão de corrida na cuba, para evitar perda do material devido à viscosidade. A solução contendo os 10 μg de DNA foi preparada pipetando-se a quantidade necessária da solução de DNA e adicionando-se o 1,6 μL do tampão de amostra 6X (30% de glicerol e 0,25% de azul de bromofenol) e completando-se o volume para 10 μL com água ultrapura. Na sequência, o tampão de corrida TAE (40 mmol/L Tris; 20 mmol/L ácido acético; 1 mmol/L EDTA) foi adicionado na cuba. Foi feita uma corrida com baixa voltagem para melhor evidenciar os fragmentos (35 V por três horas). O gel foi mergulhado numa solução de brometo de etídio a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por uma hora para ligação do brometo de etídio com as bases do DNA. Após esse período, foi retirado o excesso de brometo de etídio mergulhando-se o gel em água por dez minutos.

O gel foi visualizado no fotodocumentador MultiDoc-It Digital Imaging System da UVP, num comprimento de onda de 302 nm.

6.12. DETERMINAÇÃO DA RAZÃO ADP/ATP

A determinação da razão ADP/ATP foi calculada após a determinação da quantidade de ADP e ATP intracelulares pela modificação do método descrito por Vives-Bauza, (2007). As células foram plaqueadas nas placas de 60 mm numa concentração de 5×10^5 células por placa. Após o tratamento para estímulo da melanogênese e com $^1\text{O}_2$ por 2 horas, as células foram lavadas com PBS gelado e imediatamente foram adicionados 500 μL de ácido perclórico 0,4 mol/L e as placas foram levadas ao freezer -20°C. As células foram descongeladas em gelo e ressuspensas utilizando rodo. A suspensão foi centrifugada a 18.000 g por 10 minutos a 4°C e 200 μL do sobrenadante foram neutralizados com 20 μL de KHCO_3 4 mol/L. A mistura foi mantida em gelo por cerca de 10 minutos e depois em freezer -20°C por 2 horas. Após esse tempo, foi centrifugada a 18.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi analisado por HPLC.

Foi utilizada uma coluna C18 da marca ACE de 5 μm , 25 cm x 4,6 mm, com gradiente de dois tampões, A e B (A composto de 25 mmol/L de NaH_2PO_4 e 100 mg/L de tetrabutilamônio, pH 5; e B, 10% de acetonitrila, 200 mmol/L de NaH_2PO_4 e 100

mg/L de tetrabutylamônio, pH 4). O gradiente usado começava com 50% de cada tampão, sendo que a concentração do tampão B subia para 100% em 13 minutos e logo diminuía para 50% em 2 minutos, sendo que permanecia nessa concentração por mais 10 minutos, perfazendo um total de 25 minutos de corrida num fluxo de 1 mL/min, utilizando detecção no UV em 260 nm. Os picos foram integrados e as áreas transformadas em $\mu\text{mol/L}$ de ADP e ATP a partir de uma curva de calibração construída com padrões dissolvidos na solução de ácido perclórico e posteriormente neutralizados, como descrito anteriormente, na faixa de 5 a 500 $\mu\text{mol/L}$.

A razão foi determinada pela divisão das concentrações de ADP e ATP.

6.13. LIBERAÇÃO DO AIF DA MITOCÔNDRIA

A quantificação de AIF que foi liberado da mitocôndria foi realizado de acordo com Havasi (2008) e Li (2006) e foi determinada por *Western Blotting*. Ao fim do tratamento (24 horas), as células foram lavadas com PBS, soltas com PBS com 2 mmol/L de EDTA, centrifugadas e o *pellet* foi incubado a 4°C por 10 minutos em 100 μL de uma solução de digitonina 0,2 mg/mL em um tampão composto por KCl 120 mmol/L, KH_2PO_4 5 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, EGTA 2 mmol/L e uma mistura de inibidores de proteases (aprotinina e pepstatina, ambos a 2 $\mu\text{g/mL}$). Após a incubação, a suspensão foi centrifugada a 14.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante (chamado “fração-digitonina”) foi utilizado para a análise. A quantidade de proteínas foi determinada pelo método de Bradford como descrito em 6.4. A eletroforese foi realizada com 50 μg de proteínas do sobrenadante em um gel de poliacilamida a 12,5%. A quantidade necessária de cada amostra foi misturada com o tampão de amostra, na concentração final 1X (2% SDS; 2 mmol/L DTT; 4% glicerol; 40 mmol/L tris pH 6,8; 0,01% azul de bromofenol) e água para completar o volume final de 50 μL . Após, as amostras foram fervidas por 5 minutos em água fervente. Cada gel de poliacrilamida foi feito utilizando-se 3,10 mL da solução de Acrilamida 30:0,8 (acrilamida:n-metil-bis-acrilamida); 2,8 mL de tris-HCl 1 mol/L pH 8,8; 700 μL de água ultra-pura; 7,5 μL de TEMED e 37,5 μL de uma solução 0,1% de PSA em água ultra-pura. O gel de estoque, ou *stacking gel* a 5% foi feito com 425 μL da solução de Acrilamida 30:0,8; 312 μL de tris-HCl 1 mol/L pH 6,8; 1,75 mL de água ultra-pura; 3,75 μL de TEMED e 18,75 μL da solução de PSA descrita acima. A eletroforese foi feita a 100 V, 25 mA até o marcador de massas ou o azul de metileno presente no tampão de amostra atingir o final

do gel (cerca de 3-4 horas). As proteínas do gel foram posteriormente transferidas para uma membrana de nitrocelulose a 30 mA *overnight* (cerca de 14 horas). Após a membrana ser bloqueada por 1 hora a temperatura ambiente com leite desnatado em pó 5% em TBST (150 mmol/L NaCl; 50 mmol/L tris-HCl pH 7,5 e 0,1% de Tween 20 que era adicionado antes do uso) sob agitação, ela foi incubada com o anticorpo murino monoclonal anti anti-AIF na diluição de 1:1000 em TBST a 4°C *overnight* sob agitação. Após lavagens sucessivas com TBST, a membrana foi incubada com o anticorpo caprino anti-anticorpo murino ligado a peroxidase na diluição de 1:5000 em TBST por uma hora a temperatura ambiente sob agitação. As bandas protéicas foram visualizadas após aplicação dos reagentes de revelação em sistema quimioluminescente (kit composto por duas soluções, uma solução tampão com peróxido e outra com um produto tipo luminol, que exibe quimioluminescência após ser misturado a um agente oxidante). A actina foi utilizada como controle, sendo revelada com anticorpo policlonal de coelho anti-actina diluído 1:1000 em TBST, com incubação *overnight* a 4°C sob agitação. Após lavagens sucessivas, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-anticorpo de coelho diluído 1:5000 em TBST por 1 hora a temperatura ambiente. A quantificação da intensidade das bandas foi realizado utilizando-se o programa LabWorks.

6.14. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CÁLCIO INTRACELULARES

O fluxo de cálcio citosólico foi avaliado através de microscopia confocal com utilização de probe que fluoresce quando ligada ao cálcio. O procedimento foi baseado em Hoogduijn *et al.* (2004).

As células (5×10^4) foram cultivadas em placas de 60 mm com lamínulas no fundo. Após o estímulo da melanogênese, as células foram incubadas com 3 $\mu\text{mol/L}$ de fluo-4 AM, 200 $\mu\text{mol/L}$ de sulfinpirazona e 200 mg/mL de ácido plurônico por 45 minutos em meio RPMI. Após esse tempo, as células foram lavadas com solução Tyrode (10 mmol/L de HEPES; 12 mmol/L de NaHCO_3 ; 137 mmol/L NaCl; 2,7 mmol/L de KCl; 5 mmol/L de glucose; pH 7,4). Foi adicionado 1 mL dessa solução nas placas que foram posicionadas no microscópio confocal. Após a escolha de um campo adequado, (15-20 células por campo num aumento de 10x), iniciou-se a captação da fluorescência pelo equipamento. Após 45 segundos da captação da fluorescência basal, o endoperóxido foi adicionado na concentração de 10 mmol/L. A captação da

fluorescência continuou por mais 12 minutos, sendo que a intensidade emitida era captada a cada 5 segundos. O laser de excitação usado foi de 488 nm e emissão captada em 550 nm. Esse ensaio foi feito no microscópio confocal invertido Zeiss LSM 510 Meta no Instituto de Química da USP em São Paulo. A partir dos dados coletados, construiu-se um gráfico representativo da fluorescência do fluo-4 ligado ao cálcio pelo tempo de análise.

6.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey sendo expressos na forma de média \pm desvio padrão. O programa estatístico utilizado foi o SigmaStat 3.5. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p < 0,05$.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. MELANOGÊNESE

Vários protocolos de estímulo de melanogênese foram testados para as células, dentre eles o fornecimento do aminoácido L-tirosina, que é o principal substrato para a síntese da melanina, em concentrações múltiplas da quantidade presente no meio RPMI 1640 (0,155 mmol/L). As concentrações utilizadas foram 0,31; 0,62; 1,24 e 2,48 mmol/L de L-tirosina em meio RPMI 1640. Outra tentativa foi a suplementação do meio com o hormônio α -MSH, responsável, dentre outros efeitos, pelo aumento da expressão da tirosinase, a enzima limitante na síntese de melanina (ABDEL-MALEK *et al.*, 1995). Foi testado na concentração de 30 nmol/L como utilizada por Santos (2007). Também foi testado o substrato e o hormônio em conjunto para avaliar o efeito sinérgico das duas substâncias, sendo que as condições testadas foram: 1,24 mmol/L de L-tirosina + 30 nmol/L de α -MSH e 2,48 mmol/L L-tirosina + 30 nmol/L de α -MSH.

Porém, o protocolo que se mostrou mais reprodutível foi o baseado em Hoogduijn *et al.* (2004) e Kongshoj *et al.* (2007), que utilizam L-tirosina 400 μ mol/L e NH_4Cl 10 mmol/L por 48 horas. Nesse protocolo, além de utilizar o substrato da enzima, o NH_4Cl é capaz de neutralizar o pH dos melanossomos, que são organelas ácidas. Isso colabora para aumentar a atividade da tirosinase (que se localiza nos melanossomos), além de facilitar a entrada de tirosina nessa organela (KONGSHOJ *et al.*, 2007). Assim, o uso concomitante de L-tirosina e de NH_4Cl tem efeito sinérgico na produção de melanina.

A quantidade de melanina foi dosada baseada no protocolo proposto por Nagata *et al.* (2004). Para isso, construiu-se uma curva de calibração para a dosagem espectrofotométrica que foi feita em leitor de microplacas (figura 9).

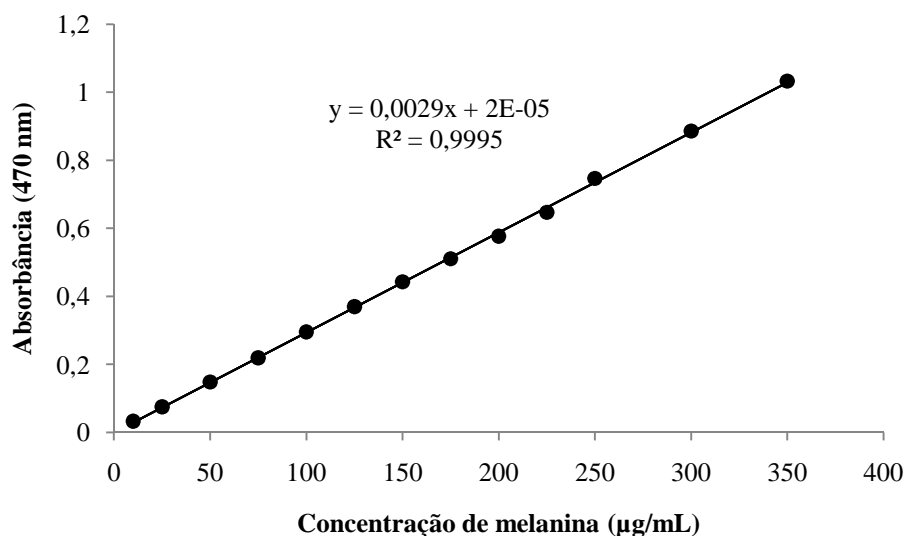


FIGURA 9: Curva padrão da concentração de melanina.

FONTE: O Autor (2010)

NOTA: Utilizou-se uma solução de melanina sintética dissolvida em NaOH 1 mol/L e fervida por 1 hora na concentração de 500 µg/mL, sendo que dela obtiveram-se as outras soluções para a construção da curva.

A partir da curva, as concentrações das amostras foram calculadas. Para normalização, a concentração de proteínas de cada amostra foi determinada pelo método de Bradford. Os valores absolutos foram convertidos em porcentagem de melanogênese, comparando-se com o controle. O resultado obtido está expresso na figura 10.

A figura mostra que as células B16-F10 tiveram aumento na síntese de melanina após estímulo em mais de 9 vezes, enquanto que as células Melan-a, o aumento foi de menos de 2 vezes (1,81 vezes). Apesar de ter havido diferença estatística nas células Melan-a após o tratamento, o aumento não foi tão significativo quando comparado ao da B16-F10. Pela observação da micrografia das células após o tratamento é possível verificar a maior formação de melanina da célula B16-F10 (figura 11).

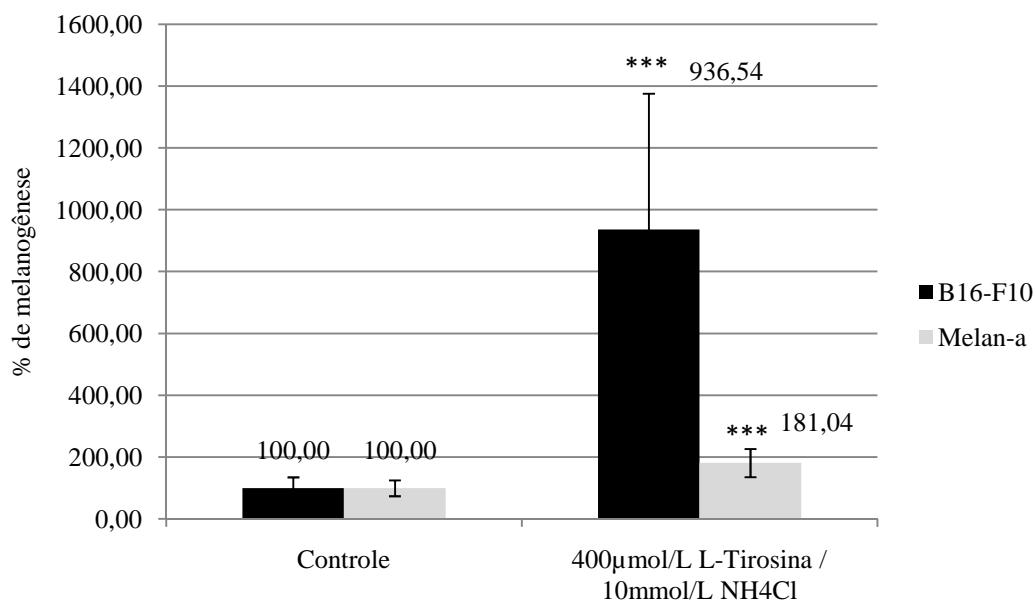


FIGURA 10: Estímulo da melanogênese após 48 horas.

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: Nesse ensaio o controle utilizado foi meio RPMI1640. O estímulo com 400 µmol/L de L-Tirosina e 10 mmol/L foi feito por 48 horas. O resultado foi expresso em porcentagem de melanogênese ± desvio padrão, considerando-se o controle como 100% e o aumento na melanogênese após o tratamento 3 experimentos independentes realizados em triplicata. O valor médio de melanina das células B16-F10 considerado 100% foi 4,65 µg/mg proteína, e nas células Melan-a, 19,04 µg/mg de proteína, sendo que esses valores são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,001$). *** $p < 0,001$ em relação aos respectivos controles.

