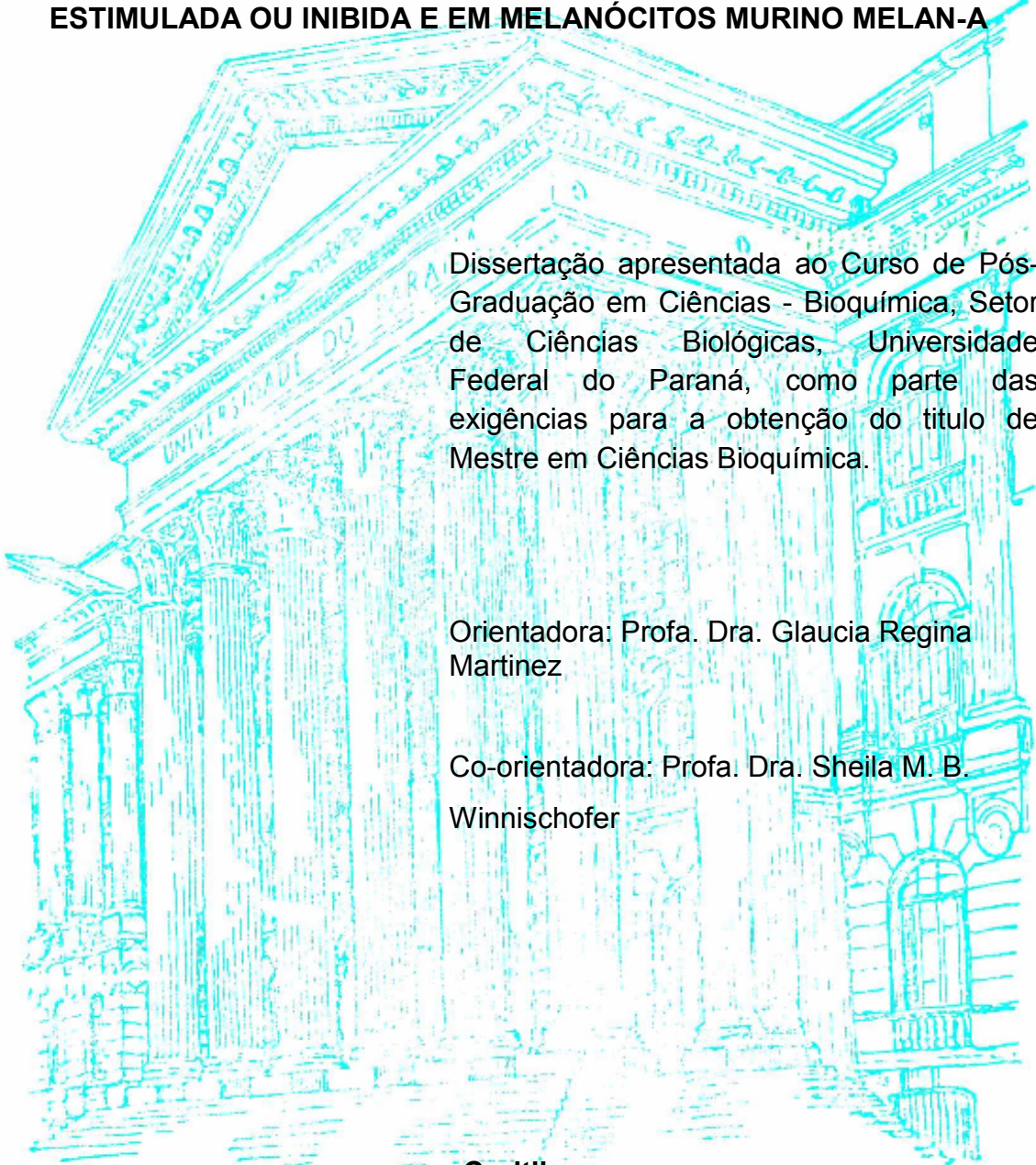


REGINA CELIA DE SOUZA

**EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASER INFRAVERMELHO (780 nm) EM
CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10 COM MELANOGÊNESE
ESTIMULADA OU INIBIDA E EM MELANÓCITOS MURINO MELAN-A**



Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Glauca Regina Martinez

Co-orientadora: Profa. Dra. Sheila M. B. Winnischofer

Curitiba

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

REGINA CELIA DE SOUZA

**EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASER INFRAVERMELHO (780 nm) EM
CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10 COM MELANOGÊNESE
ESTIMULADA OU INIBIDA E EM MELANÓCITOS MURINO MELAN-A**

Curitiba

2010

Dedico este trabalho

Ao Senhor Jesus
pela sabedoria, discernimento e
clareza à respeito da ciência.

Aos meus filhos
Jefferson e Anderson que suportaram
a minha ausência para a realização
desta etapa da minha vida.

Aos meus irmãos de sangue e da fé
que deram apoios, conselhos e incentivos
para eu chegar ao final dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Jesus pelo dom da vida e de sua Graça.

Aos meus pais João e Alice *in memoriam*, pelo bom exemplo que deixaram, e sempre incentivaram nos estudos. Para vocês o meu sempre muito obrigado e muita saudades.

Aos meus dois filhos que dividiram a minha atenção com os estudos nesta etapa da minha vida, principalmente o Jefferson que não gosta de me dividir com nada, amo muito vocês, essa vitória com certeza é de vocês também.

Aos meus irmãos, Assir, Sonia, Vera e Alexandre que reconheceram e admiraram a minha disposição para essa jornada.

A Prof. Dra. Glucia Regina Martinez, pela orientação desse trabalho e por ter me conduzido na ciência com destreza maestra, infinita gratidão. Obrigada por ter me deixado lhe ensinar outra ciência (oriental), sobre a qual não imaginava ser tão importante para o seu dia a dia.

A Prof. Dra. Sheila M. B. Winnischofer pela co-orientação, atenção e principalmente entusiasmo, para que este trabalho fosse conduzido corretamente até o final, meu carinho.

A Prof. Dra. Eva G. S. Carnieri e ao Dr. André B. Mariano pelo incentivo ao ingresso no mestrado quando cursava bioquímica básica como disciplina isolada depois de cursar a mesma nessa universidade há 25 anos.

Aos professores do laboratório de Oxidações Biológicas pelas ajudas e orientações.

Aos professores do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que de alguma maneira contribuíram para o meu aprendizado neste estudo, passando conhecimentos teóricos e práticos.

Aos amigos do laboratório de Oxidações Biológicas: Fernanda que esteve sempre presente desde a primeira disciplina, aceitou a adoção de mãe, bem como mana dos meus dois filhos, presente em todos os momentos, na minha casa, na minha mesa, enfim em todos os momentos bons ou ruins neste

laboratório, não me esquecerei. Caroline Valente, reencontro do passado quando ainda criança na minha cadeira de trabalho (dentista), e agora um gostoso reviver, minha mensageira de vitória. A Amanda tão séria, mas com uma gentileza para poucos que a conhece, obrigada pela ajuda nas difíceis contas de soluções e transformações bioquímicas. Amo vocês. Ao Eduardo Aliprandini por responder inúmeras dúvidas dos compostos e preparos das soluções do meu trabalho, o mestre dos testes, testou inúmeras técnicas para o grupo, você vai longe garoto.

Aos colegas do grupo de Oxidações Biológicas pela ajuda nas dúvidas de materiais e métodos bioquímicos e por terem que passar uma experiência de conviver com uma pessoa tão incomum e diferente como eu, obrigada por suportarem. Sei que sou aquele pontinho fora das curvas ou retas e por mais que mude o experimento ele continua lá no mesmo lugar.

As minhas amigas Dra Mari Azolin e Dra Beatriz Bittencourt, professoras do curso de acupuntura, por quebrarem o galho quando por motivo de estudo no mestrado eu não pude participar inteiramente nas preparações das aulas e nos estudos de acupuntura.

Ao Mestre em Laser Mario Pansini que me ensinou os primeiros passos nessa ciência maravilhosa que é a Ciência Laser e que continuo a exercê-la com paixão.

Aos irmãos de fé cristã, que oraram para que eu tivesse força, coragem e discernimento para chegar até o fim desta jornada, que o Senhor Jesus lhes recompensem.

As amigas Lúcia, Edna, Linda, Elisângela, Ema e Dra Lucila, e aos amigos Guelf e Ricardo pelos incentivos, forças dadas quando eu queria desistir pelas dificuldades que iam surgindo, meu muito obrigada, vocês são anjos na terra.

Aos funcionários, técnicos e colaboradores do departamento de bioquímica que de certa forma contribuíram para eu terminar esse trabalho.

Aos departamentos de Fisiologia e de Botânica pela disponibilidade dos equipamentos.

Ao suporte financeiro do CNPq, Capes e INCT de Processos Redox em Biomedicina – Redoxoma.

Tempo virá em que nossos descendentes se surpreenderão por não sabermos coisas que são tão óbvias para eles. Muitas descobertas estão reservadas às gerações vindouras, quando a lembrança da nossa existência já estiver apagada. O nosso universo seria uma coisa insignificante se não houvesse sempre nele algo a ser investigado por todas as gerações que vão surgindo. A natureza não revela seus segredos de uma só vez. **Sêneca**

RESUMO

As radiações ultravioleta (UV), infravermelha (IR) e visível (Vis) estão presentes na luz solar. Sabe-se que a radiação UV-A (320 – 400 nm) promove a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem gerar danos ao DNA das células da pele. A radiação IR também causa alterações na pele, como o envelhecimento precoce e hiperpigmentação, além disso, tem potencial fotocarcinogênico e estimula a geração de ROS. Estudos mostram que a melanina da pele do ser humano, produzida nos melanócitos e transferida para os queratinócitos, absorve as radiações solares e protege o DNA da luz solar. O uso do laser infravermelho 780nm na pele, como instrumento de tratamento, não está totalmente esclarecido em relação aos seus efeitos sobre células normais e/ou tumorais. Foi mostrado que a radiação IR incidente na pele gera ROS. O principal alvo deste trabalho foi a análise dos efeitos da radiação IR proveniente de um laser 780nm sobre células Melan-a (melanócito murino imortalizado) e B16-F10 (melanoma murino), avaliando parâmetros de morte celular e estresse oxidativo. As células B16-F10 tiveram a melanogênese modulada antes da irradiação. Não foram observadas grandes alterações de viabilidade em função das doses, quantidade de melanina endógena ou dos tempos de recuperação, exceto em duas condições: na linhagem B16-F10 sem estímulo e irradiadas com laser infravermelho de 780nm, 70mW, dose 538,2 J/cm², houve aumento de 38,9% na percentagem das células viáveis em relação ao controle após 24 h e na linhagem Melan-a sem estímulo e irradiadas com laser infravermelho de 780nm, 70mW, dose 89,7 J/cm², que tiveram diminuição de 23% na percentagem das células viáveis em relação ao controle após 48 h. Não foi observada alteração da lipoperoxidação ou fragmentação de DNA em nenhuma das linhagens celulares após irradiação. Usando a sonda DCF-DA, não foi observada a geração de ROS intracelular nas células B16-F10 e Melan-a. A melanina de *Sepia officinalis* irradiada com Laser IR 780nm em solução aquosa de dimetilsulfóxido promoveu a geração de ROS de forma dependente do pH do meio em que se encontrava no momento da irradiação. Os resultados em conjunto mostraram que não houve uma resposta biológica agressiva para as células B16-F10 e Melan-a quando submetidas a apenas uma aplicação para irradiação nas doses de laser IR 780nm de 89,7 a 538,2 J/cm², e, além disso, a quantidade de melanina endógena não afeta os parâmetros de morte celular e geração de ROS.

Palavras chaves: melanoma, melanina, laser IR 780nm, ROS, DCF-DA.