O valor absoluto de melanina nas células B16-F10 controle é menor que nas células Melan-a, sendo 4,65 e 19,04 µg/mg de proteína, respectivamente, sendo que a diferença é estatisticamente significativa. Porém, esta diferença não pode ser evidenciada na micrografia (Figura 11-1 e 3), que não mostra os grânulos evidentes de melanina, quer seja pela sensibilidade na detecção ou pela maior distribuição dos grânulos de melanina pela célula.

As células Melan-a foram derivadas de melanoblastos de camundongos da linhagem C57BL/6, que são camundongos que apresentam a pele hiperpigmentada (BENNETT; COOPER e HART, 1987). De acordo com as micrografias apresentadas por Bennett (1987) ao descrever o isolamento da linhagem, o esperado era que estas células (controle) apresentassem quantidade de melanina semelhante à quantidade das células B16-F10 estimulada, com grânulos mais visíveis. Porém, durante todo o tempo de estudo, não foi possível cultivar estas células com seu fenótipo descrito inicialmente. Segundo Casillo, Peral e Frati (1990), as células normais quando cultivadas *in vitro* tendem a perder algumas características que apresentam *in vivo*. Isso se deve à drástica

mudança de um ambiente tridimensional, com diversas sinalizações para um ambiente de cultivo em monocamada, com proliferação acelerada.

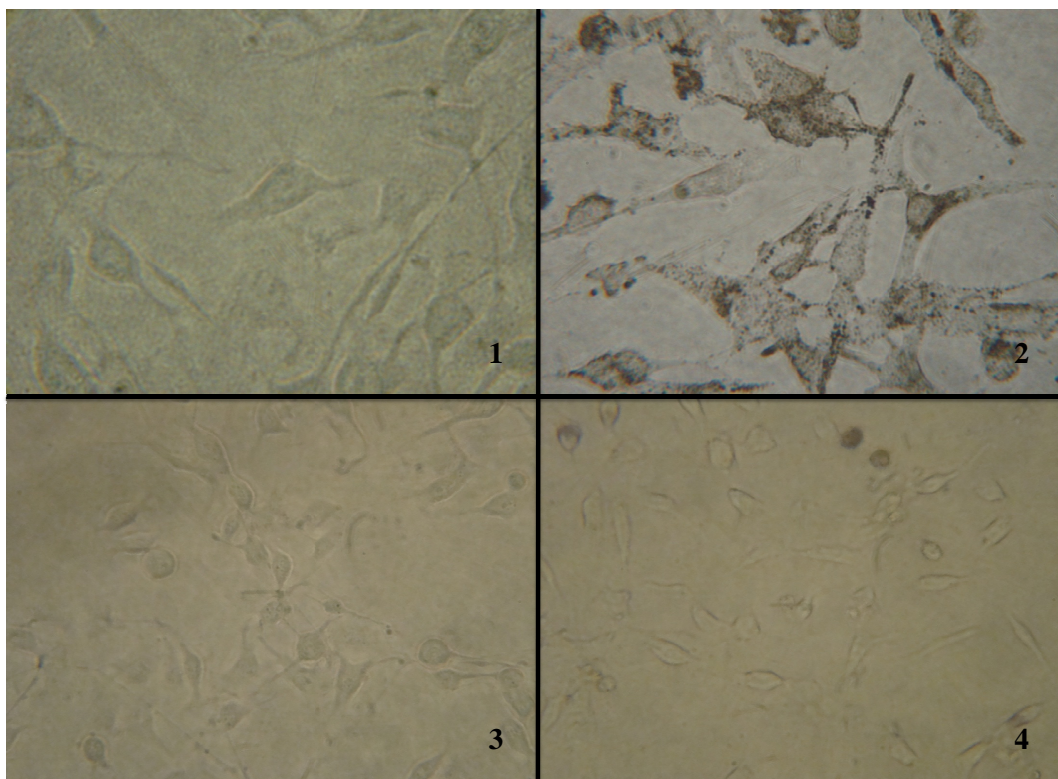


FIGURA 11: Micrografia das células B16-F10 e Melan-a após o tratamento de estímulo da melanogênese por 48 horas.

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: 1 – B16-F10 controle; 2 – B16-F10 estimulada; 3 – Melan-a controle; 4 – Melan-a estimulada. As fotos foram obtidas com câmera fotográfica digital acoplada no microscópio invertido. É possível observar o aumento na produção de melanina entre as células B16-F10 (1 e 2) que não é observado nas células Melan-a (3 e 4). Apesar da concentração de melanina ser maior nas células controle Melan-a comparada com as B16-F10 controle (figura 10), não é possível observar essa diferença na micrografia (1 e 3). Aumento de 400x.

Já que o aumento da quantidade de melanina nas células Melan-a foi menor que o aumento nas células B16-F10, este trabalho foi feito com estímulo à melanogênese somente nas células de melanoma B16-F10.

7.2. VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade foi determinada pelo teste do MTT (REILLY *et al.*, 1998). O teste de viabilidade por MTT baseia-se na determinação da atividade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial, que reduz o sal solúvel de tetrazólio em um sal insolúvel de formazana nas células viáveis.

Esse ensaio foi realizado para determinar a dose de endoperóxido a ser utilizada. Para tanto, testaram-se as doses de 1, 5 e 10 mmol/L de endoperóxido para as B16-F10 não estimuladas e Melan-a. As B16-F10 estimuladas (B16-F10 Y) foram testadas apenas com 10 mmol/L. A incubação com o MTT foi feita imediatamente após as 2 horas de incubação com o DHPNO₂. Os resultados estão mostrados na figura 12. Foi utilizado nesse teste água deuterada (D₂O) porque o endoperóxido está diluído nesse veículo. Utiliza-se D₂O para a síntese de ¹O₂, pois nesse solvente o tempo de meia vida do ¹O₂ é maior quando comparado ao dissolvido na água (RYTER e TYRRELL, 1998).

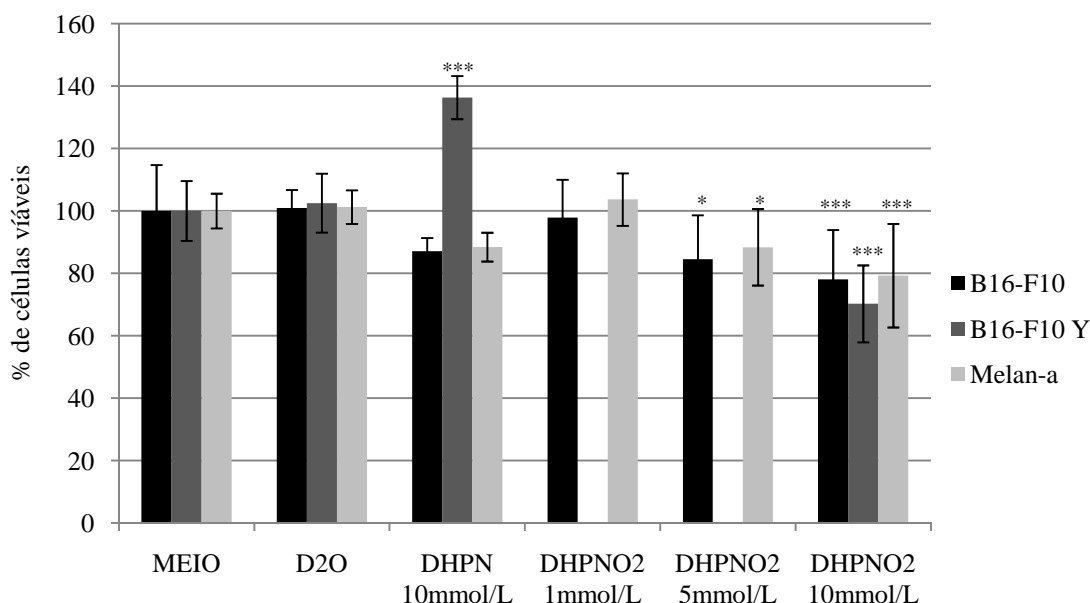


FIGURA 12: Viabilidade celular após 2 horas.

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: Resultado obtido após plaqueamento das células e tratamento por 2 horas com DHPN e DHPNO₂. B16-F10 Y representa as células B16-F10 com estímulo à melanogênese. Após o tratamento, foi feita incubação com o sal de tetrazólio por 3 horas e dissolução dos sais formados com DMSO. O grupo MEIO representa o controle que foi considerado 100% de viabilidade. O grupo D₂O representa o controle do solvente do DHPNO₂, que está dissolvido em água deuterada. Nesse caso, foi adicionado volume de D₂O correspondente ao volume utilizado na maior dose de DHPNO₂ em meio RPMI 1640. Resultados expressam a média ± desvio padrão referente a 3 experimentos independentes realizados em triplicata. * p<0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001 em relação aos seus respectivos controles em meio.

Observa-se que a concentração de endoperóxido de 10 mmol/L foi a mais tóxica dentre as testadas após 2 horas de tratamento. A viabilidade caiu para 78,0% nas células B16-F10, 70,2% nas B16-F10 estimuladas e 79,3% nas Melan-a. A dose de 1 mmol/L não diminuiu a viabilidade de maneira significativa.

Observou-se um aumento da viabilidade nas células B16-F10 Y tratadas com DHPN 10 mmol/L para cerca de 140%, mostrando um possível efeito protetor para a célula.

Esse efeito pode ser explicado levando-se em consideração a característica dos melanossomos em células de melanoma. Um estudo realizado por Borovanský, Mirejovský e Riley (1991) propõe que a estrutura dos melanossomos é anormal em células de melanoma, incluindo uma linhagem de melanoma murino B16.

Essa estrutura anormal dos melanossomos facilitaria o vazamento de intermediários de síntese, sendo que dentre os intermediários, estariam radicais livres, incluindo semiquinonas que são formadas durante a melanogênese num equilíbrio redox entre intermediários metabólicos, as quinonas e catecóis (figura 13), além de oxidações envolvendo um elétron de precursores da melanina por peroxidase/H₂O₂ e durante sua autooxidação (BOROVANSKÝ, 1996) (figura 14).

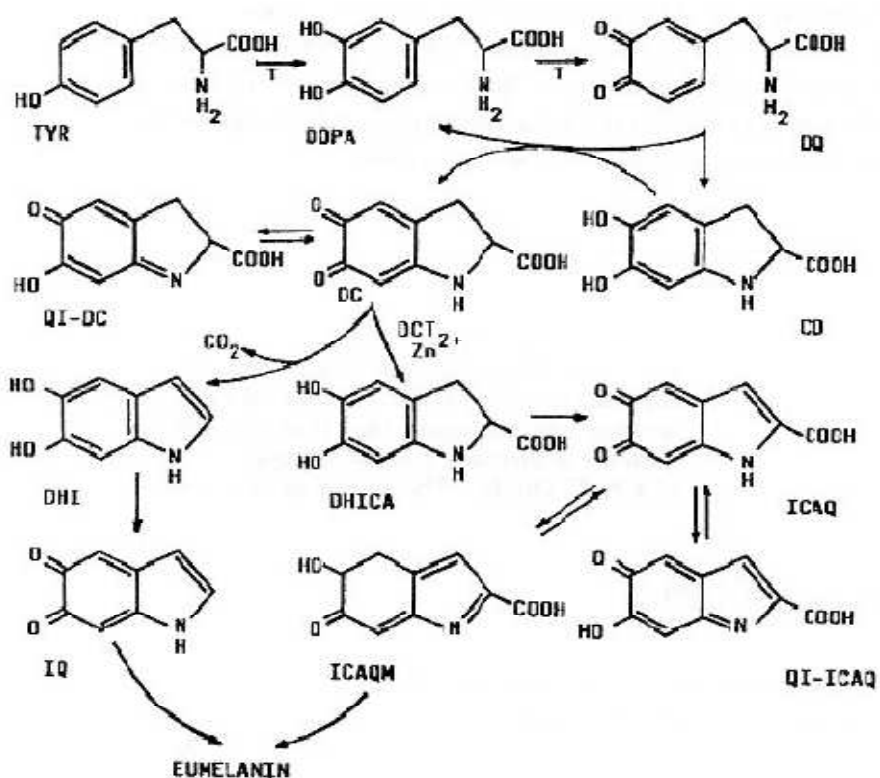


FIGURA 13: Síntese da melanina segundo esquema Raper-Mason.

FONTE: BOROVANSKÝ (1996).

NOTA: Tyr – Tirosina, DOPA – 3,4-dihidroxifenilalanina, DQ – dopaquinona, CD – ciclodopa (leucodopacromo), DC – dopacromo, QI-DC – forma isomérica quinona-imino do dopacromo, DHI – 5,6 dihidroxiindol, DHICA – ácido 5,6 dihidroxiindol-2-carboxílico, ICAQ – ácido indol-2-carboxílico-5,6 quinona, QI-ICAQ – forma isomérica quinona-imino do ICAQ, ICAQM – forma metil quinona do ICAQ, IQ – Indol Quinona, T – tirosinase, DCT – dopacromo tautomerase

Esses intermediários radiculares poderiam reagir com o DHPN e suas ações tóxicas poderiam ser neutralizadas, aumentando assim a viabilidade nas células com mais melanina e tratadas com 10 mmol/L de DHPN.

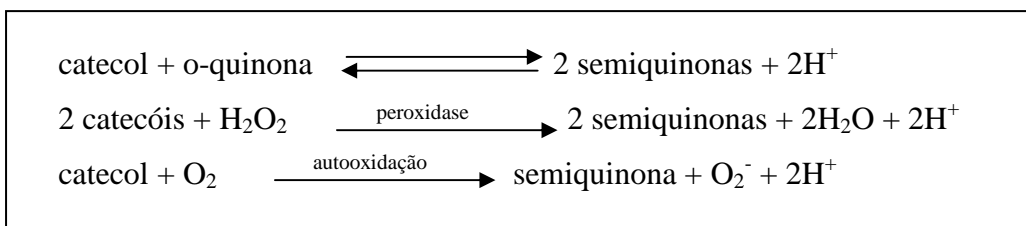


FIGURA 14: Formação de semiquinonas a partir de intermediários da síntese de melanina.
 FONTE: BORO VANKÝ, (1996).

O teste de viabilidade também foi feito após 22 horas do tratamento de 2 horas com o endoperóxido. O resultado está demonstrado na figura 15. A viabilidade das células B16-F10 diminuiu para 49,7% quando comparada ao controle. As células B16-F10 que foram estimuladas tiveram a viabilidade reduzida para 53,3% e as Melan-a para 72,5%. O tratamento com DHPN causou pequena queda na viabilidade, mas não foi tão significativa quanto à causada pelo tratamento com DHPNO₂. Nesse caso, não se observou uma viabilidade aumentada para o tratamento com DHPN nas B16-F10 estimuladas.

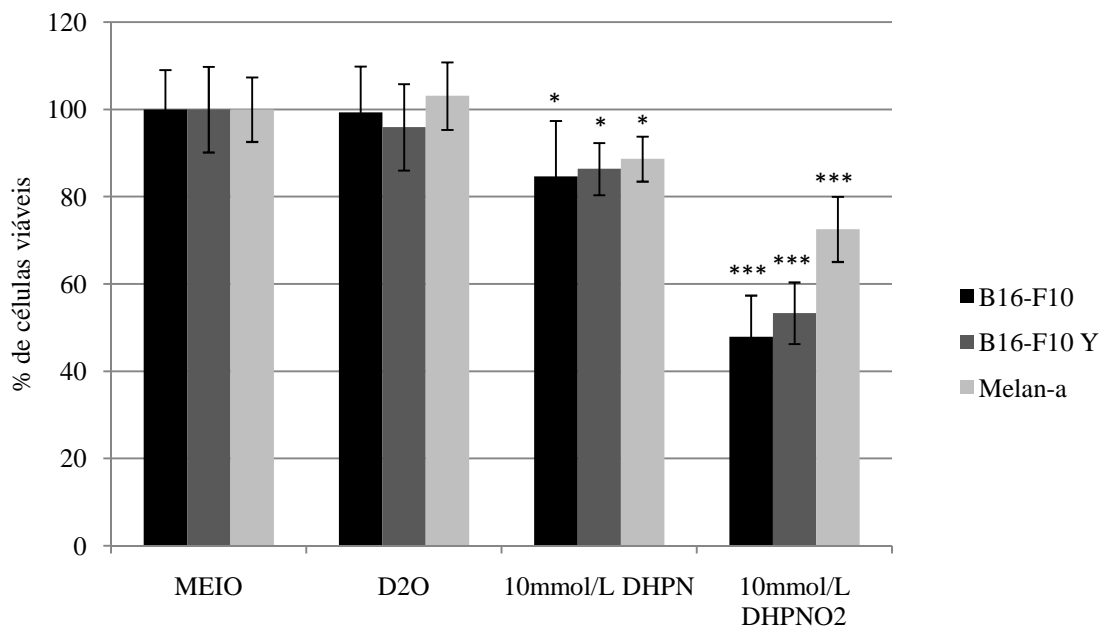


FIGURA 15: Viabilidade celular após 24 horas.

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: Resultado obtido após plaqueamento das células e tratamento por 2 horas com DHPN e DHPNO₂ mais 22 horas de recuperação, condição essa obtida pela substituição do meio de tratamento pelo meio utilizado durante o estímulo de melanogênese. B16-F10 Y representa as células B16-F10 com estímulo à melanogênese. Após as 24 horas, foi feita incubação com o sal de tetrazólio por 3 horas e dissolução dos sais formados com DMSO. O grupo MEIO representa o controle que foi considerado 100% de viabilidade. O grupo D₂O representa o controle do solvente do DHPNO₂, que está dissolvido em água deuterada. Nesse caso, foi adicionado volume de D₂O correspondente ao volume utilizado na maior dose de DHPNO₂ em meio RPMI 1640. Resultados representam a média ± desvio padrão referente a 3 experimentos independentes realizados em triplicata. * p<0,05 e *** p<0,001 em relação aos seus respectivos controles em meio.

Observa-se que a viabilidade das células diminuiu de forma mais significativa após 24 horas quando comparada à viabilidade determinada imediatamente após as 2 horas de incubação com DHPNO₂ (tabela 2): as células Melan-a tiveram pouca diferença (79,3% em 2 horas para 72,5% em 24 horas); as células de melanoma tiveram maior diferença (78% para 49,7%) e as de melanoma quando estimuladas, mostraram diferença menor que as não estimuladas (de 70,2% para 53,3%).

TABELA 2: Diferença da viabilidade entre 2 e 24 horas de tratamento
 FONTE: O Autor (2010)

	2 horas	24 horas
B16-F10	78,0%	49,7%
B16-F10 Y	70,2%	53,3%
Melan-a	79,3%	72,5%

Comparando-se as viabilidades nos dois tempos testados, percebe-se que a ação causada pelo $^1\text{O}_2$ nas células B16-F10 com e sem estímulo gerou uma situação em que a viabilidade após 24 horas foi menor do que após as 2 horas de incubação com o endoperóxido. Essa informação mostra indiretamente que a atividade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial era menor, ou por inativação da proteína ou pela menor quantidade de células vivas aderidas na placa. A última situação mostra-se mais plausível no caso das células de melanoma, já que foi observado ao microscópio que, após o tratamento, havia diminuição de células presentes no poço da placa.

Já as células Melan-a tiveram pequena diferença na viabilidade entre os dois tempos testados. Isso indica que a atividade da enzima mitocondrial nas duas situações era parecida. No caso da Melan-a, o número de células na placa após o tratamento não era visivelmente diferente após 2 ou 24 horas. Pode-se sugerir que as células Melan-a sejam mais resistentes que as B16-F10. Além disso, outra hipótese para explicar a queda na viabilidade é a inativação da enzima pelo $^1\text{O}_2$, já que é reconhecido o dano em proteínas por essa espécie reativa (SUTO *et al.*, 2007). Além disso, parece que a célula não degradou a enzima inativada pelo dano oxidativo causado pelo $^1\text{O}_2$ e tenha sintetizado novas moléculas da enzima durante as 22 horas de recuperação. Parece também que não sofreu danos maiores que impossibilitassem a sobrevivência da célula, pois o valor da viabilidade em 24 horas é semelhante ao de 2 horas.

Sabe-se que a inativação de uma proteína por danos oxidativos é uma razão para sua degradação através do proteossomo, um importante sistema proteolítico responsável pela eliminação de proteínas inativas (JUNG e GRUNE, 2008). A oxidação da proteína pode ocorrer em três estágios: no primeiro, o dano oxidativo é leve e a proteína tem sua atividade levemente diminuída, porém pode tornar-se mais solúvel, pela formação de cargas negativas e aumento da polaridade. Nesse caso, a proteína não é degradada. No segundo estágio, o dano é mais intenso e causa o desdobramento da forma nativa da proteína, diminuindo sua atividade e solubilidade. Nessa situação, a proteína pode ser alvo do sistema proteossomal, já que resíduos de aminoácidos

hidrofóbicos estão expostos. Se o dano persistir, a proteína pode ser oxidada ainda mais e pode ocorrer ligação cruzada entre proteínas. Nesse estágio, a proteína não é mais degradada pelo proteossomo, e a célula tende a morrer (JUNG; BADER e GRUNE, 2007).

7.3. AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR

Este teste avalia características morfológicas de apoptose e necrose. São utilizados dois corantes que têm afinidade pelo DNA, laranja de acridina e brometo de etídio. O laranja de acridina é capaz de penetrar nas células viáveis, enquanto que o brometo de etídio somente cora o DNA das células cuja membrana plasmática estiver danificada. Foi utilizado microscópio de fluorescência com filtro azul para a visualização morfológica das células não fixadas. Com esse filtro, o laranja de acridina cora a célula de verde e o brometo de etídio de laranja (KASIBHATLA *et al.*, 2006a), como descrito no item 6.7.

As células foram contadas e classificadas em viáveis, apoptóticas (recentes e tardias) e em necróticas, sendo que o resultado está expresso na figura 16.

A partir desse teste, foi possível averiguar que as células B16-F10 tratadas com $^1\text{O}_2$ na forma de endoperóxido por 2 horas foram as únicas em que a contagem relativa das células com características de apoptose foi estatisticamente maior que no controle, sendo que houve também diminuição na contagem de células viáveis.

Nas células B16-F10 estimuladas houve diferença na quantidade de células viáveis após o tratamento com o endoperóxido e tendência no aumento das células com características de apoptose. Nas células Melan-a, não houve diferença na contagem das células viáveis, apoptóticas ou necróticas.

Com exceção da Melan-a, os resultados obtidos nesse teste podem ser comparados com os valores de viabilidade. Nas células B16-F10, a quantidade de células com características de apoptose após o tratamento com $^1\text{O}_2$ foi significativamente maior em relação ao controle que nas células B16-F10 estimuladas. As células Melan-a não tiveram características morfológicas de morte celular. Considerando-se que no teste de viabilidade utilizado era feita a determinação de um parâmetro bioquímico, pôde-se averiguar que, em 2 horas, o efeito bioquímico não causou alterações morfológicas que fossem detectáveis por esse teste.

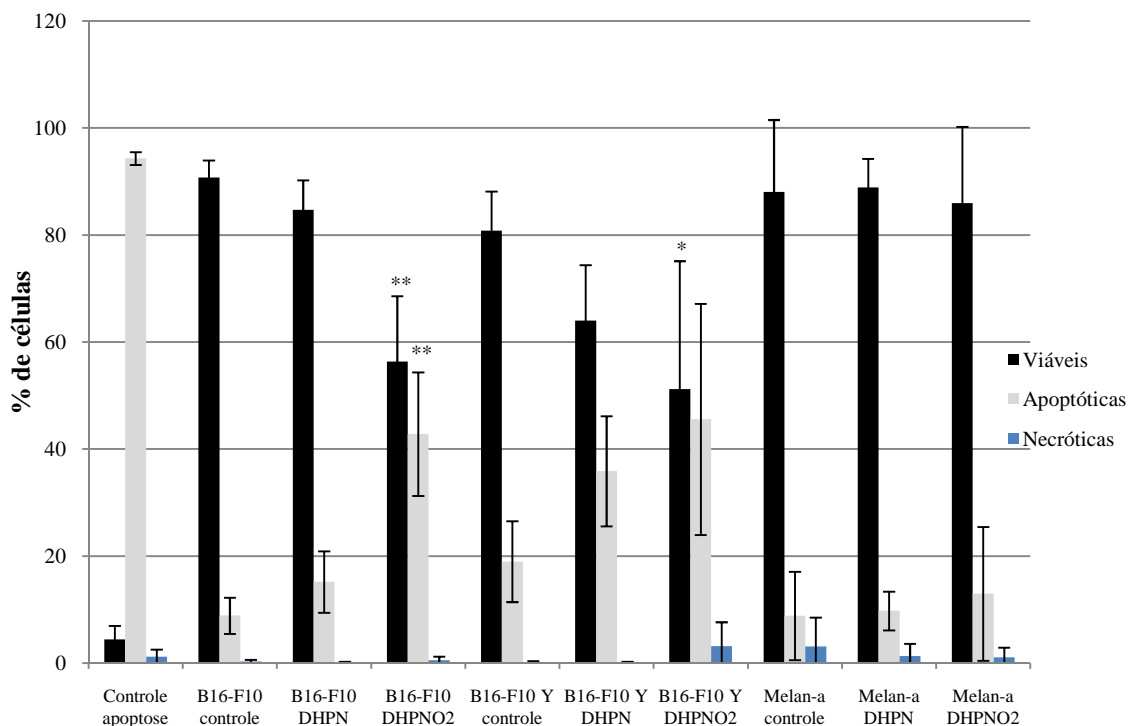


FIGURA 16: Contagem relativa das células coradas com laranja de acridina e brometo de etídio.

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: Teste realizado após 2 horas de incubação com 10 mmol/L de DHPN e DHPNO₂. O controle utilizado foi meio RPMI 1640. O controle de apoptose foi tratamento com quercetina 10⁻⁴ g/mL por 24 horas em células B16-F10 (ZHANG *et al.*, 2005). Resultados representam média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes, feitos em triplicata. * p < 0,05; ** p < 0,01. As diferenças estatísticas mostradas são relativas às classificações dentro de cada grupo de células, B16-F10, B16-F10 Y e Melan-a.

A detecção de células apoptóticas por essa metodologia foi utilizada por Mamoon (2009), que avaliou o efeito da terapia fotodinâmica com verde de indocianina e radiação no infravermelho próximo (700 – 800 nm), com geração de ¹O₂ em células de melanoma humano Sk-Mel-28. Após 15 minutos de irradiação, os autores observaram a presença de 13% de células viáveis, 81% de células apoptóticas e 6% de necróticas. Nessas condições, a viabilidade determinada pelo método de Azul de Trypan foi de pouco mais de 10%. Pode-se considerar que o tratamento utilizado nesse estudo parece produzir mais ¹O₂ do que o gerado pelo endoperóxido na concentração de 10 mmol/L e, portanto, a quantidade de células com características de morte celular foi maior.

7.4. LIBERAÇÃO DO CITOCROMO C

A liberação do citocromo *c* é um achado importante, característica da morte por apoptose (SKULACHEV, 1998), e indica o envolvimento da mitocôndria e a perda de sua função.

O método utilizado para a determinação da liberação do citocromo *c* foi a dosagem deste pelo HPLC (PICKLO *et al.*, 1999) após a permeabilização seletiva da membrana plasmática utilizando digitonina (WATERHOUSE *et al.*, 2004; ARNOULT, 2008). A digitonina é uma saponina que interage com β -esteróis, como o colesterol que está presente em quantidade considerável na membrana plasmática, o que a torna suscetível à permeabilização por esse agente (DIAZ e STAHL, 1989). O efeito da digitonina foi monitorado utilizando-se o corante Azul de Trypan 0,4% p/v, na proporção de 1:10 (corante:amostra) (SANTOS, 2007).

O método de análise utilizado foi o proposto por Picklo (1999). Um cromatograma representativo da análise de uma amostra e do padrão de citocromo *c* é mostrado na figura 17, onde se observa que o citocromo *c* apresenta tempo de retenção de pouco mais de 13 minutos. É interessante ressaltar que esse método utiliza a fase móvel em pH ácido, que muda comprimento de onda de absorção do citocromo *c* de 410 nm (em pH neutro) para 393 nm, pois nessa condição, o pico de absorção é cerca de 50% maior, comparado à análise em pH neutro. (detalhe da figura 17).

A partir do cálculo da área de cada pico das amostras analisadas, calculou-se a concentração de citocromo *c* presente na amostra, que foi uniformizada pela determinação da quantidade de proteínas de cada amostra isoladamente. A concentração de citocromo *c* foi calculada pela medida da área do pico e comparada com a curva padrão, feita com padrão de citocromo *c* equino comercial nas concentrações que variaram de 0,1 a 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. O resultado corrigido foi expresso em picogramas de citocromo *c* por micrograma de proteína celular. Os valores estão demonstrados no gráfico da figura 18.

Após o tempo de tratamento, observou-se que as células B16-F10 tratadas com endoperóxido tiveram citocromo *c* liberado de suas mitocôndrias em quantidade significativa comparada com o controle.

As células com maior concentração de melanina (B16-F10 Y), após o tratamento com endoperóxido não mostraram diferença em relação ao seu respectivo controle. Porém, as células controle desse grupo apresentaram maior quantidade de

citocromo *c* liberado no citoplasma quando comparadas com as não estimuladas, sendo que essa diferença também foi significativa. Isso pode ser devido ao fato da maior produção de espécies radicalares durante a síntese de melanina e da saída dessas substâncias pela estrutura do melanosomo alterada, como já exposto anteriormente no item 7.2. Nas três condições de tratamento desse grupo celular, a quantidade de citocromo *c* liberado foi estatisticamente igual.

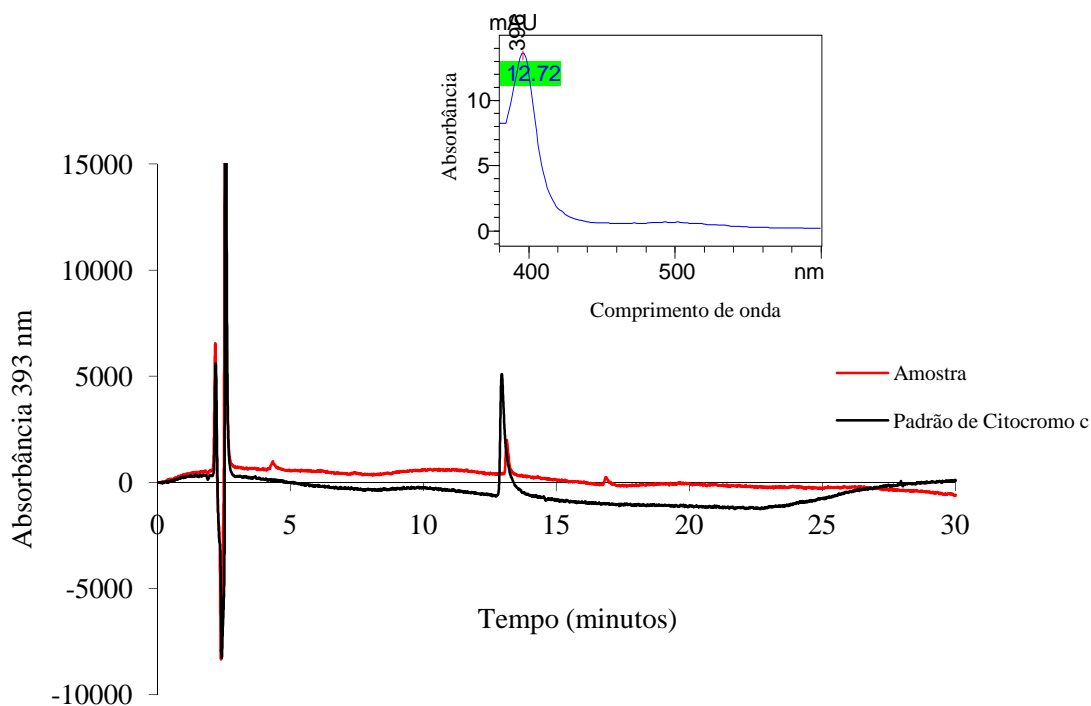


FIGURA 17: Cromatograma da análise de citocromo *c* de uma amostra de células

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: Na mesma figura está representado o cromatograma de uma amostra celular (em vermelho) e de uma solução do citocromo *c* 2,5 ng/μL. Nas condições analisadas, o tempo de retenção do citocromo *c* é cerca de 13 minutos. Em detalhe, o espectro de absorção entre 380 e 600 nm, mostrando a alta absorção em 393 nm.