ABSTRACT

Ultraviolet (UV), infrared (IR) and visible (Vis) radiation are present in solar light. It is known that UV-A (320 – 400 nm) promotes the formation of reactive oxygen species (ROS) that can cause DNA damage in skin cells. IR radiation causes skin changes such as premature aging, and hyperpigmentation; furthermore, it has potential for photocarcinogenicity and stimulates the generation of ROS. Studies show that melanin produced in melanocytes and transferred to keratinocytes in human skin absorbs solar radiation and protects DNA from solar light. The use of 780nm infrared laser on the skin, as a means of treatment, is not fully understood in relation to their effect on normal and/or tumor cells. Several studies show that the IR radiation on skin generates ROS. The main aim of this work was the analysis of IR radiation effects from a 780nm laser on Melan-a (immortalized murine melanocyte) and B16-F10 (murine melanoma) by evaluating cell death and oxidative stress parameters. The B16-F10 cells had the melanogenesis modulated before irradiation. Results did not show any major changes in viability in function of treatments, amount of endogenous melanin or recovery times, except for two conditions: B16-F10 without stimulation and irradiated with infrared laser 780 nm, 70 mW, dose 538,2 J/cm², that had an increase of 38.9% in the percentage of viable cells compared to control after 24h and Melan-a cell line irradiated with infrared laser 780 nm, 70 mW, dose 89,7 J/cm², that had a 23% decrease in the percentage of viable cells compared to control after 48 h. There were no changes in lipid peroxidation or DNA fragmentation in any of the cell lines after irradiation. Using the probe DCF-DA in cells B16-F10 and Melan-a, it was not observed the generation of intracellular ROS. Melanin from *Sepia officinalis*, irradiated with 780nm IR Laser in aqueous dimethylsulfoxide, promoted the generation of ROS, which was dependent of the pH of the medium at the time of irradiation. The overall results showed that there was not an aggressive biological response in B16-F10 cells and Melan-a when exposed to only one application of irradiation at doses of 780 nm IR laser from 89,7 a 538,2 J/cm² and, moreover, the amount of endogenous melanin did not affect the parameters of cell death and generation of ROS.

Keywords: melanoma, melanin, laser IR 780nm, ROS, DCF-DA.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO.....	20
FIGURA 2 - ESTÍMULO DA EXPRESSÃO DE MMP-1 POR IR-A ENVOLVENDO A PRODUÇÃO DE ROS.....	22
FIGURA 3 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DOS CROMÓFOROS DA PELE...	30
FIGURA 4 - VIA DE RAPER-MASON COM DESCRIÇÃO SOMENTE DA BIOSÍNTESE DA EUMELANINA.....	31
FIGURA 5 - ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO KÓJICO.....	33
FIGURA 6 - ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL EM CÉLULAS B16-F10 E MELAN-A.....	44
FIGURA 7 - ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL EM MELANINA DE <i>Sepia officinalis</i> ISOLADA.....	44
FIGURA 8 - MICROGRAFIAS DAS CÉLULAS (A) MELAN-A E (B) B16-F10 COM AUMENTO DE 100x.....	49
FIGURA 9 - (A) CURVA DE CALIBRAÇÃO DA MELANINA DE <i>Sepia officinalis</i> . (B) CURVA DE CALIBRAÇÃO DE PROTEÍNA.....	51
FIGURA 10 - DOSAGEM DE MELANINA DAS CÉLULAS B16-F10.....	61
FIGURA 11 - VIABILIDADE CELULAR DA B16-F10 APÓS 24 h DA IRRADIAÇÃO NAS DOSES 17,5, 52,5 e 105 J/cm ² NA CONDIÇÃO SEM ESTÍMULO E COM TRATAMENTOS DE ÁCIDO KÓJICO E TIROSINA.....	62
FIGURA 12 - VIABILIDADE CELULAR DA B16-F10 APÓS 24, 48, 72 h DA IRRADIAÇÃO COM DOSES 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm ² NA CONDIÇÃO SEM ESTÍMULO.....	63

FIGURA 13 - VIABILIDADE CELULAR DA B16-F10 APÓS 24, 48, 72 h DA IRRADIAÇÃO COM DOSES 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm ² COM TRATAMENTO DE ÁCIDO KÓJICO.....	64
FIGURA 14 - VIABILIDADE CELULAR DA B16-F10 APÓS 24, 48, 72 h DA IRRADIAÇÃO COM DOSES 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm ² COM TRATAMENTO DE TIROSINA E NH ₄ Cl.....	65
FIGURA 15 - VIABILIDADE CELULAR DA MELAN-A APÓS 24, 48 e 72 h DA IRRADIAÇÃO NAS DOSES 89,7, 538,2 e 1076,4 J/cm ² NA CONDIÇÃO SEM ESTÍMULO.....	66
FIGURA 16 - DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM B16-F10 APÓS 1 h DA IRRADIAÇÃO COM DOSES 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm ² NA CONDIÇÃO SEM ESTÍMULO.....	68
FIGURA 17 - DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM B16-F10 APÓS 1 h DA IRRADIAÇÃO COM DOSES 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm ² COM TRATAMENTO DE ÁCIDO KÓJICO.....	69
FIGURA 18 - DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM B16-F10 APÓS 1 h DA IRRADIAÇÃO COM DOSES 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm ² COM TRATAMENTO DE TIROSINA E NH ₄ Cl	70
FIGURA 19 - DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM MELAN-A APÓS 1 h DA IRRADIAÇÃO COM DOSES DE 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm ²	71
FIGURA 20 - DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM B16-F10 ESTIMULADAS COM TIROSINA E NH ₄ Cl E IRRADIADAS 2 VEZES COM DOSE 538,2 J/cm ²	72
FIGURA 21 - DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM MELAN-A IRRADIADAS 2 VEZES COM DOSE 538,2 J/cm ²	73

FIGURA 22 - DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM SOLUÇÃO DE MELANINA EM DMSO.....	75
FIGURA 23 - (A e B) DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM SOLUÇÃO DE MELANINA EM DMSO NA PRESENÇA DE Fe ²⁺	77
FIGURA 24 - DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM SOLUÇÃO DE MELANINA EM DMSO NA PRESENÇA DE Fe ²⁺ EM TAMPÃO FOSFATO.....	78
FIGURA 25 - PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DE CÉLULAS B16-F10 IRRADIADAS NA CONDIÇÃO SEM ESTÍMULO, COM ÁCIDO KÓJICO E COM TIROSINA.....	80
FIGURA 26 - PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DE CÉLULAS MELAN-A IRRADIADAS NA CONDIÇÃO SEM ESTÍMULO.....	81
FIGURA 27- GEL DE ELETROFORESE EM AGAROSE DE CÉLULAS B16-F10 E MELAN-A.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH - Adenocorticotrofina

A-L - *Acral-Lentiginous*

atm - atmosfera

ATP - Adenosina trifosfato

8-OH-Ade - 8-hidroxiadenina

8-oxodGuo - 8-oxo-7,8-dihidroxi-2'-desoxiguanosina

8-oxoGua - 8-oxo-7,8-dihidroguanina

Bak (*BCL2-antagonist/killer-1*)

Bax (*BCL2-associated X protein*);

Bcl - Linfoma de célula B

cAMP - Adenosina monofosfato cíclico

CD 31 - *cluster* de diferenciação molecular 31

COX-2 – Ciclooxygenase 2

CuZn SOD - Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco

CW - Corrente contínua

DCF-DA - 2,7 diacetato diclorofluoresceína

Deoxi-Hb - desoxihemoglobina

DHI - 5-6-dihidroindol

DHICA - 5-6-dihidroindol-2-ácido carboxílico

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxiribonucléico

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

EPR - Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica

ERK1/2 - Quinase regulada pela sinalização extracelular

FAS - Receptor de morte membro da família de receptores TNF

Fas-L - Ligante FasGa-Al-As – arseneto-alumínio-gálio

GPx - Glutaciona peroxidase

GSH - Glutaciona reduzida

GSSG - Glutaciona oxidada

HBSS - Solução Balanceada de Hanks

HE-Ne – Hélio- neônio

HEP-2 - células epiteliais humanas

HEPES - *N*-(2-hidroxietil) piperazina-*N'*-(ácido 2-etanosulfônico)
HO• - Radical Hidroxila
HOCl - ácido hipocloroso
HOO• - hidroperoxila
Hsp70 - Proteína de choque térmico 70
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
Hz - Hertz
IR - Radiação Infravermelha
J/cm² – Joules por centímetros quadrados (energia)
J/m² – Joules por metros quadrados (energia)
JNK - c-Jun N-terminal Kinase
LED - Diodo emissor de luz
LMM - *Lentigo maligna melanom* LO• - alcoxila
LPS - Lipopolissacarídeos
MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno
MC1R - Receptor-1 da Melanocortina
MMP-1 metaloproteinase de matriz-1
Mn SOD - Superóxido dimutase dependente de manganês
mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro
MSH - Hormônio Estimulante dos Melanócitos
MSHR - Receptor do Hormônio Estimulante dos Melanócitos
mW - miliwatt
NAD - Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NO• - óxido nítrico
NIR - *Near infrared*
¹O₂ - Oxigênio Singlete
O₂^{•-} - Radical Superóxido
O₂^{•+} - superóxido
O₃ - Ozônio
•OH - radical hidroxila
ONOO⁻ - peroxinitrito

Oxi-Hb - oxihemoglobina
PBS - Solução Salina-Fosfato Tamponada
PDT - Terapia Fotodinâmica
PES - polietersulfônica
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PMA - 12 miristato-13-acetato de forbol
RNS - Espécies reativas de nitrogênio
RO• - Radical alcoxila
ROO• - Radical Peroxila
ROOH - Hidroperóxido Orgânico
ROS - *Reactive Oxygen species*
RPMI - *Rosewell Park Memorial Institute*
RT-PCR - *real time* polymerase chain reaction
SFB - Soro Fetal Bovino
SOD - Superóxido dismutase
SSM - *Superficial spreading melanom-*
TBARS - *Thiobarbituric acid reactive substances*
TBE- Tris / Borato / EDTA
TNF - Fator de necrose tumoral
TPP – marca das garrafas
TSP-2 -Proteína trombospondina-2
Tyr - L-tirosina
UV - Radiação ultravioleta
VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial
 α -MSH - Hormônio Estimulante de Melanócitos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 RADIAÇÃO INFRAVERMELHA	20
2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E DANOS AO DNA	24
2.3 MELANINA	28
2.4 MELANOMA	35
2.5 LASERS DE BAIXA INTENSIDADE	37
3. JUSTIFICATIVAS	42
4. OBJETIVOS	43
4.1 OBJETIVOS GERAIS	43
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	44
6. MATERIAIS E MÉTODOS	45
6.1 IRRADIAÇÃO COM LASER INFRAVERMELHO DE 780nm	45
6.2 CULTIVO CELULAR	47
6.2.1 Esterilização de materiais	47
6.2.2 Meio de cultura para as células B16-F10 e MELAN-A	47
6.2.3 Soluções	48
6.2.3.1 Solução de Tripsina-EDTA	48
6.2.3.2 HBSS (solução salina balanceada de Hanks)	48
6.2.3.3 Solução Salina Fosfato Tamponada (PBS)	48
6.3 CULTIVO DAS CÉLULAS B16-F10 E MELAN-A	49
6.4 AVALIAÇÃO DA MELANOGENESE	50
6.5 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM LASER	52
6.5.1 Viabilidade celular pelo método de Cristal violeta	52
6.5.2 Detecção de espécies reativas (ROS) com sonda DCF-DA	53
6.5.2.1 DCF-DA em melanina de <i>Sepia officinalis</i>	53
6.5.2.2 DCF-DA em células B16-F10 e Melan-a	54
6.5.3 Peroxidação lipídica	57
6.5.4 AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA	57
6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	59

7. RESULTADOS	60
7.1 AVALIAÇÃO DA MELANOGÊNESE NAS CÉLULAS B16-F10	60
7.2 EFEITOS DO LASER INFRAVERMELHO 780 nm	61
7.2.1 Viabilidade das células B16-F10 e Melan-a	61
7.2.2 Detecção de espécies reativas de oxigênio em B16-F10 e MELAN-A com sonda DCF-DA	66
7.2.3 Detecção de espécies reativas de oxigênio em melanina de <i>Sepia officinalis</i> com sonda DCF-DA	73
7.2.4 Peroxidação lipídica pelo método TBARS	79
7.2.5 Fragmentação do DNA	81
8 DISCUSSÃO	83
9 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	92

1-INTRODUÇÃO

As radiações solares estão relacionadas com a vida existente no planeta, uma vez que estas fazem interações com o oxigênio desde as camadas mais altas da terra. O ozônio (O_3) presente na estratosfera sofre a ação da radiação UV (ultravioleta) para geração do oxigênio diatômico (O_2), este fundamental para as espécies aeróbicas, pois tem um papel importante na obtenção de energia e no metabolismo celular. As radiações solares e o oxigênio, apesar de serem fundamentais para a vida, também podem ser nocivos para os organismos vivos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A radiação UV-A (320 – 400 nm) promove a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete, que podem gerar danos ao tecido conectivo da pele (FISHER *et al.*, 2002). Se a quantidade de radiações solares UV que incidem na pele ultrapassar a capacidade de proteção do organismo, poderá ocorrer apoptose ou tumorigênese das células da epiderme e da camada basal da pele (TIMARES *et al.*, 2008). A radiação infravermelha (IR) também causa alterações na pele, como o envelhecimento precoce, hiperpigmentação e tem potencial fotocarcinogênico (SCHIEKE *et al.*, 2003). A radiação IR também estimula a geração de ROS nas mitocôndrias das células da epiderme (SCHIEKE *et al.*, 2006).