Os valores de citocromo *c* liberado foram estatisticamente iguais após o tratamento com endoperóxido nas duas condições de tratamento das células B16-F10 (com e sem estímulo de melanogênese).

Nas células Melan-a, não houve alteração nesse parâmetro, sendo os valores encontrados equivalentes ao controle da célula B16-F10.

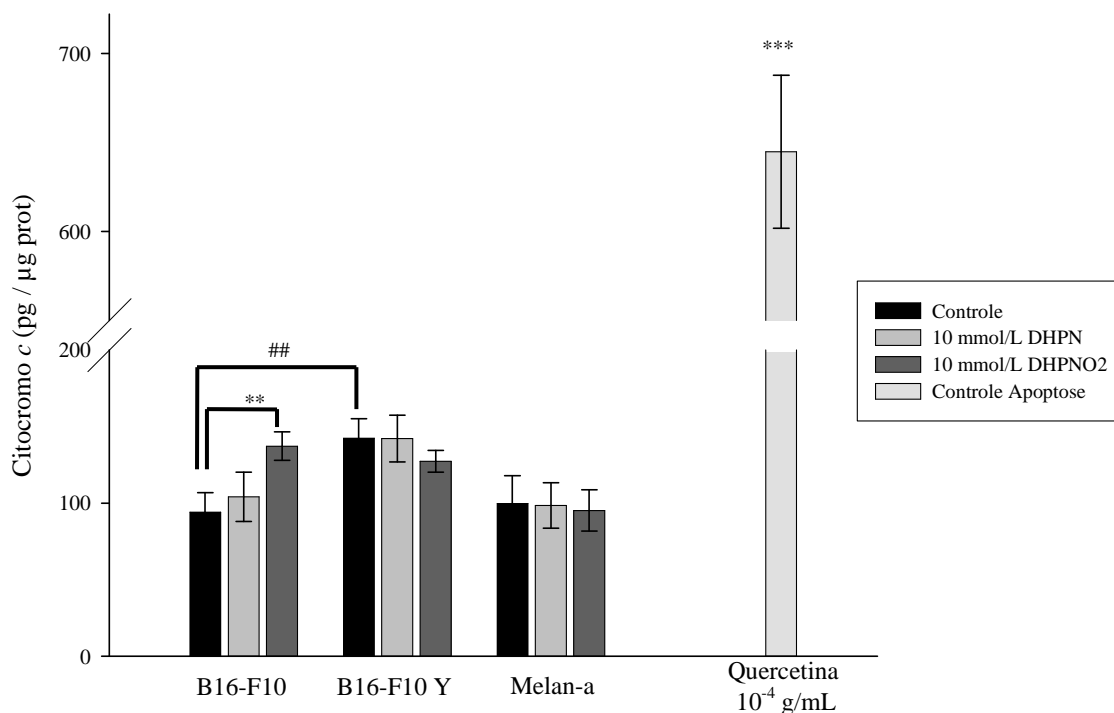


FIGURA 18: Determinação da quantidade de citocromo *c* liberado nas células.

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: Teste realizado após tratamento por 2 horas com 10 mmol/L de DHPN e DHPNO₂. O controle utilizado foi meio RPMI 1640. O controle positivo utilizado para apoptose foi em B16-F10 tratadas com quercetina 10⁻⁴ g/mL por 24 horas. O resultado foi expresso em média ± desvio padrão de dois experimentos independentes em duplicata, sendo que a concentração de citocromo *c* encontrada foi normalizada pela concentração de proteínas de cada amostra. ** p < 0,01 e *** p < 0,001 em relação aos respectivos controles. ## p < 0,01 em relação às células B16-F10 controle sem estímulo.

A liberação do citocromo *c* pelo ¹O₂ já foi avaliada anteriormente. Otsu *et al.* (2005) demonstraram que o tratamento de células de hepatoma humano (HepG2) com outro tipo de endoperóxido gerador de oxigênio singlete também causou liberação de citocromo *c* de forma considerável. O mecanismo mais provável para esse fenômeno pode ser a reação de lipoperoxidação da cardiolipina, que é um fosfolípido presente em grande quantidade na membrana interna mitocondrial, pelo ¹O₂ (e de outras espécies reativas) (SHIDOJI *et al.*, 1999). Esse fosfolípido é rico em ácido linoleico, um ácido graxo insaturado, que pode ser alvo da ação do ¹O₂. O citocromo *c* está ancorado à membrana interna graças à interação com a cardiolipina, sendo que a interação pode ser desfeita pela oxidação desta (PETROSILLO; RUGGIERO e PARADIES, 2003; OTSU *et al.*, 2005). Assim, o citocromo *c* pode ser liberado no citoplasma e atuar na ativação da apoptose, pela formação do apoptossomo (BOATRIGT e SALVESEN, 2003). Essa

avaliação poderia ser feita pela determinação da oxidação da cardiolipina, que comprovaria a liberação do citocromo *c*.

7.5. FRAGMENTAÇÃO DO DNA

Em alguns tipos de morte celular, a fragmentação do DNA é um marco característico. No caso da apoptose, ocorre a formação de fragmentos chamados nucleossomais (com múltiplos de cerca de 200 pares de bases), em que ocorre a quebra da dupla fita de DNA por endonucleases entre os nucleossomos, unidades fundamentais na formação da cromatina, formados pelas histonas e DNA envolto nessas proteínas. Na necrose, como ocorre ruptura de membranas e extravasamento de enzimas proteolíticas, estas degradam as histonas e as endonucleases clivam a fita de DNA em sítios inespecíficos, formando um arraste em gel de agarose (POTTEN e WILSON, 2004).

A análise de fragmentação do DNA foi avaliada pela eletroforese em gel de agarose. Nas células B16-F10 tratadas com o endoperóxido por 2 horas não foi detectada fragmentação de DNA através dessa análise (figura 19). O mesmo resultado foi observado após 24 horas do tratamento com o endoperóxido (figura 20).

Em relação às células que foram estimuladas à produção de melanina, o perfil de fragmentação do DNA parece o de necrose, que pode ser observado inclusive no controle e aparentemente não muda com o tratamento com DHPNO₂. As quebras inespecíficas no DNA dessas células podem ser explicadas novamente pela formação e vazamento dos radicais intermediários da síntese de melanina (BOROVANSKÝ; MIREJOVSKÝ e RILEY, 1991).

As células Melan-a não sofreram alteração da fragmentação do DNA após ação do ¹O₂, assim como a linhagem B16-F10 sem estímulo.

Os mesmos autores que avaliaram a liberação de citocromo *c* após tratamento com endoperóxido (OTSU *et al.*, 2005), também constataram que não houve fragmentação do DNA na morte celular causada pelo ¹O₂ em células derivadas de leucemia basofílica murina (RBL), mesmo após 15 horas do tratamento de 2 horas com o endoperóxido. Em conjunto com os resultados sobre a liberação do citocromo *c* e da ativação das caspases, esses autores sugerem que o ¹O₂ seja capaz de alterar a estrutura tridimensional do citocromo *c*, impedindo que ele forme o apoptossomo, juntamente com a pro-caspase-9. Uma das principais alterações ocorre na metionina-80, que coordena com o ferro do grupo heme (SUTO *et al.*, 2005). A reação com o ¹O₂ desfaz a

interação entre a metionina e o ferro, alterando a estrutura terciária do citocromo *c* que compromete a ativação da via da apoptose clássica. Além disso, essa mudança conformacional deixa o grupo heme exposto, o que aumenta a atividade de peroxidase do citocromo *c*. Isso favorece a peroxidação da cardiolipina e a liberação dele para o citoplasma (GODOY *et al.*, 2009).

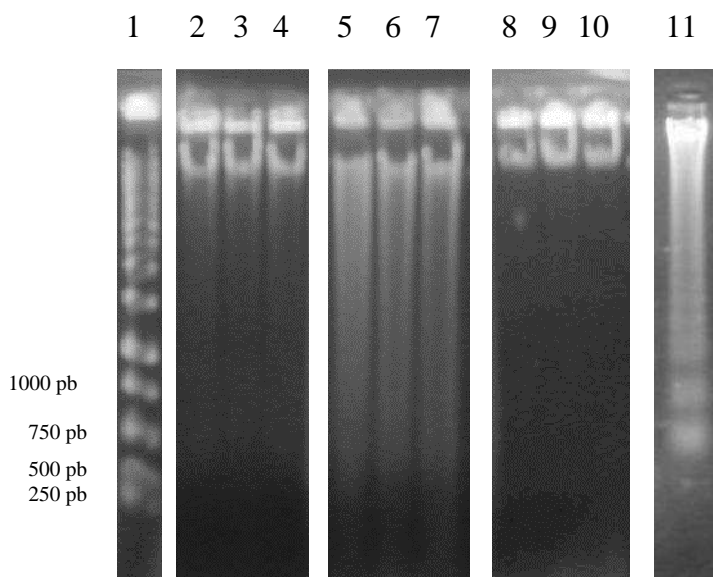


FIGURA 19: Análise da fragmentação do DNA em gel de agarose após 2 horas de tratamento.

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: Para cada amostra foram aplicados 10 µg de DNA. Gel corado com brometo de etídio. Gel representativo de 3 experimentos independentes realizados em duplicata para cada amostra. Nesse teste o controle foi meio RPMI 1640 e o controle positivo de apoptose foi feito com arsenito de sódio 2 µmol/L e menadiona 10 µmol/L por 24 horas em B16-F10 (CHOWDHURY *et al.*, 2009). 1 – Marcador de pares de bases; 2 – B16-F10 controle; 3 – B16-F10 10 mmol/L DHPN; 4 – B16-F10 10 mmol/L DHPNO₂; 5 – B16-F10 Y controle; 6 – B16-F10 Y 10 mmol/L DHPN; 7 – B16-F10 Y 10 mmol/L DHPNO₂; 8 – Melan-a controle; 9 – Melan-a 10 mmol/L DHPN; 10 – Melan-a 10 mmol/L DHPNO₂; 11 – Controle positivo de apoptose (arsenito de sódio 2 µmol/l e mendiona 10 µmol/L por 24 horas) em B16-F10. As bandas do marcador de pares de bases variaram de 10.000 a 250 pares de bases, sendo que os fragmentos de menor massa estão representados no gel.

A incapacidade do citocromo *c* em formar o apoptossomo e consequentemente ativar as caspases pode explicar a ausência de fragmentação característica da apoptose. Existe uma endonuclease chamada CAD (do inglês, *Caspase-Activated DNase*, ou DNase Caspase-Ativada) que torna-se ativa após a clivagem do seu inibidor, o ICAD (Inibidor da CAD) pela caspase-3 (JÄNICKE *et al.*, 1998). Se esta não pode ser ativada pelo apoptossomo, não ocorrerá a ativação da endonuclease.

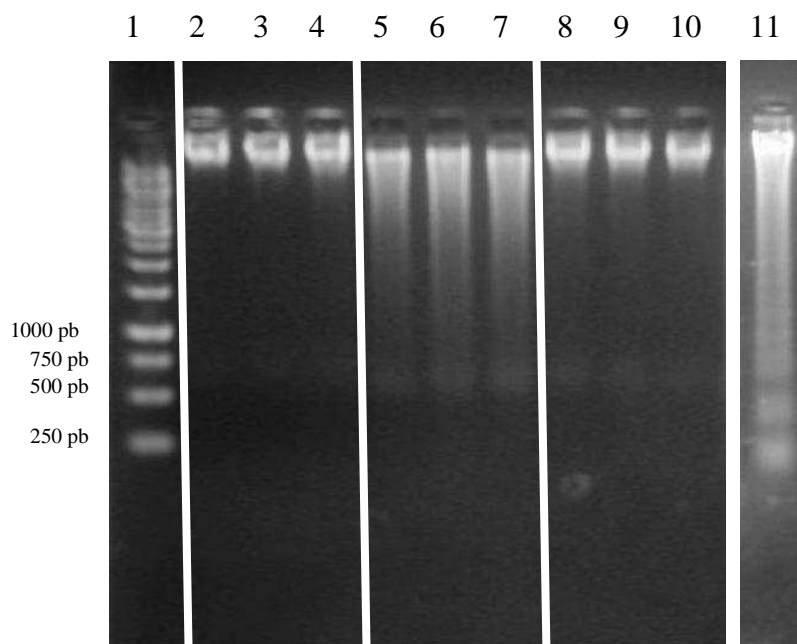


FIGURA 20: Análise da fragmentação do DNA em gel de agarose após 24 horas.

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: Para cada amostra foram aplicados 10 μ g de DNA. Gel corado com brometo de etídio. Gel representativo de 2 experimentos independentes realizados em duplicata para cada amostra. Nesse teste o controle foi meio RPMI 1640 e o controle positivo de apoptose foi feito com arsenito de sódio 2 μ mol/L e menadiona 10 μ mol/L por 24 horas em B16-F10 (CHOWDHURY *et al.*, 2009). 1 – Marcador de pares de bases; 2 – B16-F10 controle; 3 – B16-F10 10 mmol/L DHPN; 4 – B16-F10 10 mmol/L DHPNO₂; 5 – B16-F10 Y controle; 6 – B16-F10 Y 10 mmol/L DHPN; 7 – B16-F10 Y 10 mmol/L DHPNO₂; 8 – Melan-a controle; 9 – Melan-a 10 mmol/L DHPN; 10 – Melan-a 10 mmol/L DHPNO₂; 11 – Controle positivo de apoptose (arsenito de sódio 2 μ mol/l e mendiona 10 μ mol/L por 24 horas) em B16-F10. As bandas do marcador de pares de bases variaram de 10.000 a 250 pares de bases, sendo que os fragmentos de menor massa estão representados no gel.

7.6. QUANTIFICAÇÃO DO ADP E ATP INTRACELULARES

As concentrações de ADP e ATP foram determinadas por HPLC e as áreas foram plotadas na curva padrão construída pela utilização de ATP e ADP comerciais em concentrações que variaram de 5 a 500 μ mol/L. Um cromatograma representativo obtido de uma amostra está mostrado na figura 21, que também mostra o cromatograma sobreposto da mesma amostra contaminada com um padrão de ADP. Os picos de cada nucleotídeo estão identificados no cromatograma, sendo que o ADP tem tempo de retenção de cerca de 5,5 minutos e o ATP de 7 minutos. No detalhe da figura 21, o espectro característico dos dois nucleotídeos, com o pico de absorvância em 260 nm característico da base nitrogenada adenina presente nos dois compostos.

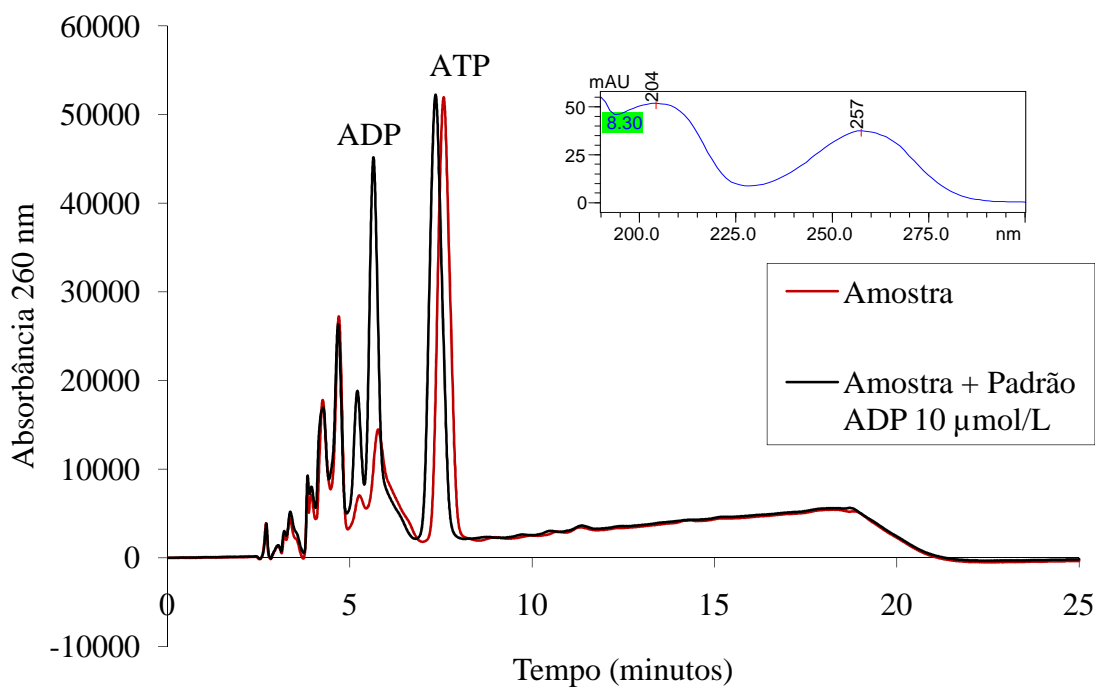


FIGURA 21: Cromatograma da análise de ADP e ATP por HPLC.

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: No mesmo gráfico está representado o cromatograma de uma amostra celular e o da mesma amostra contaminada com ADP comercial, mostrando o aumento dos dois picos em 5 minutos. Os dois picos foram integrados para a determinação da quantidade de ADP.

O resultado da razão entre ADP e ATP para as células está expresso na figura 22 e mostra que não houve diferença estatística com os respectivos controles após o tratamento com $DHPNO_2$ para nenhum dos grupos.

Alguns autores consideram a medida da razão ADP/ATP como um indicativo da situação metabólica da célula, sendo que os valores da razão abaixo de 0,11 representam células viáveis e proliferativas, entre 0,11 e 1,0 células em apoptose e quando em necrose, valores acima de 15 (BRADBURY *et al.*, 2000). Porém, as células B16-F10 estimuladas e não estimuladas, inclusive seus controles apresentaram razões acima de 0,11, indicando aumento na concentração de ADP e/ou diminuição na de ATP.

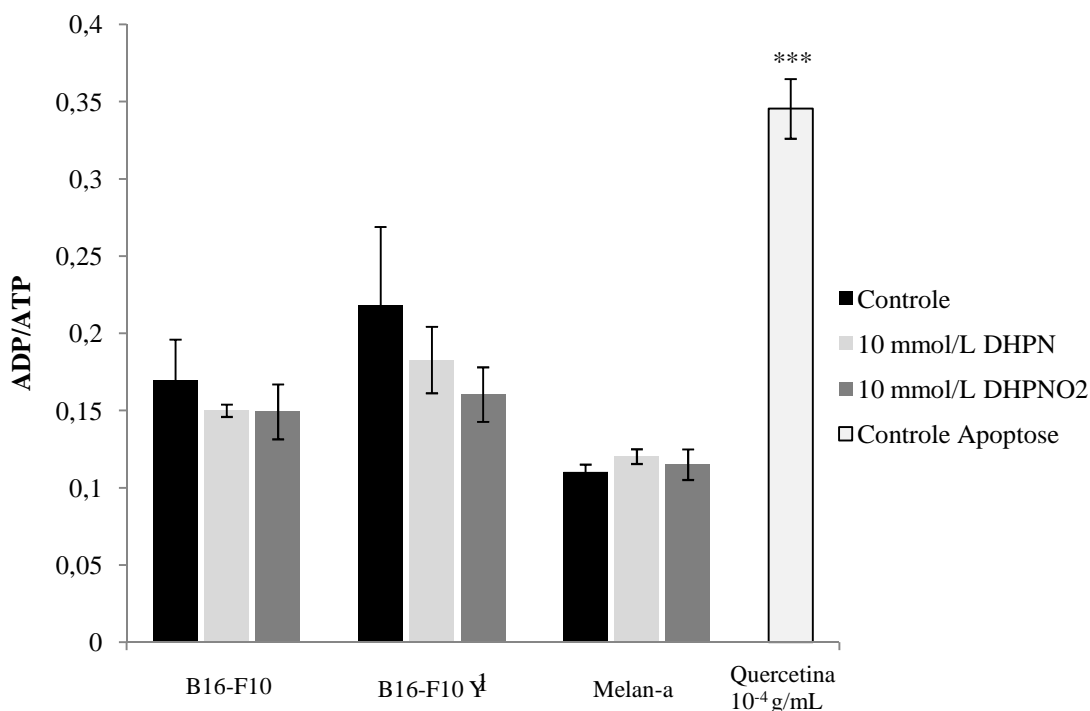


FIGURA 22: Relação ADP/ATP das células tratadas com endoperóxido.

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: Teste realizado após 2 horas de tratamento. O controle foi meio RPMI 1640 e o controle positivo para apoptose foi a quercetina 10^{-4} g/mL por 24 horas em células B16-F10. A determinação das concentrações de ADP e ATP foram feitas por HPLC e a razão obtida pela divisão das concentrações. O resultado representa a média \pm desvio padrão de 2 experimentos independentes em duplicata. *** $p < 0,001$.

Chiu *et al.* (2007) realizaram um trabalho em que foi avaliado o transcriptoma das células de melanoma murino B16-F1, que são precursoras das B16-F10, e perceberam que algumas vias metabólicas apresentam baixa regulação nessas células. Dentre essas vias está a síntese de ATP pela mitocôndria. Além dessa, está a biossíntese de componentes da cadeia de transporte de elétrons, das enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico e do metabolismo do piruvato, sendo que todas essas vias estão localizadas na mitocôndria.

É conhecido também um fenômeno interessante que ocorre nas células tumorais, que é o efeito Warburg, em que as células utilizam preferencialmente a glicólise como fonte de produção energética, apesar de ser uma via com menor rendimento de moléculas de ATP comparada com a fosforilação oxidativa (HSU e SABATINI, 2008; VANDER HEIDEN; CANTLEY e THOMPSON, 2009).

Com isso, é possível explicar o valor da razão elevada inclusive nas células controle de B16-F10. Além disso, sabe-se que nas células tumorais em geral, inclusive nas de melanoma (UGUREL *et al.*, 2005), a isoenzima piruvato quinase tipo M2 está

presente em maior quantidade na forma dimérica. A enzima tipo M2 está presente em células proliferativas e em células tumorais, porém nas primeiras, a forma tetramérica é predominante e nas últimas, a forma dimérica (MAZUREK *et al.*, 2005). Essa enzima é a última da via glicolítica, responsável pela formação irreversível de piruvato a partir do fosfoenolpiruvato, com formação de ATP pela remoção dos grupos fosfato do substrato (NELSON e COX, 2008). A forma dimérica tem baixa afinidade pelo fosfoenolpiruvato, e fica inativa em concentrações fisiológicas do substrato. Portanto, já que as células tumorais apresentam a isoenzima dimérica em maior quantidade, a formação de ATP por essa via também fica comprometida. Apesar de parecer deletério para a célula, esse fenômeno garante o fornecimento dos intermediários da via glicolítica para vias sintéticas, com produção de aminoácidos, nucleotídeos, entre outros, contribuindo para o crescimento tumoral (MAZUREK *et al.*, 2005; VANDER HEIDEN *et al.*).

Apesar de não haver diferença estatística, as células controle do grupo B16-F10 estimuladas mostraram um valor da razão mais elevado que o controle sem estímulo. Vale lembrar que nestas células, a síntese aumentada da melanina aumenta a formação e liberação de intermediários tóxicos para a célula, que podem interferir ainda mais na produção energética da célula (BROOKES *et al.*, 2004).

As células que produziram mais melanina e que foram tratadas com o endoperóxido mostraram a tendência de diminuir a razão ADP/ATP, chegando próximo a valores de células viáveis e em proliferação. Pode-se considerar a hipótese de que o $^1\text{O}_2$ reaja com os intermediários reativos da síntese de melanina e estes fiquem indisponíveis para causar os danos observados no grupo controle, que tem a razão mais elevada (apesar de não ser diferente estatisticamente). Sem a ação desses intermediários, a célula poderia se recuperar e com isso a razão ADP/ATP diminuiria. Outra hipótese para explicar a aparente proteção contra o $^1\text{O}_2$ é a neutralização dessa ROS pela melanina. Porém, se esse fosse o caso, a razão ADP/ATP permaneceria no mesmo nível do controle, pois a melanina anularia qualquer efeito do $^1\text{O}_2$ sobre a célula.

7.7. LIBERAÇÃO DE AIF DA MITOCÔNDRIA

O fator de indução da apoptose (AIF) é considerado uma importante proteína durante a morte independente de caspases.

A determinação da quantidade liberada pela mitocôndria foi avaliada pela técnica de *Western Blotting*, sendo que foi utilizada uma fração obtida pela permeabilização da membrana plasmática com digitonina. Após a revelação da membrana utilizando-se um kit de quimioluminescência, obtiveram-se os resultados que estão expressos na figura 23.

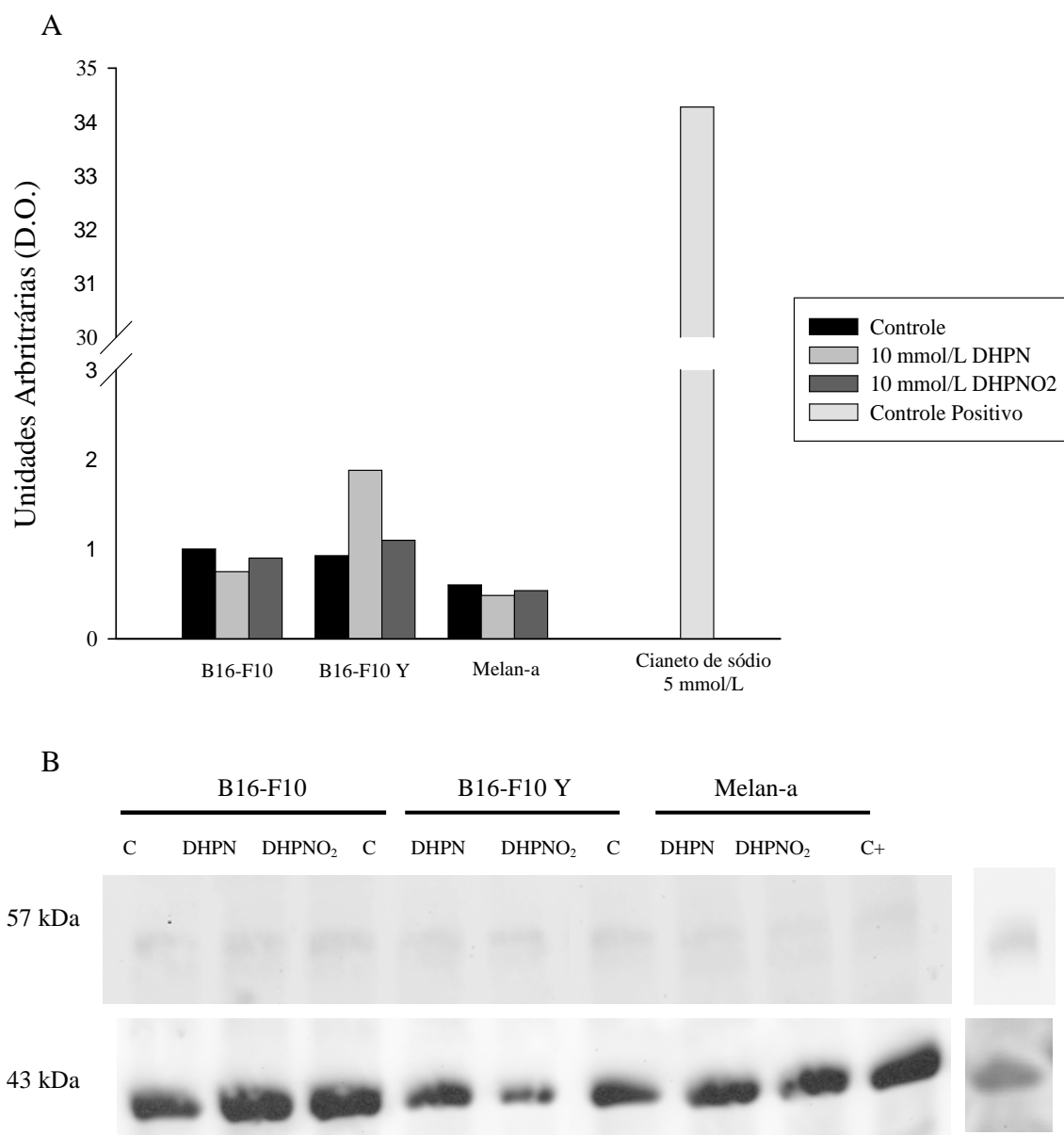


FIGURA 23: Liberação de AIF para o citoplasma.

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: A - No gráfico está representada a razão da densidade óptica das bandas de AIF com as da actina de cada amostra. O gráfico representa a média de 2 experimentos independentes. B - *Western blot* representativo, mostrando a marcação das proteínas AIF (57 kDa) e actina (43 kDa).

O gráfico mostra que em todos os grupos não há diferença significativa na liberação de AIF após as 22 horas de tratamento com DHPNO₂.

O controle positivo utilizado foi cianeto de sódio na concentração de 5 mmol/L por 1,5 hora em tampão Krebs-Henseleit (118 mmol/L NaCl; 4,8 mmol/L KCl; 2,5 mmol/L CaCl₂; 1,2 mmol/L KH₂PO₄; 1,2 mmol/L MgSO₄; 25 mmol/L NaHCO₃) a 37°C. O cianeto é um inibidor do complexo citocromo oxidase, ou complexo IV, e impede a transferência de elétrons e a síntese de ATP (NELSON e COX, 2008). Já foi descrito que nessas condições, a concentração de ATP cai para menos de 5% do controle (SCHWARTZ *et al.*, 1999). Nessa concentração tão baixa, as células morrem por necrose, já que suas mitocôndrias perdem rapidamente o potencial de membrana, incham se rompem, liberando seu conteúdo, inclusive AIF (LIEBERTHAL; MENZA e LEVINE, 1998).

A liberação do AIF parece depender não somente da abertura de poros na membrana externa, mas também da clivagem do AIF do sítio de ancoramento. A proteína está ligada à membrana interna mitocondrial com o domínio oxidorreductase exposto para o espaço inter-membranas. Mostrou-se que a remoção do AIF ocorre graças a uma protease que deve ser ativada após algum estímulo apoptótico (OTERA *et al.*, 2005). Alguns autores sugerem que essa protease seja um grupo de enzimas chamadas de calpaínas, que são ativadas pelo aumento da concentração de cálcio citoplasmático (POLSTER *et al.*, 2005). Também é defendido que a liberação do AIF somente ocorre após a ativação das caspases (ARNOULT *et al.*, 2003). Porém, tanto as calpaínas como as caspases são cisteína proteases, e já foi demonstrado que o ¹O₂ é capaz de inativar essas proteínas pela oxidação da cisteína no sítio ativo (SUTO *et al.*, 2007). Portanto, isso poderia explicar a ausência da liberação do AIF nas células.

Além disso, a saída do AIF da mitocôndria pode ser bloqueada pela ação de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, que dificultariam a formação do poro na membrana externa (OTERA *et al.*, 2005). A alta expressão de Bcl-2 já foi descrita anteriormente em células de melanoma (HAKANSSON *et al.*, 2003).