As radiações podem penetrar superficialmente ou profundamente na pele, a UV-B penetra somente na epiderme e a UV-A penetra em torno de 50% na derme. A radiação IR penetra mais profundamente na pele, atingindo até a derme e 17% da sua energia chegam aos tecidos subcutâneos (SCHIEKE *et al.*, 2006).

A absorção das radiações solares pela pele do ser humano induz a uma maior produção do pigmento melanina nas células dos melanócitos e sua posterior transferência aos queratinócitos. Este efeito tem a função de proteger as células da pele contra possíveis danos ao DNA (KOBAYASHI *et al.*, 1998). A melanina absorve as radiações solares, numa ampla faixa do espectro eletromagnético, que vai de 280nm (UV-B), passando pelo vermelho visível até 1300 nm (IR), mas o seu pico de absorção fica na faixa do UV (ANDERSON;

PARRISH, 1981). Apesar de a melanina proteger a pele contra as ROS, ela também produz os mesmos quando irradiada (SARNA *et al.*, 1984). Além disso, a síntese da melanina e a oxidação do NADH pela melanina geram ROS (SMIT *et al.*, 2008; WOERT, 1967).

A geração de ROS pela radiação UV, radiação IR e pela síntese de melanina podem causar danos à pele humana. Dependendo da quantidade de radiação absorvida pela pele e das ROS geradas pode haver o desencadeamento de alterações no controle da proliferação celular, que leva aos cânceres de pele, não-melanoma e melanoma (TADOKORO *et al.*, 2003; SETLOW *et al.*, 2003). O melanoma é um câncer de pele, derivado dos melanócitos, que é de incidência baixa, mas de alta agressividade. Este câncer não responde bem às terapias existentes para os cânceres de pele, e se evoluir para metástase, é letal (INCA, 2009; FOUNDATION SKIN CANCER, 2009).

Para várias alterações na pele como as lesões não cancerosas e vários tipos de cânceres é utilizada a terapia fotodinâmica (PDT). Essa terapia baseia-se na utilização da luz e de um fotossensibilizador, o qual absorve a luz de comprimento de onda no seu espectro de absorção, levando-o a sua forma excitada. No estado excitado pode transferir elétrons para biomoléculas ou energia para o oxigênio molecular, gerando oxigênio singlete. Esses processos levarão as células à morte por apoptose ou necrose, destruindo assim as lesões ou tumores benignos ou malignos (OLEINICK *et al.*, 2002).

A fonte de luz utilizada na terapia fotodinâmica pode ser obtida de lâmpadas, LEDs (diodo emissor de luz) e de lasers, onde os comprimentos de ondas destas fontes estão no espectro de absorção dos fotossensibilizadores. Apesar de esta terapia ser efetiva em vários cânceres de pele levando à cura, no melanoma a resposta é baixa. Quando usado o fotossensibilizador Photofrin e a luz vermelha visível para a PDT nos tecidos do melanoma, este fotossensibilizador não é totalmente ativado, pois nesta faixa do espectro não ocorre uma efetiva penetração dessa luz devido à presença da melanina (PASS, 1993).

Por sua vez, a melanina interage na faixa do IR, pois ao ser excitada utilizando uma fibra óptica de um espectrômetro NIR (NIR autofluorescence

spectra) no comprimento de onda de 785 nm, emite fluorescência (HUANG *et al.*, 2006).

Dessa forma, o foco desse trabalho foi estudar o efeito da radiação IR proveniente de um aparelho de laser infravermelho (780nm) em células B16-F10 de melanoma murino e melanócitos murinos Melan-a, avaliando as seguintes alterações: viabilidade celular, formação de ROS, fragmentação do DNA e danos oxidativos (peroxidação lipídica). Também foram utilizadas condições de estímulo e inibição da melanogênese em células B16-F10. Foi analisado também o comportamento da melanina *in vitro* quanto à produção de ROS depois de irradiada com laser infravermelho 780nm.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RADIAÇÃO INFRAVERMELHA

A radiação solar tem um amplo espectro de luz que atinge a Terra. A classificação dessas radiações é feita pelos comprimentos de onda que as mesmas possuem. Este espectro vai de 290 nm a 1 mm, recebendo as subdivisões: UV-C (100-280 nm), UV-B (290- 320 nm), UV-A (320-400 nm), luz visível (400-700 nm) e IR (radiação infravermelha, 760 nm a 1 mm) (ENDRES; BREIT, 2001).

A radiação infravermelha em inglês tem a sigla IR (*infrared*). É uma radiação não ionizante, na porção invisível do espectro eletromagnético, localizada na região de 760 nm a 1 mm. Essa região espectral é subdividida em vários comprimentos de onda, dependendo da absorção da radiação IR pelas várias camadas da pele e do seu efeito biológico nos tecidos. Essas subregiões são A, B, C com seus respectivos comprimentos de onda. A IR-A (760-1400 nm); IR-B (1400-3000 nm); IR-C (3000 nm - 1 mm). Pode também ser subdividido em IR próximo (760-3000 nm), IR médio (3000-30000 nm) e IR longínquo (30000 nm a 1 mm) (ENDRES; BREIT, 2001). A visualização da região da radiação IR no espectro eletromagnético é mostrada abaixo na FIGURA 1, entre região da luz visível e da região de microondas.

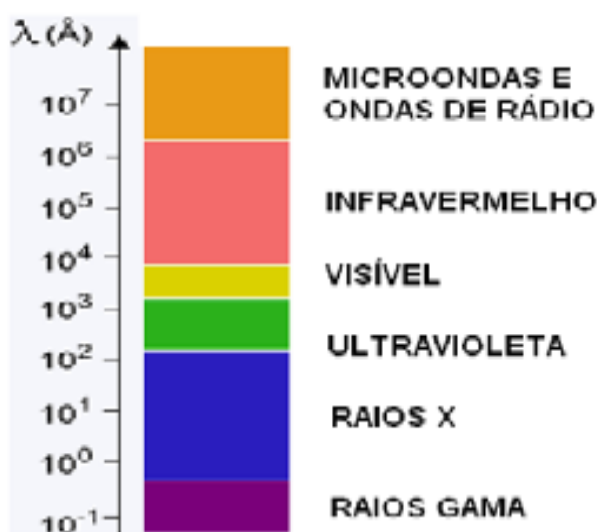


FIGURA 1 - ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO

FONTE: CEPA.IF.USP.BR, 2009

Os efeitos primários e secundários da irradiação IR são descritos por Karu (1987), onde a citocromo c oxidase, um complexo componente da cadeia respiratória da mitocôndria, pode ser o possível fotorreceptor desta radiação através de seus cromóforos o CuA e o CuB.

As interações das radiações com a pele humana podem causar efeitos danosos ou benéficos à mesma. Cada radiação interage com a pele respeitando as suas propriedades ópticas de reflexão ou de absorção. Algumas radiações podem penetrar superficialmente ou profundamente na pele. A radiação IR penetra mais profundamente na pele do que as radiações da faixa do ultravioleta, atingindo até a derme e 17% da sua energia chegam aos tecidos subcutâneos. Enquanto UV-B penetra somente na epiderme e a UV-A penetra em torno de 50% na derme. Com os resultados de observações epidemiológicas e clínicas, a capacidade de penetração na pele da radiação IR já não é mais analisada como inofensiva à pele humana (SHIECK; SCHROEDER; KRUTMANN, 2003).

Acredita-se que a radiação IR esteja relacionada com o envelhecimento da pele humana e com o potencial fotocarcinogênico, uma vez que culturas de fibroblastos humanos da pele irradiadas por tempos variados de 10 a 60 min com aparelho emissor de luz infravermelha (lâmpadas), no comprimento de onda 760 a 1400 nm, apresentaram aumento na expressão de mRNA da *MMP-1* (metaloproteinase de matriz-1). As MMPs são proteínas da família de metaloproteinases de matriz e estão envolvidas na degradação da matriz extracelular em processos fisiológicos normais, remodelação tecidual, desenvolvimento embrionário e reprodução (ovulação, menstruação). Essa degradação também é presente nos processos de doenças, como artrite, osteopatias e câncer (destrói a membrana basal, contribuindo para a metástase), (GROSS; LAPIERE, 1962; BRINCKERHOFF; MATRISIAN, 2002). Esse efeito foi mediado pela ativação da via de MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) /ERK1/2 (quinase regulada pela sinalização extracelular) (SCHIEKE *et al.*, 2002).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) na natureza são geradas pela ação de irradiações de luz UV, raios-X e também raios gama. Essas espécies reativas de oxigênio têm um papel duplo nos sistemas biológicos, podendo ser

benéfica ou prejudicial ao organismo (VALKO *et al.*, 2006). Até o momento não se sabe exatamente qual o tipo de ROS, nem a fonte de geração deles, envolvidos nas respostas à radiação IR das células em geral. Não se sabe também qual o cromóforo endógeno exato receptor dessa energia. Foi proposto um esquema da possível ação de ROS nas respostas celulares, desencadeando as respostas biológicas como ilustrado na FIGURA 2, onde a radiação IR-A atua na mitocôndria gerando ROS que ativam as quinases ERK 1/2, resultando em um aumento de expressão de MMP-1 (tanto mRNA, como proteína) (SCHIEKE *et al.*, 2006).

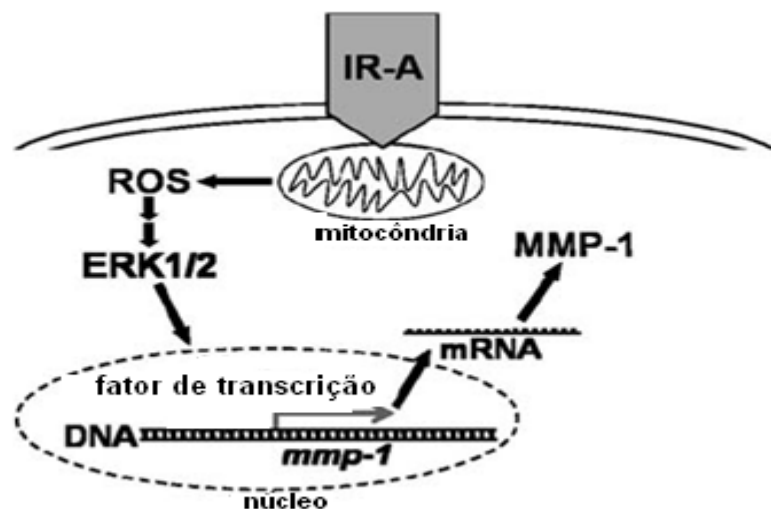


FIGURA 2 - ESTÍMULO DA EXPRESSÃO DE MMP-1 POR IR-A ENVOLVENDO A PRODUÇÃO DE ROS

FONTE: SCHIEKE *et al.*, 2006

As freqüentes exposições a radiação IR são sugestivas de ação no foto-envelhecimento precoce da pele humana, pois ocorre regulação da expressão do colágeno tipo I. Quando a exposição à radiação IR torna-se contínua, há aumento da expressão de *MMP-1* (mRNA e proteína) e diminuição da expressão do colágeno tipo I. O decréscimo na síntese de colágeno tipo I e aumento da síntese de *MMP-1* podem estar associados também aos danos do tecido conectivo da pele (KIM *et al.*, 2006).

Em 2008, Schroeder *et al.*, publicaram outro trabalho sobre efeitos da radiação IR em fibroblastos humanos da derme, estes expostos à radiação IR

tanto natural (sol), como artificial. O experimento foi realizado *in vivo*, em voluntários humanos com a pele saudável, e *in vitro* em cultura primária de fibroblastos extraídos por biópsias, com a pele irradiada dos mesmos. Foi verificado aumento da expressão de mRNA de *MMP-1*, aumento dos níveis protéicos de *MMP-1* e aumento de pro-*MMP-1* da pele humana apenas na derme. Houve aumento da expressão de *MMP-1* tanto *in vivo* como *in vitro*. Os resultados levaram os autores a concluir que a radiação IR induziria o envelhecimento precoce da pele.

Foi analisado o transcriptoma de fibroblastos primários de pele humana tratados com IR-A (760-1440) e foi observado que ele difere do conhecido transcriptoma induzido por UV. Alguns genes de quatro categorias como: matriz extracelular, homeostase do cálcio, sinalização por estresse e apoptose foram confirmados por PCR em tempo real. Esses resultados identificam a radiação IR-A como um fator de relevância na homeostase da pele e no fotoenvelhecimento (CALLES *et al.*, 2010).