7.8. FLUXOS DE CÁLCIO

O cálcio é um íon abundante na célula e participa em diversas vias de sinalização. Por isso, sua quantidade no citoplasma pode influenciar o metabolismo da célula. Em melanócitos, as concentrações de cálcio citoplasmático e intracelular podem ser alteradas pela presença de maior quantidade de melanina, sendo que esta se liga ao cálcio e evita a presença do íon em grande quantidade no citoplasma, onde pode agir em muitas vias de sinalização (HOOGDUIJN *et al.*, 2003).

O efeito do $^1\text{O}_2$ sobre o cálcio foi avaliado utilizando-se o microscópio confocal invertido do Instituto de Química da USP em São Paulo. Nesse teste, as células, após serem plaqueadas e tratadas ou não com tirosina e NH_4Cl , foram incubadas com fluo-4 (figura 24), que é uma probe que se liga ao cálcio e fluoresce.

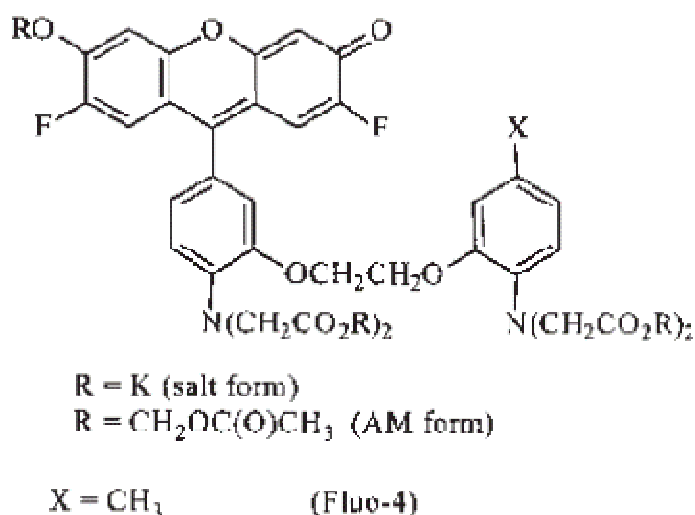


FIGURA 24: Estrutura do fluo-4.

FONTE: Gee (2000).

NOTA: A figura representa os substituintes para a forma de sal (*salt form*) e para a forma de éster (*AM form*), sendo a última a utilizada para o teste.

A análise foi feita por 700 segundos, sendo que a fluorescência era capturada a cada 5 segundos. A figura 25 mostra o resultado obtido para o tratamento com o endoperóxido. O teste também foi realizado com o naftaleno DHPN (figura 26).

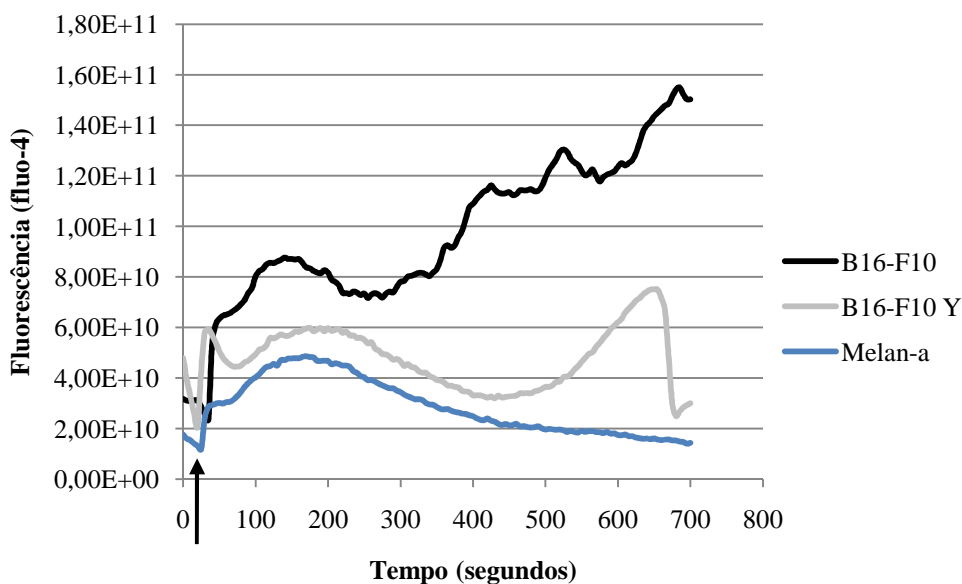


FIGURA 25: Fluorescência relativa ao aumento de cálcio citoplasmático sob tratamento com DHPNO₂.
 FONTE: O Autor (2010).

NOTA: Resultado após tratamento com 10 mmol/L de endoperóxido. A seta indica o momento da adição do endoperóxido (em 45 segundos após a captação basal da fluorescência).

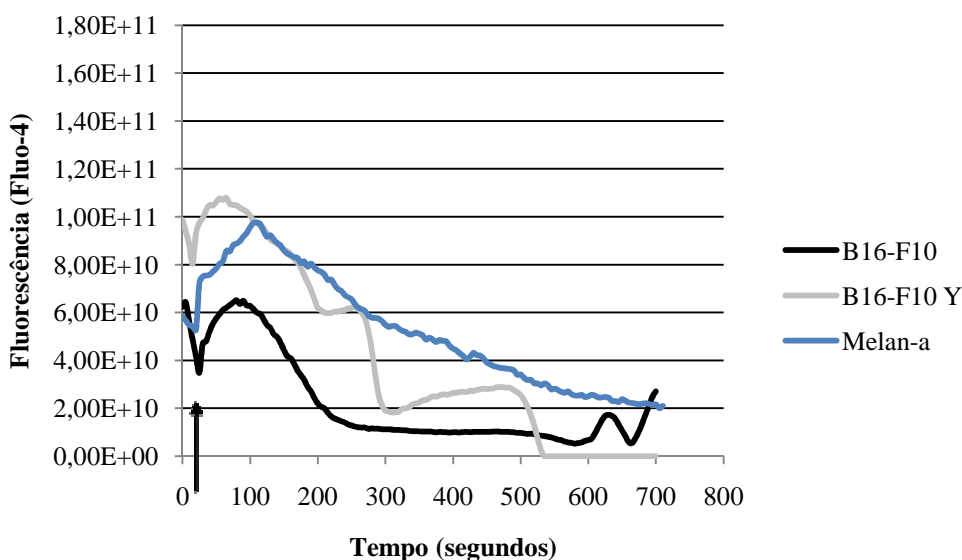


FIGURA 26: Fluorescência relativa ao aumento de cálcio citoplasmático sob tratamento com DHPN.
 FONTE: O Autor (2010).

NOTA: Resultado após tratamento com 10 mmol/L de DHPN. A seta indica o momento da adição do endoperóxido (em 45 segundos após a captação basal da fluorescência).

Os gráficos foram obtidos pela captação da fluorescência como pode ser observada na figura 27.

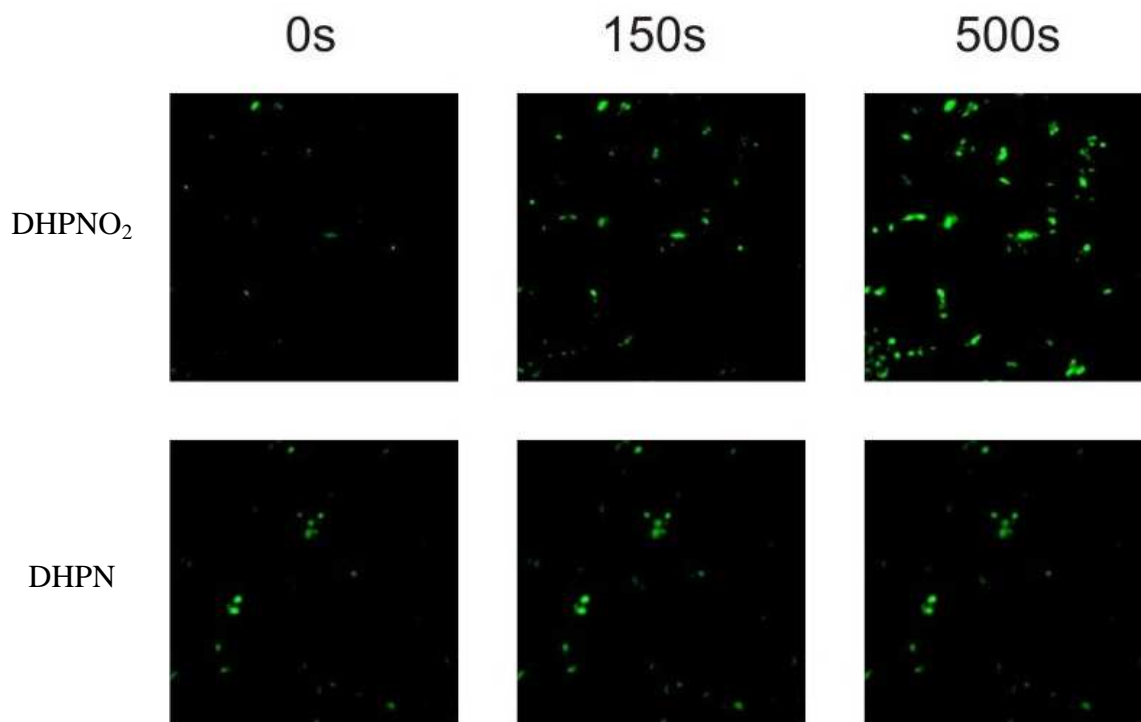


FIGURA 27: Fluorescência emitida pelas células B16-F10 não estimuladas no decorrer do tempo.

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: É possível observar que ao passar do tempo, a fluorescência aumenta nas células B16-F10 tratadas com DHPNO₂.

Após a adição do endoperóxido, ocorre aumento na fluorescência, indicando que o cálcio que estava armazenado em organelas foi liberado para o citoplasma e se ligou ao fluo-4. O aumento da fluorescência foi maior nas células B16-F10 sem estímulo para melanogênese. Nas células que foram estimuladas, a amplitude de aumento da fluorescência, comparada com a fluorescência basal (antes da adição do endoperóxido) foi menor, assim como nas células de melanócito Melan-a.

A presença de maior quantidade de melanina nos melanosomos das células B16-F10 Y parece ter captado o cálcio liberado para o citoplasma, enquanto que a menor concentração do pigmento das células não estimuladas permitiu a permanência do íon no citoplasma.

As células Melan-a parecem não ter sofrido com a ação do ¹O₂ em relação à liberação de cálcio. Isso pode estar relacionado à concentração de melanina nessas células que é levemente superior às B16-F10 não estimuladas e também pode indicar que nessas células o controle do fluxo de cálcio seja mais eficiente que nas células de melanoma.

A incubação com o DHPN mostrou que não houve aumento significativo na fluorescência em nenhuma das linhagens testadas. De fato, a fluorescência diminuiu. Isso não indica necessariamente que o cálcio saiu do citoplasma no decorrer do teste. Uma provável explicação para esse acontecimento pode ser o fato de que as células estavam incubadas em um tampão que não era rico em nutrientes, e um laser de alta intensidade estava sendo incidido sobre as células a cada cinco segundos. Esses dois fatores em conjunto podem ter afetado a integridade das células e isso reflete a queda na fluorescência. Esse efeito também pode ter acontecido nas células tratadas com endoperóxido, mostrando que o aumento na fluorescência poderia ter sido maior do que o observado.

Hoogduijn *et al.*, (2004) obteve resultados semelhantes quando melanócitos com maior e menor quantidade de melanina foram tratados com peróxido de hidrogênio como indutor da liberação de cálcio. Os melanócitos hiperpigmentados tiveram menor aumento na fluorescência, o que indica que a melanina captou o cálcio. Essa característica já havia sido observada por outros autores (SALCEDA e SÁNCHEZ-CHÁVEZ, 2000; HOOGDUIJN *et al.*, 2003; HOOGDUIJN *et al.*, 2004), que indicaram um forte efeito da melanina e do melanossomo sobre a homeostase do cálcio. Esses autores mostraram que a presença da melanina protege a célula dos efeitos danosos do aumento súbito da concentração citoplasmática de cálcio, incluindo o efeito na morte celular.

O aumento do cálcio citoplasmático é capaz de formar o poro de transição mitocondrial que causa a liberação do citocromo *c* e outras proteínas mitocondriais. O citocromo *c*, além de ativar a apoptose pela formação do apoptossomo, é capaz de liberar mais cálcio do retículo endoplasmático (BERGNER e HUBER, 2008). A ligação de pequena quantidade de citocromo *c* a receptores inositol-1,4,5-trifosfato (InsP₃) promove a condutância de cálcio por esses receptores (MATTSON e CHAN, 2003).

Fisiologicamente, a concentração de cálcio citoplasmático vindo de organelas pode ser controlada por duas maneiras: através da geração de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), um importante segundo mensageiro ou por receptores de rianodina, que foram identificados primeiramente como canais que liberavam cálcio do retículo sarcoplasmático, tanto de células musculares cardíacas, quanto esqueléticas. Sabe-se agora que esses receptores também são encontrados em melanócitos humanos e influenciam a liberação de cálcio para o citoplasma nessas células (KANG *et al.*, 2000).

A liberação do cálcio pela ação do $^1\text{O}_2$ em células também tem sido investigada utilizando fotossensibilização. O fotossensibilizador *9-capronyloxytetrakis (methoxyethyl) porphycene* causa danos diretos no retículo endoplasmático com consequente liberação de cálcio (KESSEL; CASTELLI e REINERS, 2005). A utilização do fotossensibilizador rosa bengala parece favorecer a liberação do cálcio do retículo endoplasmático, já que foi demonstrada a localização desse corante na região perinuclear de queratinócitos, próximo ao complexo de Golgi e ao retículo, onde ocorreria a maior produção de $^1\text{O}_2$ (HE *et al.*, 2008).

8. DISCUSSÃO FINAL

Este trabalho avaliou o efeito do $^1\text{O}_2$ em parâmetros de morte celular nas células produtoras de melanina das linhagens B16-F10 (melanoma murino) e Melan-a (melanócito murino), assim como o efeito da produção da melanina em maior quantidade nas B16-F10.

A síntese da melanina teve efeito deletério sobre as células B16-F10 quando se compara os resultados com as células B16-F10 não estimuladas. Percebeu-se que o DNA foi fragmentado (mostrando perfil de fragmentação de células em necrose), houve mais liberação de citocromo *c* e tendência de aumento da razão ADP/ATP, e, em geral, as células apresentaram mais características de apoptose pelo teste de avaliação com laranja de acridina e brometo de etídio. Pode-se levantar a hipótese de que esses efeitos ocorreram pela estrutura anormal dos melanossomos nas células B16-F10, que causa o vazamento de compostos intermediários da síntese da melanina que são radicais livres bastante reativos (BOROVANSKÝ; MIREJOVSKÝ e RILEY, 1991), o que ocorreria em maior intensidade em uma condição de melanogênese estimulada.

É curioso imaginar como as células B16-F10 sobrevivem após a formação dos intermediários tóxicos da síntese de melanina aumentada, e após os efeitos que eles causam na célula. Mesmo as células de melanócitos, quando comparadas com queratinócitos mostram mais quebras no DNA, pelo ensaio cometa (HOOGDUIJN *et al.*, 2004) Um trabalho conduzido por Souza e col., 2006 mostrou diminuição da expressão de algumas proteínas relacionadas à neutralização de ROS, e aumento de outras proteínas que são expressas em resposta à ação do H_2O_2 em células de melanoma murino Tm1 e Tm5 (derivadas da célula Melan-a). Dentre as proteínas com maior expressão, destaca-se a nucleofosmina, que além dessas linhagens, já foi descrita ter elevada expressão em outras células de melanoma e em biópsias de melanoma humano (BERNARD *et al.*, 2003). Esta proteína é um repressor da atividade de p53, um supressor tumoral. A ativação de p53 ocorre após dano em DNA, que pode ocorrer pela ação de ROS. p53 é capaz de parar o ciclo celular para que ocorra o reparo do dano no DNA ou pode induzir a célula a entrar em apoptose (se o dano não puder ser corrigido) e evitar que o erro no código genético perdure (POTTEN e WILSON, 2004). Com o aumento da expressão da nucleofosmina, um repressor de p53, as células conseguem evitar a correção do erro no DNA, manter a viabilidade e não serem eliminadas pelo processo de apoptose. Isso pode contribuir para o entendimento da resistência ao

tratamento com o $^1\text{O}_2$ e com outros tratamentos, inclusive quimioterapia, radioterapia que são baseados na formação de ROS (WANG e YI, 2008).

Por outro lado, como já descrito, a melanina tem efeito protetor sobre a ação de ROS (RÓZANOWSKA *et al.*, 1999). A melanina conferiu certa proteção às células estimuladas e tratadas com endoperóxido, quando comparado com seu controle. Isso pôde ser averiguado pela viabilidade, sendo que a diferença da viabilidade entre 2 e 24 horas foi menor nas células com melanogênese estimulada quando comparada com as células B16-F10 não estimuladas. Os outros parâmetros avaliados também demonstram a tendência de proteção nas células que foram estimuladas para produção de melanina quando comparadas com seu controle em relação ao tratamento com $^1\text{O}_2$. O ensaio da liberação do citocromo *c* mostrou uma leve tendência de diminuição nas células tratadas com DHPNO₂, que também foi observada na determinação da razão ADP/ATP. O teste de fragmentação de DNA não mostrou diferenças visíveis. Porém, este não é um teste com alta sensibilidade para detectar pequenas diferenças, ao contrário dos outros testes que utilizaram técnicas mais sensíveis (análises de HPLC ou de microscopia). A liberação de cálcio para o citoplasma também foi menor nas células com mais melanina e tratadas com $^1\text{O}_2$. Mostra-se assim, que há proteção contra os efeitos do $^1\text{O}_2$ pela melanina ou pela própria condição de estímulo de sua síntese.

Em relação ao tipo de morte causado pelo $^1\text{O}_2$ nas células B16-F10, pode-se dizer que as características encontradas são semelhantes às encontradas em outras linhagens celulares tratadas com a mesma espécie reativa. Não foi possível averiguar fragmentação de DNA e houve liberação de citocromo *c* da mitocôndria (FUJII *et al.*, 2004; OTSU *et al.*, 2005). Além disso, a quantidade de cálcio liberado para o citoplasma foi parecida com o tratamento com peróxido de hidrogênio em melanócitos (HOOGDUIJN *et al.*, 2004). Alguns trabalhos citam o termo apoptose atípica para descrever a condição de morte causada pelo oxigênio singlete. Isso porque ocorre liberação de citocromo *c*, mas não ocorre fragmentação do DNA típica de apoptose e não há ativação das caspases (OTSU *et al.*, 2005). Essas são características da morte independente de caspases, que parece ser o caso das células tratadas nesse trabalho. A morfologia poderia ajudar na elucidação dessa questão, sendo que o aparecimento de vacúolos e agregados de ribossomos são características importantes da morte independente de caspases, que não aparecem na apoptose. A avaliação da perda do potencial de membrana também poderia ser uma diferença interessante, já que a perda do potencial é mais rápida na apoptose do que na morte independente de caspases.

Outro parâmetro importante é a análise da exposição da fosfatilserina na face externa da célula, que não ocorre na morte independente de caspases (TAIT e GREEN, 2008).

Além da hipótese da inativação das caspases pela reação com o $^1\text{O}_2$, foi verificado que as células de melanoma humano têm a expressão de Apaf-1 diminuída, o que poderia explicar a falha na ativação da apoptose e resistência ao tratamento (CAMPIONI *et al.*, 2005; ANICHINI *et al.*, 2006).

As células de melanoma mostram-se bastante complexas, mas a avaliação da morte celular frente a várias substâncias deve continuar para que se entendam melhor as particularidades dessa célula que parece apresentar mecanismos muito eficientes de prevenção da morte celular.

No caso da Melan-a, a hipótese da ocorrência de um dano oxidativo leve na enzima desidrogenase parece ser a hipótese mais plausível, já que nenhum parâmetro de morte celular foi observado. Sugere-se que a enzima perdeu a atividade (que resultou em diminuição na medida de viabilidade em relação ao controle no tratamento de 2 horas), e esse dano não foi suficiente para que a enzima fosse degradada. Assim, na análise da viabilidade em 24 horas, o resultado foi semelhante, indicando que a enzima não fora substituída (pois não fora degradada). O dano oxidativo não foi maior porque o meio de cultura foi substituído após o período de 2 horas da decomposição do endoperóxido. Então, durante as 22 horas restantes, a célula parece não ter sofrido nenhum outro dano que comprometesse sua integridade, e o valor da viabilidade não diminuiu significativamente, como ocorreu com as células B16-F10 estimuladas e não estimuladas.

9. CONCLUSÕES

O tratamento com DHPNO₂ 10 mmol/L diminui a viabilidade celular de maneira significativa nas células B16-F10 estimuladas e não estimuladas para a síntese de melanina e nas células Melan-a. Entretanto, apesar de ter sido identificada uma marcação de apoptose nas células B16-F10 após o tratamento pelo ensaio de microscopia com laranja de acridina/brometo de etídio e maior liberação de cálcio no citossol que poderia contribuir para disparar a resposta de morte celular, não foi possível caracterizar um quadro de apoptose clássica, pois o único parâmetro bioquímico que indicaria uma situação de apoptose foi a liberação do citocromo *c*, sendo que os demais parâmetros (fragmentação de DNA, razão ADP/ATP e liberação de AIF) não sofreram alterações.

Foi também possível observar que a condição de estímulo de melanogênese nas células B16-F10 altera o metabolismo celular, pois o DNA foi fragmentado (mostrando perfil de fragmentação de células em necrose), houve maior liberação de citocromo *c*, maior razão ADP/ATP e mais células características de apoptose pela avaliação com laranja de acridina e brometo de etídio em comparação com as células B16-F10 que não sofreram estímulo para produção de melanina. Além disso, essa condição celular parece conferir uma certa proteção em relação aos efeitos do ¹O₂.

Apesar da viabilidade das células de melanócito Melan-a ter diminuído com o tratamento com ¹O₂, os demais parâmetros avaliados não indicaram que essas células estivessem realmente numa situação de morte celular, isso indica que essas células são menos sensíveis aos efeitos do ¹O₂ e que, provavelmente, o tratamento afete a função da succinato desidrogenase mitocondrial, mas não o suficiente para comprometer a sobrevivência celular.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MALEK, Z., SWOPE, V. B., SUZUKI, I., *et al.* Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v.92, p.1789-1793. 1995.
- ABDEL, N. Differential effects on melanocyte growth and melanization of low vs. high calcium keratinocyte-conditioned medium. **British Journal of Dermatology**, v.140, n.1, p.50-55. 1999.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed. 2004. 1549 p.
- ANICHINI, A., MORTARINI, R., SENSI, M., *et al.* APAF-1 signaling in human melanoma. **Cancer Letters**, v.238, n.2, p.168-179. 2006.
- ANTIGNANI, A. e YOULE, R. J. How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? **Current Opinion in Biology**, v.18, p.685-689. 2006.
- ARNOULT, D. Mitochondrial fragmentation in apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v.17, n.1, p.6-12. 2007.
- _____. Apoptosis-associated mitochondrial outer membrane permeabilization assays. **Methods**, v.44, n.3, p.229-234. 2008.
- ARNOULT, D., GAUME, B., KARBOWSKI, M., *et al.* Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. **EMBO J**, v.22, n.17, p.4385-4399. 2003.
- BENNETT, D. C., COOPER, P. J. e HART, I. R. A Line of Non-Tumorigenic Mouse Melanocytes, Syngeneic with the B16 Melanoma and Requiring a Tumor Promoter for Growth. **International Journal of Cancer**, v.39, p.414-418. 1987.
- BERGNER, A. e HUBER, R. M. Regulation of the Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-Store in Cancer. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.8, p.705-709. 2008.
- BERNARD, K., LITMAN, E., FITZPATRICK, J. L., *et al.* Functional Proteomic Analysis of Melanoma Progression. **Cancer Res**, v.63, n.20, p.6716-6725. 2003.
- BERNARDI, P. e PETRONILLI, V. The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: A critical appraisal **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.28, n.2, p.131-138. 1996.
- BOATRIGT, K. M. e SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, p.725-731. 2003.
- BOROVANSKÝ, J. Free Radical Activity of Melanins and Related Substances: Biochemical and Pathobiochemical Aspects. **Sborník lékařský**, v.97, n.1, p.49-70. 1996.

- BOROVANSKÝ, J., MELEZÍNEK, I. e BUDĚŠÍNSKÁ, A. Interference of Melanin in Protein Determination. **Analytical Biochemistry**, v.159, p.249-252. 1986.
- BOROVANSKÝ, J., MIREJOVSKÝ, P. e RILEY, P. A. Possible Relationship Between Abnormal Melanosome Structure and Cytotoxic Phenomena in Malignant Melanoma. **Neoplasma**, v.38, n.4, p.393-400. 1991.
- BORTNER, C. D., OLDENBURG, N. B. E. e CIDLOWSKI, J. A. The role of DNA fragmentation in apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v.5, p.21-26. 1995.
- BRADBURY, D. A., SIMMONS, T. D., SLATER, K. J., *et al.* Measurement of the ADP:ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis. **Journal of Immunological Methods**, v.240, n.1-2, p.79-92. 2000.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254. 1976.
- BRENNER, M. e HEARING, V. J. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. **Photochemistry and Photobiology**, v.84, p.539-549. 2008.
- BROOKES, P. S., YOON, Y., ROBOTHAM, J. L., *et al.* Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.287, n.4, p.C817-833. 2004.
- BUSH, W. D. e SIMON, J. D. Quantification of Ca²⁺ binding to melanin supports the hypothesis that melanosomes serve a functional role in regulating calcium homeostasis. **Pigment Cell Research**, v.20, n.2, p.134-139. 2007.
- BUYTAERT, E., DEWAELE, M. e AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1776, p.86-107. 2007.
- CAMPIONI, M., SANTINI, D., TONINI, G., *et al.* Role of Apaf-1, a key regulator of apoptosis, in melanoma progression and chemoresistance. **Experimental Dermatology**, v.14, n.11, p.811-818. 2005.
- CARSBERG, C. J., JONES, K. T., SHARPE, G. R., *et al.* Intracellular calcium modulates the responses of human melanocytes to melanogenic stimuli. **Journal of Dermatological Science**, v.9, n.3, p.157-164. 1995.
- CASILLO, S., PERAL, A. L. e FRATI, L. Tissue culture in the study of cancer. **Cytotechnology**, v.3, p.117-122. 1990.
- CHIU, K. P., ARIYARATNE, P., XU, H., *et al.* Pathway aberrations of murine melanoma cells observed in Paired-End diTag transcriptomes. **BMC Cancer**, v.7, n.109, p.doi:10.1186/1471-2407-7-109. 2007.

CHOWDHURY, R., CHOWDHURY, S., ROYCHOUDHURY, P., *et al.* Arsenic induced apoptosis in malignant melanoma cells is enhanced by menadione through ROS generation, p38 signaling and p53 activation. **Apoptosis**, v.14, p.108-123. 2009.

COSSO, R. G., TURIM, J., NANTES, I. L., *et al.* Mitochondrial Permeability Transition Induced by Chemically Generated Singlet Oxygen. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.34, n.3, p.157-163. 2002.

DEWILDE, A., PELLIEUX, C., HAJJAM, S., *et al.* Virucidal activity of pure singlet oxygen generated by thermolysis of a water-soluble naphthalene endoperoxide. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.36, n.1, p.23-29. 1996.

DEWILDE, A., PELLIEUX, C., PIERLOT, C., *et al.* Inactivation of intracellular and non-enveloped viruses by a non-ionic naphthalene endoperoxide. **Biological Chemistry**, v.379, p.1377-1379. 1998.

DI MASCIO, P. e SIES, H. Quantification of singlet oxygen generated by thermolysis of 3,3'-(1,4-Naphthylidene) dipropionate. Monomol and dimol photoemission and the effects of 1,4 diazabicyclo[2.2.2]octane. **Journal of the American Chemical Society**, v.111, p.2909-2914. 1989.

DI MASCIO, P., WEFERS, H., DO-TI, H. P., *et al.* Singlet molecular oxygen causes of biological activity in plasmid and bacteriophage DNA and induces single-strand breaks. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1007, p.151-157. 1989.

DIAZ, R. e STAHL, P. D. Digitonin Permeabilization Procedures for the Study of Endosome Acidification and Function. In: A. M. TARTAKOFF (Ed.). **Methods in Cell Biology**. San Diego: Academic Press, Inc., v.31, 1989.

EARNSHAW, W. C., MARTINS, L. M. e KAUFMANN, S. H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. **Annual Reviews in Biochemistry**, v.68, p.383-424. 1999.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v.35, n.4, p.495-516. 2007.

EZZAHIR, A. The influence of melanins on the photoperoxidation of lipids. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.3, n.3, p.341-349. 1989.

FADEEL, B. e ORRENIUS, S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. **Journal of Internal Medicine**, v.258, p.479-517. 2005.

FERNÁNDEZ-GUARINO, M., GARCÍA-MORALES, I., HARTO, A., *et al.* Photodynamic Therapy: New Indications. **Actas Dermosifilograficas**, v.98, p.377-395. 2007.

FILL, M. e COPELLO, J. A. Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. **Physiol. Rev.**, v.82, n.4, p.893-922. 2002.

Foundation Skin Cancer. **Melanoma**. <http://www.skincancer.org>. Acesso em: Dezembro, 2009.

FUJII, J., OTSU, K., IKEDA, Y., *et al.* **Elucidation of Singlet Oxygen-Induced Cell Death**. In: XII Biennial Meeting. Buenos Aires, Argentina, 5-9 maio 2004. 305-309.

GEE, K. R., BROWN, K. A., CHEN, W. N. U., *et al.* Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes. **Cell Calcium**, v.27, n.2, p.97-106. 2000.

GIDANIAN, S., MENTELLE, M., FRANK L MEYSKENS, J., *et al.* Melanosomal Damage in Normal Human Melanocytes Induced by UVB and Metal Uptake - A Basis for the Pro-Oxidant State of Melanom. **Photochemistry and Photobiology**, v.84, n.3, p.556-564. 2008.

GODOY, L. C., MUÑOZ-PINEDO, C., CASTRO, L., *et al.* Disruption of the M80-Fe ligation stimulates the translocation of cytochrome c to the cytoplasm and nucleus in nonapoptotic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.106, n.8, p.2653-2658. 2009.

GOTTESBERGE, A. M. M. Z. Physiology and pathophysiology of inner ear melanin. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v.1, p.238-249. 1988.

HAKANSSON, A., GUSTAFSSON, B., ABDIU, A., *et al.* Bcl-2 expression in metastatic malignant melanoma. Importance for the therapeutic efficacy of biochemotherapy. **Cancer Immunol Immunother**, v.52, p.249-254. 2003.

HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press 1999. 936 p.

HANAHAH, D. e WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **The Cell**, v.100, n.1, p.57-70. 2000.

HAVASI, A., LI, Z., WANG, Z., *et al.* Hsp27 Inhibits Bax Activation and Apoptosis via a Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v.283, n.18, p.12305-12313. 2008.

HE, Y.-Y., COUNCIL, S. E., FENG, L., *et al.* Spatial Distribution of Protein Damage by Singlet Oxygen in Keratinocytes. **Photochemistry and Photobiology**, v.84, n.1, p.69-74. 2008.

HOLLER, N., ZARU, R., MICHEAU, O., *et al.* Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. **Nat Immunol**, v.1, n.6, p.489-495. 2000.

HOOGDUIJN, M. J., CEMELI, E., ROSS, K., *et al.* Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H₂O₂-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca²⁺. **Experimental Cell Research**, v.294, p.60-67. 2004.