Kim *et al.* (2006) sugeriram que a radiação IR pode regular a angiogênese da pele, pois após irradiação da pele com lâmpada IR (IR 300; Daekyoung Co., Kyungki, Korea, de emissão de 600nm até no máximo 1200nm) ou com calor de bloco quente (*heating pad* de 43° por 90 min) foi observado aumento na expressão de VEGF (Fator de crescimento vascular endotelial) e HSP 70 e inibição do TSP-2 (Proteína trombospondina-2), um inibidor de VEGF. Esses resultados foram obtidos tanto para as células de pele submetidas à radiação IR quanto às submetidas ao calor. A angiogênese foi visível nos resultados de imunocitoquímica, tanto para o número de vasos sanguíneos quanto para a densidade dos mesmos. Os autores sugerem que a regulação da angiogênese seria pelo equilíbrio entre o fator indutor de angiogênese VEGF e o seu inibidor TSP-2. E que a indução da angiogênese da pele irradiada com IR, seria mediada por esta irradiação gerar calor na pele.

A incidência de dose de luz infravermelha na pele humana, na faixa de 30 J/cm², aumenta a produção de elastina e de colágeno na mesma, mas essa dose alta, leva à desnaturação do colágeno. Um experimento foi feito em pele saudável de humanos masculinos e em camundongos amelanóticos, irradiando a pele dos mesmos com a luz infravermelha e posteriormente analisando

biópsia dos tecidos do local irradiado. Em camundongos amelanóticos, o efeito da aplicação da luz infravermelha é similar ao resultado obtido com humanos quando se usa energia em torno de 5-10 J/cm². Quando se aplica dose de 30 J/cm² em camundongos, ocorre aumento do número de queratinócitos e alguns destes se degeneram. O autor relata que os resultados obtidos foram similares aos dos lasers de baixa intensidade nesse comprimento de onda. Houve ação de dois mecanismos de respostas: a) degeneração do colágeno por efeito do calor profundo; b) aumento da síntese de ATP, resultando no aumento da síntese de colágeno e elastina (KAMEYAMA, 2008).

2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E DANOS AO DNA

Há uma estreita relação entre o oxigênio e as radiações do sol, principalmente a UV. O ozônio (O₃) presente na estratosfera sofre a ação da radiação UV, evitando assim seus efeitos danosos para os organismos vivos. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

O metabolismo do oxigênio pelos organismos aeróbicos, quase na sua totalidade, em torno de 95 a 98%, é feito pelas reações químicas de redução. Estas reações são denominadas de fosforilação oxidativa e são realizadas pela cadeia de transporte de elétrons e ATP sintase das mitocôndrias das células. Apesar de a mitocôndria ser a responsável pela produção de energia (ATP) para o organismo, ela também gera ROS que são prejudiciais ao organismo. (WINTERBOURN, 2008; VALKO *et al.*, 2006)

As espécies reativas são de dois tipos: radicais livres e não radicais. O radical livre é qualquer átomo, íon ou molécula que possui elétrons livres não emparelhados na sua camada externa, propiciando alta reatividade com outros componentes do organismo. Os radicais livres e não radicais são chamados de espécies reativas de oxigênio ROS e espécies reativas de nitrogênio RNS .

Exemplos de vários tipos de ROS e de RNS. ROS radicais livres: superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxila (•OH), hidroperoxila (HOO•), alcoxila (LO•) e outros. ROS não radicais livres: peróxido de hidrogênio (H₂O₂), oxigênio singlete (¹Δ_gO₂; abreviado ¹O₂); ozônio (O₃); ácido hipocloroso (HOCl) e outros.

RNS radical livre: óxido nítrico (NO^{\bullet}). RNS não radical: peroxinitrito (ONOO^-). (HALLIWELL, 2005; HERMES-LIMA, 2004; WINTERBOURN, 2008).

As ROS e RNS podem ser gerados pela ação ionizante da radiação UV, pelo metabolismo de drogas e xenobióticos, na fagocitose em macrófagos, e neutrófilos, entre outras fontes (WINTERBOURN, 2008; VALKO *et al.*, 2006). As interações dos ROS e RNS com os sistemas biológicos podem gerar resultados benéficos ou maléficos para os mesmos. As espécies reativas mais importantes dos sistemas biológicos, bem como a sua geração e suas atividades nesses sistemas serão descritos abaixo.

O superóxido é gerado em sua maioria na mitocôndria. Este radical não é muito reativo frente às biomoléculas, mas é hábil para redução do Fe^{+3} (HERMES-LIMA, 2004). O NO^{\bullet} é um RNS, gerado a partir da síntese de L-arginina para citrulina, pela óxido nítrico sintase, pela reação oxidativa via cinco elétrons. É um radical livre, não muito reativo, mas muito importante na sinalização dos processos fisiológicos dos sistemas biológicos. Processos esses tais como: neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, relaxante da musculatura lisa, mecanismos de defesa entre outros. O NO^{\bullet} ao reagir com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ gera o ânion ONOO^- uma das moléculas oxidantes mais ativas, que causa fragmentação do DNA e peroxidação lipídica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; VALKO *et al.*, 2006).

O radical $^{\bullet}\text{OH}$ pode ser gerado na reação de Fenton, utilizando o Fe^{2+} e H_2O_2 . Este radical é bastante reativo, pode iniciar a peroxidação lipídica e causar lesões no DNA (nas bases, quebra da fita). Pode estar ligado a várias doenças: desordens neurológicas, ateroscleroses, doenças inflamatórias crônicas, câncer e outros (VALKO *et al.*, 2006; HERMES-LIMA, 2004).

O $^1\text{O}_2$ é uma espécie reativa de oxigênio diferente das outras ROS, pois se encontra no estado excitado eletronicamente e nessa condição tem a característica de reagir quimicamente com outras moléculas (KIM *et al.*, 2008). O oxigênio na forma de $^1\text{O}_2$ tem um tempo de vida-média curto próximo de 10^{-6} s em água. (FOOTE; CLENNAN, 1995). Quimicamente pode ser formado por vários processos: H_2O_2 reage com hipoclorito de sódio (Na^+OCl^-) que leva a produção de $^1\text{O}_2$ no processo de fagocitose, mediante a ação das mieloperoxidases (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). A decomposição de

endoperóxidos de derivados do naftaleno, através da termólise aquosa, gera a energia necessária para a transferência do estado fundamental triplete do oxigênio para o estado singlete (MARTINEZ *et al.*, 2000). A geração fotoquímica do $^1\text{O}_2$ ocorre por um mecanismo de fotossensibilização do oxigênio. Ocorre a sensibilização do fotossensibilizador pelo fóton de luz irradiada, resultando na excitação para seu estado singlete e por cruzamento intersistemas para um estado triplete. O fotossensibilizador neste estado triplete, transfere um elétron a uma biomolécula ou ao oxigênio gerando radicais livres ou pode transferir energia para o oxigênio, gerando o $^1\text{O}_2$. A geração de ROS e de $^1\text{O}_2$, promove efeitos citotóxicos, leva a danos celulares, danos ao DNA, biomoléculas e outros, levando à morte celular. Essa técnica de geração de espécies reativas é o fundamento da terapia fotodinâmica (PDT), utilizada na terapia de alguns cânceres com efeito positivo na destruição das células (DOUGHERTY, 1998; OLEINICK *et al.*, 1998; AHMAD; MUKHTAR, 2000).

As espécies reativas geradas nos sistemas biológicos constantemente podem lesar as células, causando danos ao DNA, a proteínas e aos lipídeos. Quando ocorre um desequilíbrio entre geração de espécies reativas e defesas contra estas, há o estresse oxidativo. O equilíbrio pode ser feito pelos antioxidantes endógenos do organismo e de antioxidantes ingeridos na dieta, mas não são 100% efetivos.

Os antioxidantes endógenos podem ser enzimas como: catalase; glutathione peroxidase (GSHPx); Glutathione S-transferase (GST); Glutathione reduzida (GSH); superóxido dismutase (SOD) e outros.. Os antioxidantes ingeridos na dieta são moléculas de baixo peso molecular tais como: vitaminas lipossolúveis (A, E, Beta-caroteno); vitaminas hidrossolúveis (C, Complexo B); zinco (Zn); endógenos: selênio (Se); cobre (Cu) e outros (HALLIWELL, 2005; HERMES-LIMA, 2004; WINTERBOURN, 2008).

Se o equilíbrio entre a geração de espécies reativas e as defesas antioxidantes falharem, os danos celulares podem ocorrer. As proteínas sofrem danos pelos radicais livres frente à irradiação, adição de açúcares e produtos da liperoxidação lipídica. Os lipídios são também alvo dos ROS, resultando na lipoperoxidação. A lipoperoxidação é a oxidação gerada pela reação do ROS

com um ácido graxo insaturado, produzindo um lipídio radical que reage com O_2 resultando em radicais peroxilas (BENZIE, 1996), os quais podem gerar novos radicais lipídicos e propagar a reação. Nos sistemas biológicos, a lipoperoxidação ocorre na membrana celular, danificando a células, dependendo de quantos lipídios sofrerem essa alteração. As espécies reativas de oxigênio mais envolvidas com a iniciação da peroxidação são o $\cdot OH$, o $ONOO^-$, o $\cdot NO_2$; espécies de ferril e perferril.. Essas lipoperoxidações podem resultar finalmente em aldeídos, isoprostanos e hidroperóxidos lipídicos (VALKO *et al.*, 2006; HERMES-LIMA, 2004; BENZIE, 1996).

O material genético é constantemente exposto a vários oxidantes derivados do próprio metabolismo celular, de processos patofisiológicos e de fontes extracelulares. Os danos ao DNA podem ser por oxidação e fragmentação: formação de sítios AP (apurimidinica / apurínica); dano SSB (quebra da fita simples); DSB (quebra da fita dupla; DNA/proteína ligados) (SONNTAG, 2006). Pode ocorrer também fragmentação dos açúcares. A modificação mais comum e a mais estudada é da 8-OH-dG ou 8-oxo-dG (8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina). Porém, podem ocorrer oxidações de várias bases como: 8-hidroxiadenina (8-OH-Ade); citosina glicol, e outras. O reparo das lesões do DNA é feito pelo organismo através de: BER (reparo por excisão de base) e NER (reparo por excisão de nucleotídeo) (HALLIWELL, 2005; SONNTAG, 2006; COOKE *et al.*, 2003).

A falha na proteção do DNA ou no seu reparo pode levar a várias alterações: mutação, alteração da expressão gênica, instabilidade de microsatélite, aberrações cromossômicas, entre outras. A oxidação do DNA celular pelos ROS, leva a mutações, prejudicando o organismo num todo. As células com DNA mutado se duplicam e, passam essas informações para a nova geração de células, levando ao envelhecimento precoce e ao desenvolvimento do câncer. O dano oxidativo nos ácidos nucléicos também leva ao surgimento de patologias não neoplásicas, como doenças autoimunes, neurodegenerativas, cardiovasculares (COOKE *et al.*, 2003). O estresse oxidativo pode levar a célula à senescência e a fragmentação do seu DNA pode leva-la à apoptose, estes eventos são importantes nas terapias contra o desenvolvimento de tumores (COLLINS, 1999; HERMES-LIMA, 2004).

O processo de apoptose celular desempenha vários papéis importantes na manutenção do equilíbrio em um organismo, entre eles: a) atuação fundamental na fase embrionária (elimina células na fase embrionária); defesas imunes (seleção positiva e negativa de linfócitos); homeostase tecidual (formação de novas células e morte celular), desenvolvimento do tecido nervoso de vertebrados e outros. Se apoptose é falha a célula e/ou o organismo podem adquirir doenças ou serem induzidos à morte (DEGTEREV *et al.*, 2008; JOHNSON, 1997).

O complexo evento da apoptose é realizado por uma família de proteases, chamadas caspases, as quais realizam uma cascata proteolítica intracelular. Estas caspases apresentam uma cisteína no sítio ativo e cliva suas proteínas-alvo em ácido aspartático específico (proteases cisteínas-peptidases). As células possuem procaspases inativadas em seu interior, esperando sinalização para iniciar a apoptose. As procaspases que iniciam o evento de apoptose são as procaspases iniciadoras, essas são ativadas quando se ligam às proteínas adaptadoras, formando um agregado. Essa aproximação das procaspases iniciadoras faz com que uma ative à outra por clivagem, iniciando uma cascata de caspases, que é conhecido como o sinal da morte. As proteínas da família Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein-2*) intracelulares que ajudam a regular a ativação das procaspases são de dois grupos: a) proapoptóticas: Bax (*BCL2-associated X protein*); Bak (*BCL2-antagonist/killer-1*), BH3 (as quais *BID, BIM, BAD, NOXA e PUMA*), as quais fazem a liberação de fatores apoptogênicos da mitocôndria no citoplasma; e b) anti-apoptóticas: Bcl-2, Bcl-XL, *MCL-1* e outras, que atuam na manutenção dos fatores apoptogênicos na mitocôndria (YOULE; STRASSER, 2008; WEINBERG, 2008).