- HOOGDUIJN, M. J., SMIT, N. P., LAARSE, A. V. D., *et al.* Melanin has a Role in Ca²⁺ Homeostasis in Human Melanocytes. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v.16, p.127-132. 2003.
- HSU, P. P. e SABATINI, D. M. Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. **Cell**, v.134, p.703-707. 2008.
- IVES, N. J., STOWE, R. L., LORIGAN, P., *et al.* Chemotherapy Compared With Biochemotherapy for the Treatment of Metastatic Melanoma: A Meta-Analysis of 18 Trials Involving 2,621 Patients. **J Clin Oncol**, v.25, n.34, p.5426-5434. 2007.
- IYER, S. S., PULSKENS, W. P., SADLER, J. J., *et al.* Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.106, p.20388-20393. 2009.
- JÄNICKE, R. U., SPRENGART, M. L., WATI, M. R., *et al.* Caspase-3 Is Required for DNA Fragmentation and Morphological Changes Associated with Apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.16, p.9357-9360. 1998.
- JUNG, T., BADER, N. e GRUNE, T. Oxidized proteins: Intracellular distribution and recognition by the proteasome. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.462, n.2, p.231-237. 2007.
- JUNG, T. e GRUNE, T. The proteasome and its role in the degradation of oxidized proteins. **IUBMB Life**, v.60, n.11, p.743-752. 2008.
- KANG, H.-Y., KIM, N.-S., LEE, C.-O., *et al.* Expression and Function of Ryanodine Receptors in Human Melanocytes. **Journal of Cellular Physiology**, v.185, p.200-206. 2000.
- KASIBHATLA, S., AMARANTE-MENDES, G. P., FINUCANE, D., *et al.* **Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis**. Cold Spring Harb. Protocols. doi:10.1101/pdb.prot4493. 2006a.
- _____. **Analysis of DNA Fragmentation Using Agarose Gel Electrophoresis**. Cold Spring Harb. Protocols. doi:10.1101/pdb.prot4429. 2006b.
- KASS, G. E. N., ERIKSSON, J. E., WEIS, M., *et al.* Chromatin condensation during apoptosis requires ATP. **Biochem. J.**, v.318, p.749-752. 1996.
- KESSEL, D., CASTELLI, M. e REINERS, J. J., JR. Ruthenium red-mediated suppression of Bcl-2 loss and Ca²⁺ release initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum: scavenging of reactive oxygen species. **Cell Death Differ**, v.12, n.5, p.502-511. 2005.
- KISCHKEL, F. C., HELLBARDT, S. e BEHRMANN, I. Cytotoxicity dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. **EMBO J**, v.14, p.5579-88. 1995.

KOBAYASHI, N., NAKAGAWA, A., MURAMATSU, T., *et al.* Supranuclear Melanin Caps Reduce Ultraviolet Induced DNA Photoproducts in Human Epidermis. **Journal for Investigative Dermatology**, v.110, n.5, p.806-810. 1998.

KONGSHOJ, B., MIKKELSEN, N. D., KOBAYASHI, T., *et al.* Ammonium chloride and L-tyrosine enhance melanogenesis in vitro but not in vivo even in combination with ultraviolet radiation. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, v.23, p.197-202. 2007.

KORYTOWSKI, W., PILAS, B., SARNA, T., *et al.* PHOTOINDUCED GENERATION OF HYDROGEN PEROXIDE AND HYDROXYL RADICALS IN MELANINS. **Photochemistry and Photobiology**, v.45, n.2, p.185-190. 1987.

KROEMER, G., GALLUZZI, L., VANDENABEELE, P., *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v.16, n.1, p.3-11. 2009.

KROL, E. S. e LIEBLER, D. C. Photoprotective Actions of Natural and Synthetic Melanins. **Chem. Res. Toxicol.**, v.11, p.1434-1440. 1998.

KUROSAKA, K., TAKAHASHI, M., WATANABE, N., *et al.* Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages. **The journal of Immunology**, v.171, n.9, p.4672-4679. 2003.

LEMASTERS, J. J., THERUVATH, T. P., ZHONG, Z., *et al.* Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v.1787, n.11, p.1395-1401. 2009.

LI, F., MAO, H. P., RUCHALSKI, K. L., *et al.* Heat stress prevents mitochondrial injury in ATP-depleted renal epithelial cells. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v.283, p.C917-C926. 2002.

LIEBERTHAL, W., MENZA, S. A. e LEVINE, J. S. Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.274, n.2, p.F315-327. 1998.

LORENZO, H. K. e SUSIN, S. A. Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death. **FEBS Letters**, v.557, n.1-3, p.14-20. 2004.

LUO, X., BUDI HARJO, I., ZOU, H., *et al.* Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome *c* release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. **Cell**, v.94, p.481-490. 1998.

MA, S., EGYHAZI, S., UENO, T., *et al.* *O*⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase expression and gene polymorphisms in relation to chemotherapeutic response in metastatic melanoma. **British Journal of Cancer**, v.89, n.8, p.1517-1523. 2003.

MAMOON, A.-M., GAMAL-ELDEEN, A. M., RUPPEL, M. E., *et al.* In vitro efficiency and mechanistic role of indocyanine green as photodynamic therapy agent for

human melanoma. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.6, n.2, p.105-116. 2009.

MARKOVIC, S. N., ERICKSON, L. A., RAO, R. D., *et al.* Malignant Melanoma in the 21st Century, Part 1: Epidemiology, Risk Factors, Screening, Prevention, and Diagnosis. **Mayo Clinic Proceedings**, v.82, n.3, p.364-380. 2007.

MARTINEZ, G. R., MEDEIROS, M. H. G. e DI MASCIO, P. Utilização de endoperóxidos de derivados de naftaleno como fontes químicas de oxigênio singlete em sistemas biológicos. **Química Nova**, v.23, n.5, p.686-689. 2000.

MARTINEZ, G. R., RAVANAT, J.-L., MEDEIROS, M. H. G., *et al.* Synthesis of a naphthalene endoperoxide as a source of ¹⁸O-labeled singlet oxygen for mechanistic studies. **Journal of the American Chemical Society**, v.122, p.10212-10213. 2000.

MATTSON, M. P. e CHAN, S. L. Calcium orchestrates apoptosis. **Nature Cell Biology**, v.5, n.12, p.1041-43. 2003.

MAZUREK, S., BOSCHEK, C. B., HUGO, F., *et al.* Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. **Seminars in Cancer Biology**, v.15, n.4, p.300-308. 2005.

MOAN, J., DAHLBACK, A. e SETLOW, R. B. Epidemiological Support for an Hypothesis for Melanoma Induction Indicating a Role for UVA Radiation. **Photochemistry and Photobiology**, v.70, n.2, p.243-247. 1999.

MODJTAHEDI, N., GIORDANETTO, F., MADEO, F., *et al.* Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. **Trends in Cell Biology**, v.16, n.5, p.264-272. 2006.

MOUAWAD, R., SEBERT, M., MICHELS, J., *et al.* Treatment for metastatic malignant melanoma: Old drugs and new strategies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.In Press, Corrected Proof. 2009.

NAGATA, H., TAKEKOSHI, S., TAKEYAMA, R., *et al.* Quercetin Enhances Melanogenesis By Increasing the Activity and Synthesis of Tyrosinase in Human Melanoma Cells and in Normal Human Melanocytes. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v.17, p.66-73. 2004.

NAGATA, S. Apoptotic DNA Fragmentation. **Experimental Cell Research**, v.256, p.12-18. 2000.

NELSON, D. L. e COX, M. M. **Lehninger - Principles of Biochemistry**. New York City: W. H. Freeman and Company. 2008. 1158 p.

OTERA, H., OHSAKAYA, S., NAGAURA, Z.-I., *et al.* Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. **EMBO J**, v.24, n.7, p.1375-1386. 2005.

- OTSU, K., SATO, K., IKEDA, Y., *et al.* An abortive apoptotic pathway induced by singlet oxygen is due to the suppression of caspase activation. **Biochemical Journal**, v.389, p.197-206. 2005.
- PERLIS, C. e HERLYN, M. Recent Advances in Melanoma Biology. **Oncologist**, v.9, n.2, p.182-187. 2004.
- PETROSILLO, G., RUGGIERO, F. M. e PARADIES, G. Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. **FASEB J.**, v.17, n.15, p.2202-2208. 2003.
- PICKLO, M. J., ZHANG, J., NGUYEN, V. Q., *et al.* High-Pressure Liquid Chromatography Quantitation of Cytochrome c Using 393 nm Detection. **Analytical Biochemistry**, v.276, p.166-170. 1999.
- PIERLOT, C., AUBRY, J. M., BRIVIBA, K., *et al.* Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. **Methods in Enzymology**, v.319, p.3-20. 2000.
- POLSTER, B. M., BASAÑEZ, G., ETXEBARRIA, A., *et al.* Calpain I Induces Cleavage and Release of Apoptosis-Inducing Factor from Isolated Mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.8, p.6447-6454. 2005.
- POTTEN, C. e WILSON, J. **Apoptosis - The Life and Death of Cells**. New York: Cambridge University Press. 2004. 202 p.
- RAVANAT, J. L., DI MASCIO, P., MARTINEZ, G. R., *et al.* Singlet Oxygen Induces Oxidation of Cellular DNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.51, p.40601-40604. 2000.
- REILLY, T. P., FRANK H. BELLEVUE, I., WOSTER, P. M., *et al.* Comparison of the *In Vitro* Cytotoxicity of Hydroxylamine Metabolites of Sulfamethoxazole and Dapsone. **Biochemical Pharmacology**, v.55, p.803-810. 1998.
- RICCI, J. E., MUNOZ-PINEDO, C., FITZGERALD, P., *et al.* Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. **Cell**, v.117, n.6, p.773-786. 2004.
- RILEY, P. A. Melanin. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.29, n.11, p.1235-1239. 1997.
- RÓZANOWSKA, M., SARNA, T., LAND, E. J., *et al.* Free radical scavenging properties of melanin: Interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. **Free Radical Biology and Medicine**, v.26, n.5-6, p.518-525. 1999.
- RYTER, S. W. e TYRRELL, R. M. Singlet Molecular Oxygen (1O_2): A Possible Effector of Eukaryotic Gene Expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v.24, n.9, p.1520-1534. 1998.

SALCEDA, R. e SÁNCHEZ-CHÁVEZ, G. Calcium uptake, release and ryanodine binding in melanosomes from retinal pigment epithelium. **Cell Calcium**, v.27, n.4, p.223-229. 2000.

SANTOS, V. A. D. **O Efeito da Melanina em Células Tratadas com Oxigênio Molecular Singlete**. Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007. 96 p.

SCHWARTZ, J. H., SHIH, T., MENZA, S. A., *et al.* ATP Depletion Increases Tyrosine Phosphorylation of {beta}-Catenin and Plakoglobin in Renal Tubular Cells. **J Am Soc Nephrol**, v.10, n.11, p.2297-2305. 1999.

SETLOW, R. B., GRIST, E., THOMPSON, K., *et al.* Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.90, n.14, p.6666-6670. 1993.

SHIDOJI, Y., HAYASHI, K., KOMURA, S., *et al.* Loss of Molecular Interaction between Cytochrome c and Cardiolipin Due to Lipid Peroxidation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.264, n.2, p.343-347. 1999.

SIGMA-ALDRICH. <<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/learning-center/pathway-slides-and/mitochondria-in-apoptosis.html>. Acesso em 20 de outubro de 2009.

SKULACHEV, V. P. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. **FEBS Letters**, v.423, p.275-280. 1998.

SMALLEY, K. S. M. e EISEN, T. G. Farnesyl Transferase Inhibitor SCH66336 is Cytostatic, Pro-Apoptotic and Enhances Chemosensitivity to Cisplatin in Melanoma Cells. **International Journal of Cancer**, v.105, p.165-175. 2003.

SMIT, N. P. M., NIEUWPOORT, F. A. V., MARROT, L., *et al.* Increased Melanogenesis is a Risk Factor for Oxidative DNA Damage - Study on Cultured Melanocytes and Atypical Nevus Cells. **Photochemistry and Photobiology**, v.84, n.3, p.550-555. 2008.

SOUZA, G. A. D., GODOY, L. M. F., TEIXEIRA, V. R., *et al.* Proteomic and SAGE profiling of murine melanoma progression indicates the reduction of proteins responsible for ROS degradation. **PROTEOMICS**, v.6, n.5, p.1460-1470. 2006.

SUTO, D., IUCHI, Y., IKEDA, Y., *et al.* Inactivation of cysteine and serine proteases by singlet oxygen. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.461, p.151-158. 2007.

SUTO, D., SATO, K., OHBA, Y., *et al.* Suppression of the pro-apoptotic function of cytochrome c by singlet oxygen via a haem redox state-independent mechanism. **Biochemical Journal**, v.392, p.399-406. 2005.

SUZUKI, Y., IMAI, Y., NAKAYAMA, H., *et al.* A Serine Protease, HtrA2, Is Released from the Mitochondria and Interacts with XIAP, Inducing Cell Death. **Molecular Cell**, v.8, n.3, p.613-621. 2001.

- TAIT, S. W. G. e GREEN, D. R. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. **Oncogene**, v.27, n.50, p.6452-6461. 2008.
- TSUJIMOTO, Y. Apoptosis and necrosis: Intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. **Cell Death and Differentiation**, v.4, p.429-434. 1997.
- TSUJIMOTO, Y. e SHIMIZU, S. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. **Cell Death Differ**, v.7, p.1174-81. 2000.
- UGUREL, S., BELL, N., SUCKER, A., *et al.* Tumor type M2 pyruvate kinase (TuM2-PK) as a novel plasma tumor marker in melanoma. **Int. J. Cancer**, v.117, p.825-830. 2005.
- UZDENSKEY, A. B. Photodynamic Therapy and Signal Transduction. **Current Signal Transduction Therapy**, v.3, n.1, p.55-74. 2008.
- VANDER HEIDEN, M. G., CANTLEY, L. C. e THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science**, v.324, p.1029-1033. 2009.
- VANDER HEIDEN, M. G., CHRISTOFK, H. R., SCHUMAN, E., *et al.* Identification of small molecule inhibitors of pyruvate kinase M2. **Biochemical Pharmacology**, v.In Press, Corrected Proof. 2009.
- VIVES-BAUZA, C., YANG, L. e MANFREDI, G. Assay of Mitochondrial ATP Synthesis in Animal Cells and Tissues. In: L. A. PON e E. A. SCHON (Ed.). **Mitochondria**. San Diego: Elsevier, v.80, 2007. p.155-171.
- WANG, J. e YI, J. Cancer cell killing via ROS. **Cancer Biology & Therapy**, v.7, n.12, p.1875-1884. 2008.
- WATERHOUSE, N. J., STEEL, R., KLUCK, R., *et al.* Assaying Cytochrome c Translocation During Apoptosis. In: R. C. DICKSON e M. D. MENDENHALL (Ed.). **Signal Transduction Protocols**. New Jersey: Humana Press, v.284, 2004. p.307-313.
- WILKINSON, J. C., CEPERO, E., BOISE, L. H., *et al.* Upstream Regulatory Role for XIAP in Receptor-Mediated Apoptosis. **Mol. Cell. Biol.**, v.24, n.16, p.7003-7014. 2004.
- ZECH, B., KÖHL, R., KNETHEN, A. V., *et al.* Nitric Oxide Donors Inhibit Formation of the Apaf-1/Caspase-9 Apoptosome and Activation of Caspases. **Biochemical Journal**, v.371, p.1055-64. 2003.
- ZHANG, A., WU, Y., LAI, H. W. L., *et al.* Apoptosis - A Brief Review. **Neuroembryology**, v.5, n.3, p.47-59. 2004.
- ZHANG, X.-M., CHEN, J., XIA, Y.-G., *et al.* Apoptosis of murine melanoma B16-BL6 cells induced by quercetin targeting mitochondria, inhibiting expression of PKC- α and translocating PKC- δ . **Cancer Chemother Pharmacol**, v.55, p.251-262. 2005.