2.3. MELANINA

Melanina (do grego *melas*= negro) é um pigmento encontrado no reino animal e vegetal. Este pigmento está presente na cor dos olhos, cabelos, cérebro e pele dos seres humanos. A função principal da melanina cutânea é de fotoproteção, pois absorvendo a luz, protege a pele dos raios solares. O

indivíduo de pele com pouca melanina pode sofrer danos maiores nestes tecidos (TIMARES; KATIYAR; ELMETS, 2008).

Na natureza, a pigmentação melânica serve de camuflagem para alguns animais, reforço na cutícula de insetos e na parede celular de plantas (FILHO, 2004). Recentemente descobriu-se melanina em outros tecidos de mamíferos como: no coração de ratos (BRITO; KOS, 2008;), e no tecido adiposo humano (RANDHAWA, 2009).

A melanina é um biopolímero amorfo (não cristalino) e multifuncional, formado da oxidação da L-tirosina pela tirosinase. Esses biopolímeros são representados por eumelaninas, feomelaninas, neuromelaninas e pigmentos mistos (de eumelanina e feomelaninas). As propriedades químicas conhecidas das melaninas em geral são várias: ligações C-C (carbono-carbono), nitrogênio (N) e grupo carboxílico na sua estrutura, alto peso molecular, insolúveis na maioria dos solventes, solúvel em álcalis, pode apresentar associação com proteínas por ligações covalentes, quelante de cátions, ânions e poliaminas (SLOMINSKI *et al.*, 2004).

O polímero de cor negra (eumelanina) tem características tais como: condutibilidade/supercondutibilidade quando faz ligação entre produtos orgânicos e inorgânicos. Eumelanina liga-se facilmente com moléculas orgânicas, armazena líquidos e gases, e também une-se a íons (NICOLAUS, 2009). A melanina exibe propriedades físico-químicas importantes como destruição de radicais livres e ação quelante de metais (ROY, 2007).

A biossíntese da melanina ocorre nos complexos dos melanócitos denominado melanossomos (FILHO, 2004). Os melanócitos são células localizadas no estrato basal da epiderme. No final do período embrionário, as células da crista neural migram para o mesênquima da derme em desenvolvimento e mais tarde migram para a junção dermo-epidérmica e se diferenciam em melanócitos. Os melanócitos começam a produzir melanina antes do nosso nascimento, fornecendo o pigmento aos tecidos e órgãos que estão sendo gerados. Após o nascimento sua síntese é estimulada pela ação da luz ultravioleta. Os melanócitos penetram na epiderme em desenvolvimento e permanecem como células independentes não se unindo por desmosomos aos queratinócitos. Outras células também sintetizam a melanina, elas estão

presentes no plexo coróide, na retina e no corpo ciliar do olho (MOORE, 2008; KIERSZEMBAUM, 2004).

A faixa no espectro de absorção de radiação pela epiderme tem uma região que é chamada de janela óptica, fica entre (600-1300 nm). Nessa janela tem vários comprimentos de onda que podem agir sobre fotossensibilizadores biológicos na pele (cromóforos). A melanina é o cromóforo dos melanócitos, isto é, o maior absorvedor de radiação da epiderme nos diversos comprimentos de onda. Absorvendo as radiações do ultravioleta UV-B, da luz visível até a faixa do infravermelho próximo em 1200 nm, mas absorve principalmente nos comprimentos de ondas mais curtos como o UV-B (ANDERSON, PARRISH, 1981). Nas várias camadas da pele, existem outros cromóforos além da melanina que interagem com vários comprimentos de onda das radiações incididas sobre a pele como mostrado na FIGURA 3 (ZONIOS; DIMOU, 2009).

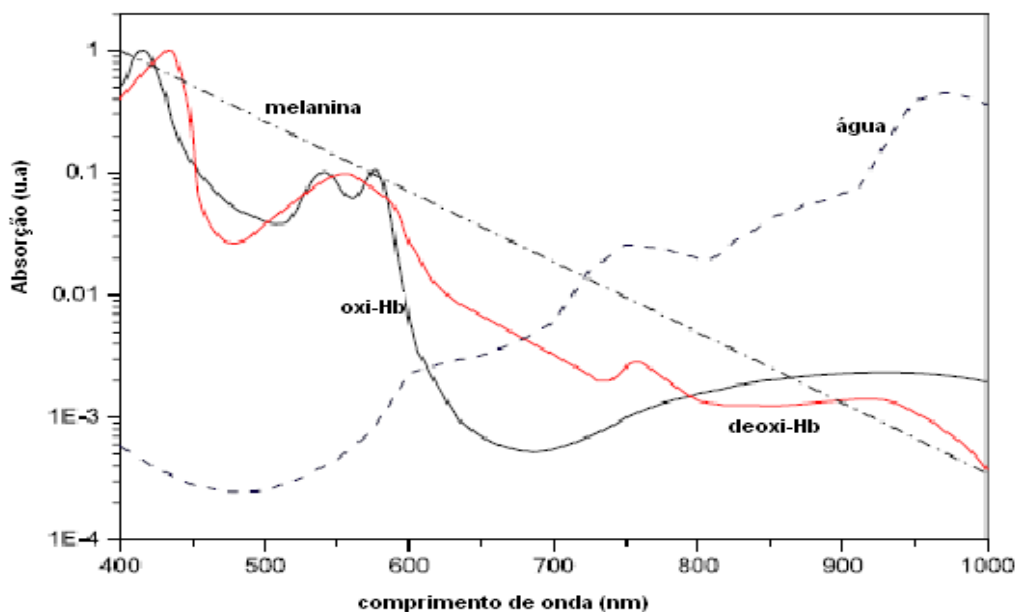


FIGURA 3 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DOS CROMÓFOROS DA PELE

FONTE: ZONIOS; DIMOU, 2009

NOTA: Melanina, água, oxihemoglobina (oxi-Hb) e desoxihemoglobina (deoxi-Hb).

A melanogênese ocorre pela ação da enzima tirosinase, fazendo a biossíntese da melanina com os substratos aminoácido L-tirosina e o oxigênio

através da via de Raper-Mason como mostrado na FIGURA 4. Roy (2007) relata que Raper, em 1928, concluiu que a síntese da melanina envolve a formação de 5,6-dihidroxiindol (DHI).

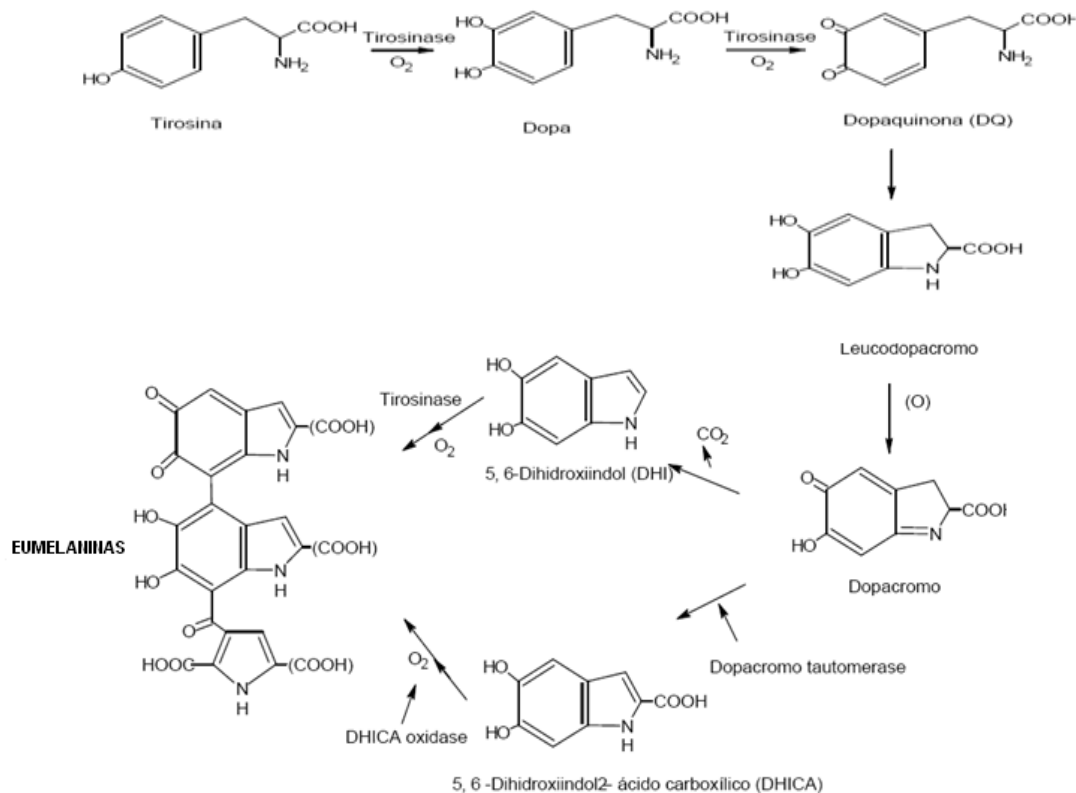


FIGURA 4 - VIA DE RAPER-MASON COM DESCRIÇÃO SOMENTE DA BIOSÍNTESE DA EUMELANINA

FONTE: WAKAMATSU; ITO, 2002

A biossíntese da melanina (melanogênese) é estimulada pelo hormônio MSH (Hormônio Estimulante dos Melanócitos). O precursor deste hormônio é a pró-opiomelanocortina (POMC). O MSH é um peptídeo que contém 13 aminoácidos, derivado do ACTH (adrenocorticotrofina) que é secretado pela hipófise anterior, podendo o MSH ser do tipo α , β ou γ . (CINGOLANIA; HOUSSAY, 2004; GUYTON; HALL, 2006; CONSTANZO, 2007). O MSH mais importante para a melanogênese é o tipo α . Este hormônio tem receptores específicos nas membranas dos melanócitos denominados MSHR (receptor do hormônio estimulante do melanócito). O α -MSH se liga no receptor MSHR

ativando a adenilato ciclase, convertendo o ATP em cAMP (adenosina monofosfato cíclica). Ocorrendo aumento do cAMP, ativação das quinases, aumenta a atividade das tirosinases, levando a síntese de eumelanina (FILHO, 2004).

No melanoma, a atividade da tirosinase leva à melanogênese da mesma forma que nos melanócitos, sendo dependente da proteína quinase, e esta atividade é maior quando há aumento do cAMP, ATP e magnésio intracelular. No estudo da cinética da reação os autores mostraram que ocorre aumento da atividade de tirosinase mesmo não sendo em células de melanócito. O experimento foi feito com sistema livre de células (extrato celular de macrófagos de peritônio de camundongo), proteína quinase dependente de AMP removidas de melanoma e adicionando também MSH. (KORNER; PAWELEK, 1970).

A enzima tirosinase, responsável pela melanogênese, leva à um aumento dos danos oxidativos do DNA da célula estimulada, pois aumenta a geração de ROS. Isso ocorre pois a síntese da melanina é um processo dependente de oxigênio, consome cisteína e diminui assim a capacidade de defesas antioxidante das células (concentração de glutatona). Foram comparados os resultados da melanogênese em duas células melanócitos normais e nevus displásicos (DN) e verificado que no DN houve: a) síntese de feomelanina maior que nos melanócitos; b) senescência maior e mais cedo que nos melanócitos; c) maiores danos oxidativos no DNA. Concluíram que, onde ocorre maior síntese de melanina localizada, no caso DN, há maior geração de radicais livres, com maior probabilidade de mutação genética e mais chances de malignização das células (SMIT *et al.*, 2008).

Vários fatores são capazes de inibir ou de estimular a biossíntese de melanina. São fatores estimuladores: α -MSH, L-tirosina, L-dopa, diacilgliceróis, UV-B, ranitidina, histamina, NO e outros (ARNAU, 1991). Verificou-se que houve aumento na produção tanto da eumelanina como da feomelanina com NO, histamina e α -MSH, e que esses fatores juntos podem levar à hiperpigmentação induzida pela luz UV (LASSALLE *et al.*, 2003). Os inibidores da biossíntese de melanina são: cisteína, sulfidril, hidroquinona, arbutin, ácido retinóico e dimetilsulfoxido (ARNAU, 1991). Foi recentemente descrito o ácido

acetilsalicílico como inibidor da biossíntese da melanina. Seu efeito inibidor está relacionado a duas ações: diminuição da expressão da tirosinase ou aumento da degradação da tirosinase, ocorrendo assim a síntese diminuída de melanina (SATO *et al.*, 2008).

O ácido Kójico é também um inibidor da biossíntese da melanina por bloqueio da tirosinase na síntese de 3-4-di-hidroxifenilalanina (NAKAGAWA; KAWAI; KAWAI, 1995). Este ácido foi isolado pela primeira vez em 1907 por Saito da espécie *Aspergillus oryzae* (ARNSTEIN; BENTLEY, 1953). A fórmula molecular do ácido kójico é $C_6H_6O_4$, sua estrutura está mostrada na FIGURA 5. Esse ácido é solúvel em água, etanol e acetona (CHEMBLINK, 2009).

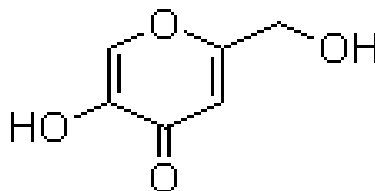


FIGURA 5 - ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO KÓJICO

FONTE: CHEMBLINK, 2009

Na indústria o ácido kójico é utilizado como aditivo e conservante nos alimentos, nos cosméticos dermatológicos é um componente com ação clareadora da pele. Apresenta ainda propriedades antibacteriana, antioxidante e antifúngica. Nas plantas, sua função é de regulador do crescimento destas. O ácido kójico também possui ação antioxidante contra espécies reativas de oxigênio: $\cdot OH$ (hidroxil), $O_2^{\cdot -}$ (superóxido) e 1O_2 (oxigênio singlete), essa atividade não é observada para o H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) (GOMES *et al.*, 2001).

Ito, Wakamatsu (1998) realizaram experimentos de degradação química da melanina para identificação da dopamina. Utilizaram métodos de oxidação alcalina com peróxido de hidrogênio, acidificação oxidativa pelo permanganato de potássio e redução por hidrólise com o ácido hidriódico. Concluíram que é mais indicado o método de oxidação alcalina com peróxido de hidrogênio para caracterização da eumelanina natural e sintética. A melanina pode aumentar a transferência de elétrons independente da energia dos fótons incididos nela. Esse evento ocorre na melanina do olho humano para iniciar o fenômeno da

visão. Verificou-se na retina humana *in vivo* a capacidade da melanina de absorver diferentes tipos de radiação de baixa energia e convertê-la em um tipo de energia utilizável, isso pelo fato da melanina ser semicondutora amorfa, um transdutor de energia (SOLIS; LARA; RENDON, 2007).

A melanina mostrou capacidade de oxidação da coenzima NADH, *in vitro*, mas a função fisiológica dessa oxidação é desconhecida. O autor sugeriu dois tipos de reações (a e b) para essa oxidação do NADH pela melanina:

Reação a) $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{MELANINA} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{MELANINA} \cdot 2\text{H}$

Reação b) $\text{MELANINA} \cdot 2\text{H} + \text{O}_2 \rightarrow \text{MELANINA} + \text{H}_2\text{O}_2$

O resultado dessas duas reações foi: $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$. Essa reação de oxidação não enzimática do NADH para o NAD^+ é feita pela melanina na presença de oxigênio, consumindo um átomo de oxigênio por mol de coenzima oxidada, posteriormente a melanina se auto-oxida produzindo H_2O_2 . Essas reações podem ocorrer pela sensibilização da luz (WOERT, 1967).

Para testar as diferenças de concentrações de melanina, tentando imitar os diferentes tipos de pele, foram usados filtros de gelatina, contendo várias concentrações da mesma. As células tumorais de fígado (HEP-2) foram irradiadas com laser de 670 nm e sob a interferência desses filtros e se observou que as diferenças de concentrações de melanina nos filtros alteraram as respostas celulares frente à ação do laser. Quanto maior a concentração de melanina no filtro, menor foi o efeito da radiação sobre essas HEP-2. Realmente a melanina absorve essa irradiação nesta faixa do espectro (janela óptica), afetando a fotobiomodulação do tecido irradiado (BRONDON; STADLER; LANZAFAME, 2007).

Sob a irradiação do laser infravermelho próximo de 785 nm (NIR, *near infrared*), a melanina cutânea foi excitada e emitiu fluorescência. O fato da melanina ter a propriedade de emitir fluorescência sob NIR, pode ajudar a realizar avaliações das alterações da pele relacionada com a melanina. Esse fenômeno ocorreu com a melanina, pois ela absorveu a energia do laser, passou para um estado excitado e ao voltar pro estado fundamental emitiu luz (fluorescência). Para o experimento *in vitro*, a melanina submetida à irradiação

foi de cabelos e penas, e *in vivo* foi a melanina removida da pele humana com variados tipos de alterações da pele (nevus, vitiligo, melanoma, e outros) e a fluorescência apareceu com NIR em comprimentos de onda altos. A melanina irradiada com UV e luz visível não emite fluorescência, fazendo um diferencial à NIR (HUANG *et al.*, 2006).

2.4. MELANOMA

Estudos mostram que a malignização do melanócito está diretamente ligada a exposição crônica da radiação solar, principalmente a UV-A, levando a formação do tumor de pele chamado melanoma. Entretanto o comprimento de onda exato causador dessa malignização não é conhecido. Foi verificado em peixes do gênero *Xiphophorus*, que em torno de 90 a 95% da indução do melanoma esta ligado a UV-A (maior que 320nm) e regiões da luz visível (SETLOW *et al.*, 1993).

Os melanócitos protegem a pele contra os efeitos danosos da UV, mas eles são células com baixa capacidade de se renovarem. Essa característica torna-os deficientes em: a) manter a integridade do seu genoma; b) sobreviverem; c) evitar sua transformação maligna para o melanoma (KADEKARO *et al.*, 2003). Quando os melanócitos sintetizam a melanina eles acumulam peróxido de hidrogênio em seu interior, proveniente da oxidação dos precursores DHI (5,6-dihidroindol) e DHICA (ácido 5,6-dihidroindol-2-carboxílico). Se essa síntese é aumentada pela exposição ao UV pode ocorrer aumento de danos no DNA e mutações. Isso ocorre, pois o peróxido de hidrogênio na reação de Fenton pode gerar radical hidroxil, e este causar os danos no DNA (NAPPI; VASS, 1996).

A ação da UV nos vários tipos de pele humana levam os melanócitos e queratinócitos à apoptose, dependendo da quantidade de incidência dessa irradiação. Os mecanismos de apoptose desencadeados por estas células podem ocorrer via fosforilação da proteína p53 e ativação da caspase-3 (YAMAGUCHI *et al.*, 2006). A proteção contra UV pelo organismo está ligada a cor da pele pela quantidade de melanina nos melanócitos e queratinócitos. A cor da pele varia nas diversas raças, e tem uma relação inversamente

proporcional entre a quantidade de melanina e os danos causados no DNA. Se essa quantidade de melanina não for suficiente para proteção dos danos ao DNA, levará ao aparecimento de carcinomas, tanto melanoma como o não melanoma (TADOKORO *et al.*, 2003).

Os diversos tipos de lesões que aparecem na pele devem ser diferenciados para a conclusão do diagnóstico correto do melanoma, que depende da localização, forma, cor, aspecto e outros. Há quatro tipos de melanoma de pele: a) Melanoma lentigo maligno (*Lentigo maligna melanom – LMM*), com tumorigênese de evolução lenta e progressiva, variadas colorações, assimétrico, localização mais na área de cabeça e pescoço, penetra profundamente na epiderme dando-lhe a característica de metastático; b) Melanoma de expansão superficial (*Superficial spreading melanom-SSM*), apresenta superfície arredondada ou oval, bem delimitada, com finos prolongamento reticulares, borda policíclica normalmente um pouco elevada. A cor nas lesões podem ser de tonalidades bege a marrom enegrecido do LM, mostram tonalidades acinzentadas, branco-azuladas e róseo-avermelhadas, com o tempo pode ir penetrando profundamente na pele; c) Tipo nodular (Nodular melanom - NM), apresenta-se como um nódulo preto ou preto-azulado, de superfície relativamente lisa e tonalidade uniforme, capacidade de penetrar profundamente na pele, evolução relativamente curta, pode ulcerar e não fazer a cicatrização; d) Acrolentiginoso (*Acral-Lentiginous-A-L*), apresenta-se onde a irradiação UV tem pouca ou nenhuma incidência, nas extremidades do corpo como: palma das mãos e mão; pés e sola dos pés, hiponíquio (embaixo da unha), dedos (BRANNON, 2004; CLARK, 1967).

No Brasil, os cânceres de pele têm aumentado sua incidência em pessoas de pele mais clara, principalmente na região sudeste e sul. O câncer de pele melanoma tem incidência bem menor em relação à outros tumores de pele, mas sua letalidade é mais elevada. Quando o diagnóstico é feito precocemente, ou seja, nos estágios iniciais, o prognóstico do melanoma pode ser considerado bom e em alguns casos curáveis, já o melanoma metastático é incurável (INCA, 2009).

O tratamento do melanoma não metastático em geral é cirúrgico, em alguns casos dependendo do estágio de evolução, pode-se fazer a radioterapia

e quimioterapia. O tratamento para o melanoma metastático tem objetivo apenas de aliviar sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente (INCA, 2009), (FOUNDATION SKIN CANCER, 2009).

Os tratamentos com terapia fotodinâmica (PDT) não são utilizados no melanoma, pois os efeitos não são satisfatórios neste tipo de tumor. A terapia fotodinâmica (PDT) é utilizada no tratamento para alguns tipos de cânceres e alguns tipos de lesões não cancerosas. Dependendo da célula e do fotossensibilizador pode ocorrer a apoptose e a necrose das células.

A PDT no melanoma não tem efetividade, quando o corante utilizado é o *Photofrin* e a luz vermelha visível é utilizada para o mesmo ser ativado. Nesse faixa do espectro não ocorre total penetração dessa luz para ativação do fotossensibilizador nos tecidos do melanoma, devido à presença da melanina, pois a mesma compete com o fotossensibilizador na absorção da luz (PASS, 1993).

2.5 LASERS DE BAIXA INTENSIDADE

Em 1917, Albert Einstein publicou um trabalho sobre princípios físicos da emissão estimulada da radiação. Estes princípios físicos foram a base para a invenção do primeiro laser (CRUÂNES, 1984).

A palavra LASER em inglês é um acrônimo de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, significa a Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Esse conceito de laser foi apresentado por Gordon, o inventor do laser, em 1959 na conferência de bombeamento óptico, na Universidade de Michigan (GOULD, 1959).

Vários nomes estão ligados a construção dos lasers e sua utilização desde sua invenção. Em 1950, Townes, Gordon e Zeiger executaram a construção de um oscilador na faixa das ondas milimétricas. Em 1958, Townes e Schawlow construíram um laser. Basov e Projorov, na mesma época, também conseguiram construir um laser. Em 1960, Theodoro H. Maiman, utilizando emissor de laser a rubi fabricou o primeiro laser que realmente funcionou. Em 1961, foi realizada a primeira cirurgia a laser com sucesso, na qual foi removido um pequeno tumor de retina, no Hospital Presbiteriano de

New York. Somente a partir de 1965, foi feita adaptação da radiação laser à prática terapêutica por Sinclair e Knoll (CRUÃNES, 1984). Javan, em 1960, inventou o laser com gases Hélio-Neônio e luz contínua. O primeiro laser semiconductor foi proposto em 1963 pelos russos Alferov e Kroemer, em 1964, o alemão Patel inventou o laser de dióxido de carbono (*HISTORY OF LASERS*, 2009).

O uso clínico dos lasers infravermelho e vermelho visível de baixa intensidade permitiram a técnica chamada laserterapia. Essa técnica foi iniciada com observação clínica das respostas fornecidas pelos tecidos irradiados com a energia laser nos experimentos de cicatrização de feridas (MESTER *et al.*, 1971).

Os efeitos bioestimuladores dos lasers de baixa intensidade foram descritos por Cruães. Efeitos esses divididos em diretos, indiretos e gerais. Sendo os efeitos diretos: bioquímico, bioelétrico e bioenergéticos; os efeitos indiretos: estímulo à circulação e estímulo trófico celular; e os efeitos gerais: antiálgico, antiinflamatório, antiedematoso e normalizador circulatório. (CRUÃNES, 1984).

Esses efeitos ao longo dos anos têm sido estudados e muitas vezes reconsiderados à medida que os trabalhos demonstram resultados diferentes. Muitos destes efeitos ainda estão sendo confirmados nos trabalhos publicados com laser infravermelho e vermelho visível de baixa intensidade.

O efeito bioestimulador do laser ativa a duplicação do material genético para a divisão celular (KARU *et al.*, 1982). Foi mostrado que a síntese de RNA é estimulada ao máximo quando as células HeLa são irradiadas com laser no comprimento de onda 678 nm numa dose de 10^3 J/m^2 (1 J/cm^2). A estimulação máxima de síntese do DNA é induzida quando as células HeLa são irradiadas com laser vermelho visível contínuo, no comprimento de onda 633 nm e dose de 100 J/m^2 ($0,1 \text{ J/cm}^2$). Verificou-se que, ao aumentar a dose irradiada, a indução é reduzida e, ao diminuir essa dose, leva à inibição. A dose de irradiação chamada dose ótima é a dose que tem as melhores respostas no local irradiado, tanto para estimulação quanto para inibição.

Muitos eventos de sinalizações celulares importantes estão ligados à cAMP (Adenosina Monofosfato cíclica). A irradiação com laser de baixa

intensidade He-Ne (Hélio-Neônio) em fibroblastos de Hamster chinês com a luz de 404 nm, 603,8 nm e 760 nm, mudou a concentração de cAMP intracelular, resultando no seu aumento para esses comprimentos de onda. A irradiação com o laser de baixa intensidade nesses mesmos comprimentos de onda, também aumentou as sínteses de RNA e DNA. Estimulou a proliferação dos fibroblastos de Hamster chinês irradiados, comparados com os do controle (KARU, 1987).

Parcialmente, a inibição da dor com a ação do laser de baixa intensidade está relacionada com a inibição da síntese de eicosanóides via ácido araquidônico. Os fibroblastos gengivais humanos, com e sem estímulos pelo LPS (lipopolissacarídeos) proveniente do organismo gram negativo *Campylobacter rectus*, foram irradiados com laser de diodo Ga-Al-As - 880nm por 3-20 min de exposição variando uma energia de 0,95 - 6,32 J/cm². Os fibroblastos sem estímulos (de laser e LPS) produziram baixos níveis de PGE₂ (prostaglandina E₂). Os fibroblastos estimulados com LPS e irradiados 10 min com laser de diodo Ga-Al-As - 880nm tiveram completa inibição na produção de PGE₂. Os autores concluíram que esta energia inibe a produção de PGE₂ (prostaglandina E₂), pois ocorreu redução da expressão gênica da COX-2. O efeito do laser pode proporcionar uma amenização do quadro de gengivite e periodontite quando estas doenças têm a infecção por *Campylobacter rectus* (SAKURAI; YAMAGUCHI; ABIKO, 2000).

O laser também pode interferir no tecido sanguíneo com resposta favorável ou não ao organismo tratado com essa irradiação de baixa intensidade. O trabalho de STADLER *et al.* (2000) utilizou células sanguíneas humanas totais (sangue) e irradiação com laser 660 nm e fluência de 0 a 0,5 J/cm². Foram estudados dois grupos de linfócitos: um grupo de linfócitos isolados antes da irradiação do sangue e outro grupo isolado depois dessa irradiação. Os linfócitos do controle foram os isolados do sangue antes da irradiação e irradiados depois com fluência de 0 a 0,5 J/cm² iguais ao do sangue. Os linfócitos isolados do sangue irradiado proliferaram mais do que os linfócitos isolados antes da irradiação e irradiados posteriormente. A geração de espécies reativas e peroxidação lipídica foram maiores nas culturas de linfócitos irradiados na presença da hemoglobina, ou seja, na amostra total de

sangue. Concluindo que a hemoglobina pode ser a responsável pelas respostas da fotobiomodulação.

Karu, em 1991, em seus estudos sobre a ação do laser vermelho e infravermelho em células HeLa, sugeriu que o possível fotorreceptor da energia laser seja o citocromo c oxidase. Sua sugestão sobre esse fotorreceptor foi confirmada em 1999, sendo que este pode ser o responsável por várias respostas celulares à luz laser. Quando o quanta de luz é absorvido pelo citocromo c oxidase pode acelerar o transporte de elétrons na cadeia respiratória, aumentando assim o potencial elétrico de membrana da mitocôndria e aumenta a síntese de ATP, resultando assim na ativação do metabolismo celular.

A geração de ROS é relatada nos trabalhos citados a seguir. Vários autores demonstram a formação dessas espécies reativas nos experimentos, através de quantificação das mesmas, mas até o momento não existe uma explicação clara da via de geração de ROS.

A irradiação com laser de baixa intensidade utilizando doses baixas em células de eucarioto (humana e de outros mamíferos) e procarioto (*Escherichia coli*, *Torulopsis sphaerica*, e outras) leva a produção de pequenas quantidades de ROS (LUBART *et al.*, 2005).

Cardiomiócitos de ratos foram irradiados com $3,6 \text{ J/cm}^2$ com luz visível de baixa energia, houve aumento da concentração de Ca^{2+} e conseqüentemente a geração de ROS, mais especificamente peróxido de hidrogênio e superóxido. O $\text{O}_2^{\bullet-}$ foi medido pela técnica de EPR spin (Ressonância paramagnética do elétron) usando DEPMPO, e o H_2O_2 foi medido usando luminol (LAVI 2 *et al.*, 2003).

O $^1\text{O}_2$ (oxigênio singlete) foi gerado em fibroblastos (NIH/3T3) e nos espermatozóides de carneiro, ambos irradiados com luz visível de baixa energia (400–800 nm), produzindo 80 mW/cm^2 ($0,08 \text{ mW/cm}^2$). O $^1\text{O}_2$ foi detectado por EPR com 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone (LAVI *et al.*, 2004).

Fibroblastos NIH/3T3 não pigmentados foram irradiados na presença e ausência de vitamina C com um aparelho de luz visível, SunRay (SunBox Company, Gaithersburg, MD), emitindo a luz na faixa de 420 a 700 nm. Após 10 min de irradiação, na ausência de vitamina C, os fibroblastos produziram o

radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), o qual foi identificado utilizando 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) como captador para análise por EPR. Na presença de vitamina C, o resultado não detectou a presença de ($\cdot\text{OH}$) mostrando a ação antioxidante da vitamina C (OREN *et al.*, 2001).

As células CHO (*chinese hamster ovary*) irradiadas com laser de baixa intensidade após as mesmas serem submetidas a estresse nutricional levou a homeostase celular e preveniu a apoptose nessas células irradiadas. O laser utilizado foi laser semiconductor de 830 nm; 10 mW; dosagem de 2 J/cm². Mesmo nesse estresse nutricional e apesar da presença de núcleos apoptóticos, houve aumento na divisão das células CHO. (CARNEVALLI *et al.*, 2003).

A apoptose celular também pode estar relacionada com a irradiação laser de baixa intensidade com doses acima das recomendadas para bioestimulação (10 J/cm²). O laser He-Ne irradiado com alta fluência (120 J/cm² e 80 J/cm² por 10 min) em células humanas de adenocarcinoma de pulmão e células de macaco verde africano induziram essas células à apoptose. Esta apoptose foi desencadeada por geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) diretamente na mitocôndria sem ativação de caspase-8. Após aplicação de alta fluência de laser houve um decréscimo no potencial de membrana mitocondrial, ativação das caspase-3, levando à apoptose (WU *et al.*, 2007).

A fabricação dos lasers de alta potência para remoção de manchas e pêlos na pele ficam na faixa do espectro da janela óptica. Os fabricantes fizeram os testes para chegar a comprimentos de ondas que interagissem melhor com a melanina. O resultado desses testes foi na faixa de 750 a 850 nm, considerados comprimentos de ondas ótimos (interação melhor) para serem absorvidos pela melanina e penetrarem na pele. A interação laser/melanina pode ocorrer devido às propriedades que a melanina tem de biopolímero amorfo, com capacidade de condutibilidade quando faz ligação entre produtos orgânicos e inorgânicos (NICOLAUS, 2009).

3. JUSTIFICATIVAS

As exposições contínuas às radiações solares são comprovadamente as causadoras do envelhecimento precoce e do câncer. Diversos trabalhos relacionam as causas desses danos na pele à radiação UV, pois esta causa mutações nos queratinócitos e nos melanócitos. No entanto, trabalhos relatam que a radiação infravermelha na pele causa diminuição da síntese do colágeno, aumento de expressão de MMP-1 (mRNA e proteína) e geração de ROS que podem levar a hiperpigmentação e ao envelhecimento precoce. O uso do laser infravermelho 780nm na pele como instrumento de tratamento não é totalmente seguro, pois ainda não estão descritos todos os seus possíveis efeitos. Nas lesões de pré-melanoma e no melanoma também não estão descritos claramente seus efeitos, se benéficos ou maléficos, sobre essas lesões. Ainda não foi descrito o que ocorre com células de melanoma quando irradiadas por um laser de baixa intensidade com comprimento de onda de 780 nm. Nesse caso, a irradiação está na faixa da janela óptica, porque essas células contêm melanina no seu interior (citoplasma e melanossomos), podendo então absorver essa irradiação e transferir elétrons da energia que ela absorve, sendo esse um dos objetivos de nosso estudo.

Neste trabalho, as células de melanoma murino (B16-F10) e melanócito murino (Melan-a) foram irradiadas somente com laser infravermelho (780nm), sem fotossensibilizador, e avaliadas em vários aspectos em relação à viabilidade celular, lipoperoxidação, fragmentação do DNA e geração de ROS. Adicionalmente, a melanina isolada foi avaliada *in vitro*, para verificar se ocorre geração de ROS frente a essa irradiação do infravermelho, uma vez que a melanina é o cromóforo dos melanócitos e absorve essa energia.

O conhecimento sobre como as espécies reativas são formadas e como estas agem nos sistemas biológicos é importante, pois é sugerido na literatura que os estímulos da irradiação com os lasers de baixa intensidade possam gerar várias espécies reativas nos tecidos irradiados.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Em função da baixa resposta de morte celular das células de melanoma ao tratamento por terapia fotodinâmica com fotossensibilizadores clássicos e luz visível, principalmente pela presença da melanina, e levando em consideração a capacidade de absorção da radiação infravermelha desse pigmento, esse trabalho tem como objetivo principal avaliar, em células de melanoma e melanócitos, o efeito da irradiação com laser de diodo de baixa intensidade com comprimento de onda no infravermelho 780 nm, em diferentes doses, sobre vários parâmetros celulares.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar especificamente os seguintes parâmetros celulares após irradiação com laser em células de melanoma murino B16-F10 (que tiveram a melanogênese estimulada ou inibida) e de melanócitos murino Melan-a:

- a) viabilidade celular
- b) fragmentação de DNA
- c) peroxidação lipídica
- d) produção de espécies reativas

Além disso, avaliar a produção de espécies reativas *in vitro* pela irradiação de soluções de melanina de *Sepia officinalis*.

5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

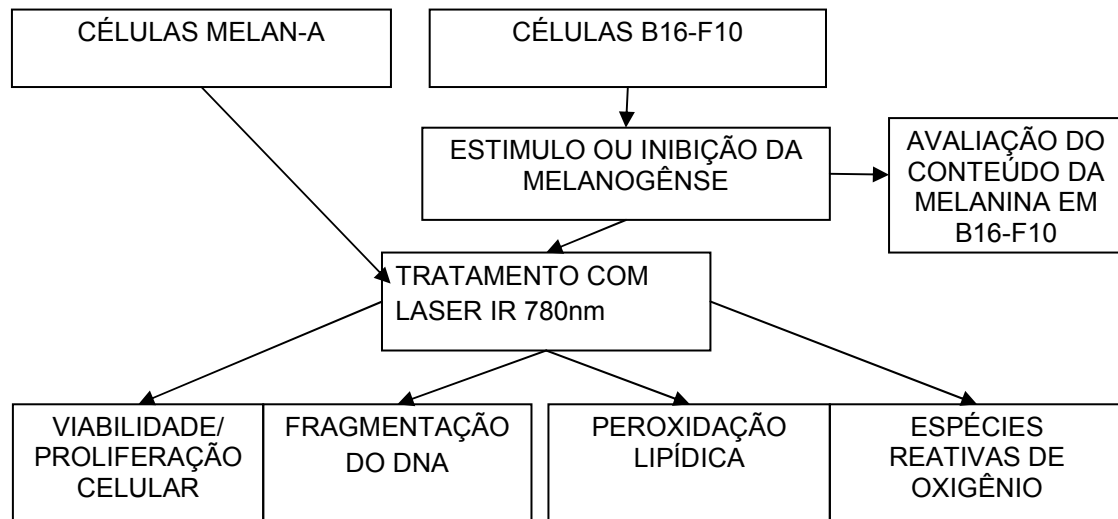


FIGURA 6 - ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL EM CÉLULAS B16-F10 E MELAN-A

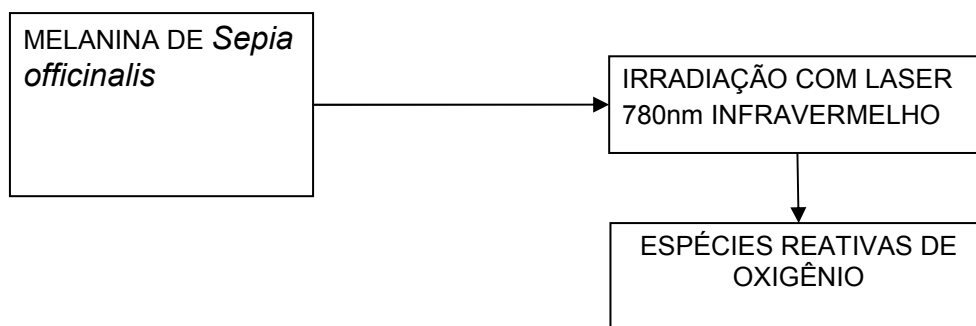


FIGURA 7 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL EM MELANINA DE *Sepia officinalis* ISOLADA

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 IRRADIAÇÃO COM LASER INFRAVERMELHO DE 780 nm.

A irradiação infravermelha utilizada nos experimentos realizados foi proveniente de um laser infravermelho 780 nm, diodo semiconductor (gálio-alumínio-arseneto) de corrente contínua (CW), voltagem de 100~240 V, frequência de 50/60 Hz, potência óptica máxima de 70 mW, com saída do feixe com ponta ativa da caneta laser de 0,0078 cm² e de 0,04 cm², classe 3b (perigo para os olhos), fabricado pela MM Optics Ltda (Brasil). Para a irradiação das células no fluxo laminar foi colocado sobre a placa de experimentos uma luva de plástico estéril transparente, para não alterar a distância de irradiação e para não contaminar as células.

No início da laserterapia, década de sessenta, acreditava-se que sempre a área atingida pelo laser de baixa intensidade no tecido irradiado era a de 1 cm², independente da potência, da dose, das características ópticas do tecido e do comprimento de onda. No entanto, recentemente, com o avanço dos equipamentos para medir a penetrabilidade da luz na matéria e com o entendimento melhor dessa interação luz-matéria, a forma de calcular a dose adequada foi alterada. A aplicação do laser pode ser pontualmente (pontos separados) ou por varredura (ponta do laser em contato e em movimento com velocidade constante). A forma pontualmente é considerada a área da ponteira de entrega do feixe laser e a varredura considerada a área da lesão a ser irradiada. A fórmula empregada é a seguinte:

$$\text{Dose (J/cm}^2\text{)} = P \text{ (W)} \times T \text{ (s)} / A \text{ (cm}^2\text{)}$$

P= potência de saída (Watts); T = tempo de irradiação (segundos) e A = área (área a ser considerada).

A área será diferente se utilizarmos a ponta ativa da caneta laser convencional que tem área de 0,04 cm², ou a ponta ativa da caneta laser especial para acupuntura que tem área de 0,0078 cm². Então, mudando-se a

ponta ativa é possível mudar a dose que está sendo aplicada no tecido, pois se muda a área, mas a potência não. Como dose é densidade de energia distribuída na área, diminui a área sem alterar a potência e o tempo de irradiação. O resultado será uma densidade maior de energia depositada no tecido ou no local irradiado.

O manual da MM Optics Ltda - Equipamentos Ópticos apresenta uma tabela para uso de lasers de baixa intensidade (alteração da dose segundo a ponta ativa da caneta). A seguir, são mostrados exemplos com as duas pontas ativas: a) 70 mW de potência de saída do laser com a ponteira 0,04cm² e irradiação por 10 s resulta em uma energia de 0,7 J, e uma dose de 17,5 J/cm²; b) 70 mW de potência de saída do laser com a ponteira 0,0078 cm² e irradiação por 10 s resulta em uma energia de 0,7 J, e uma dose de 89,7 J/cm² (LIZARELLI, 2005).

Os valores das doses de irradiação em J/cm² obtidas nos cálculos atuais, comparadas com as doses de irradiação em J/cm² de trabalhos publicados anteriormente, devem ser analisados, comparando valores e resultados. Isso porque os cálculos eram feitos utilizando como valor da área sempre 1 cm². Hoje as doses irradiadas parecem ser bem maiores que as utilizadas anteriormente, mas se conhecermos a potência do aparelho e tempo da irradiação obteremos a energia utilizada.

Neste trabalho a forma de aplicação do laser utilizada foi a pontualmente, utilizando as duas pontas ativas da caneta laser de 780 nm (0,04 e 0,0078 cm²), tempos de 10, 30 e 60 segundos, potência de 70 mW.

Os lasers concentram em seu feixe de energia somente um comprimento de onda, intensificando assim a capacidade de dano aos olhos. A exposição dos olhos aos lasers nesta faixa, mesmo por alguns segundos causam lesões muitas vezes irreversíveis (ABNT, 2007). Cada aparelho necessita de óculos de segurança específico para a proteção dos olhos. O óculos utilizado foi com armação plástica preta e lentes com filtro para irradiação 780nm para não causar lesões graves nos olhos ou até a cegueira. Esses conhecimentos são muito importantes para não expor nem operadores, nem transeuntes do laboratório aos riscos dessa irradiação.

6.2 CULTIVO CELULAR

6.2.1 Esterilização de materiais

Os materiais utilizados no laboratório de cultivo celular foram todos esterilizados em estufa a seco e em autoclave. Os materiais são: frascos de vidros para soluções, equipamento para filtração sob pressão, tampas, pipetas de vidro, e ponteiros de pipetas automáticas. Estes foram esterilizados em autoclave (Fabbe) a 120 °C, durante 30 min, sob pressão de 1 atm (atmosfera), posteriormente secos na estufa (Fabbe) 37 °C, por 24 h. Os microtubos, seringas de plástico e placas de plásticos utilizados eram novos e estéreis.

6.2.2 Meio de cultura para as células B16-F10 e MELAN-A.

O meio de cultura utilizado neste trabalho para as células B16-F10 foi o meio RPMI 1640 (Cultilab) reconstituído em água ultrapura obtida do sistema Gehaka. Para a esterilização, foi utilizado um aparelho Sartorius (alta pressão), e a filtração feita em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm (Millipore®) em câmara de fluxo laminar vertical (VECO). A solução de bicarbonato (Sigma-Aldrich) (7,5%) foi utilizada para ajustar o pH desse meio e o HEPES (Sigma-Aldrich) para o tamponamento do meio em pH 7,4. O HEPES foi esterilizado por filtração em membrana PES (JetBioFil) com poros de 0,22 µm em câmara de fluxo laminar vertical. O bicarbonato foi esterilizado em autoclave a 120 °C a 1 atm por 30 min. Depois de preparado, algumas alíquotas do meio foram mantidas por 24h na estufa a 37°C para verificação de contaminação. O meio foi suplementado com 7,5% de soro fetal bovino estéril (LGC Biotecnologia) e mantido em geladeira. O meio utilizado para os experimentos foi retirado da geladeira e previamente aquecido em banho-maria a uma temperatura de 38°C. O meio de cultura para as células Melan-a foi o mesmo meio utilizado para as células B16-F10 com adição de 200 nmol/L de PMA (12 miristato-13-acetato de forbol) (Sigma-Aldrich).

6.2.3 Soluções

6.2.3.1 Solução de Tripsina-EDTA

Essa solução era constituída, de NaCl (Sigma-Aldrich), 137 mmol/L, tripsina (1:250) (InLab), 2 mg % de vermelho de fenol, 50 mg%, KCl (Sigma-Aldrich), 5,4 mmol/L, NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), 2,3 mmol/L, glucose (Sigma-Aldrich), 5 mmol/L, Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich) 0,42 mmol/L, KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich) 0,44 mmol/L EDTA (Sigma-Aldrich), 0,53 mmol/L em água ultrapura. A filtração foi feita por aparelho Sartorius (alta pressão), o pH foi ajustado para 7,4, e posteriormente foi guardada em geladeira como solução estoque.

6.2.3.2 HBSS (solução salina balanceada de Hanks)

A solução salina balanceada de Hanks (HBSS) é constituída pela mistura de duas soluções (A e B) concentradas 20x e armazenadas a 4°C. Solução A era composta de NaCl 2,73 mol/L, KCl 107 mmol/L, CaCl₂ (Sigma-Aldrich) 25 mmol/L e MgSO₄ 7H₂O (Sigma-Aldrich) 27 mmol/L de. Solução B era composta por Na₂HPO₄ 8,5 mmol/L e glucose 111 mmol/L. Essas soluções foram preparadas em água ultrapura em volume de 50 mL e armazenadas a 4°C. Na utilização do HBSS, as soluções A e B foram misturadas (1:1), posteriormente diluídas com água ultrapura e o pH ajustado para 7,4. A solução salina balanceada foi esterilizada por filtração em membranas estéreis PES com poros de 0,22 µm (Millipore®) em câmara de fluxo laminar vertical.

6.2.3.3 Solução Salina Fosfato Tamponada (PBS)

A solução do PBS (solução salina-fosfato tamponada) estoque concentrada 5x era constituída por NaCl, 680 mmol/L, KCl 13,4 mmol/L, 7,3 mmol/L de KH₂PO₄, Na₂HPO₄ 40,5 mmol/L. O pH era ajustado para 7,4 e a solução esterilizada em autoclave (120 °C, 1 atm, 30 min) e armazenada a 4 °C.

6.3 CULTIVO DAS CÉLULAS B16-F10 E MELAN-A

Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens de células, melanoma murino B16-F10 e melanócito murino imortalizado (Melan-a). As células B16-F10 e Melan-a *in vitro* desenvolvem-se em monocamadas e foram cultivadas em garrafas estéreis (TPP) com meio de cultura RPMI 1640, acrescido de 7,5% de soro fetal bovino (SFB), sendo que para Melan-a foi adicionado neste meio 200 nmol/L de PMA. As garrafas com culturas da B16-F10 e Melan-a foram mantidas em estufa (Sanyo), em atmosfera contendo 5% de CO₂, com umidade controlada de 95% e temperatura constante de 37°C. O meio foi trocado sempre que se fez necessário. Os repiques foram feitos semanalmente seguindo protocolo do laboratório. O descolamento das células foi feito com solução de tripsina, eventualmente com rodinho de plástico (*cell scraper*). Para armazenamento das duas linhagens, as células (10⁶ m/L) foram suspensas em meio de cultura acrescido de soro fetal bovino 7,5% (v/v) e DMSO 10% (v/v), e congeladas inicialmente a -70°C, e a seguir em nitrogênio líquido. Abaixo micrografias das células no microscópio Olympus (Japão), Melan-a (FIGURA 8 A) e B16-F10 (FIGURA 8 B).

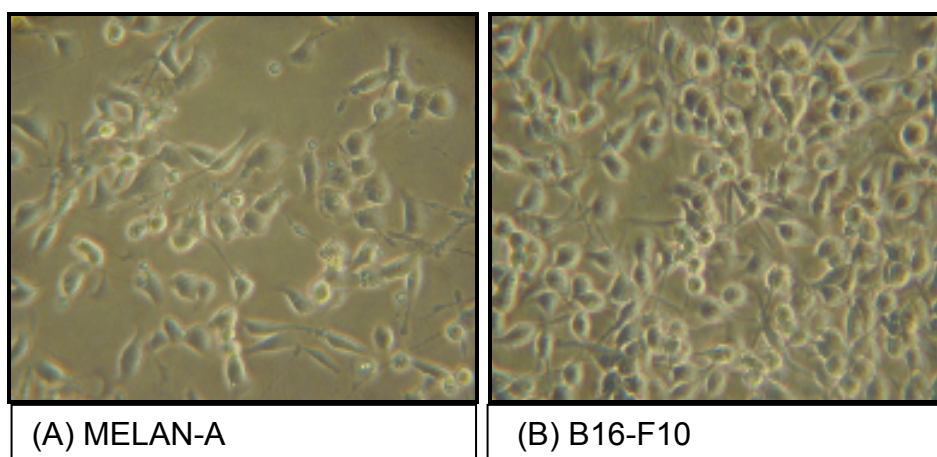


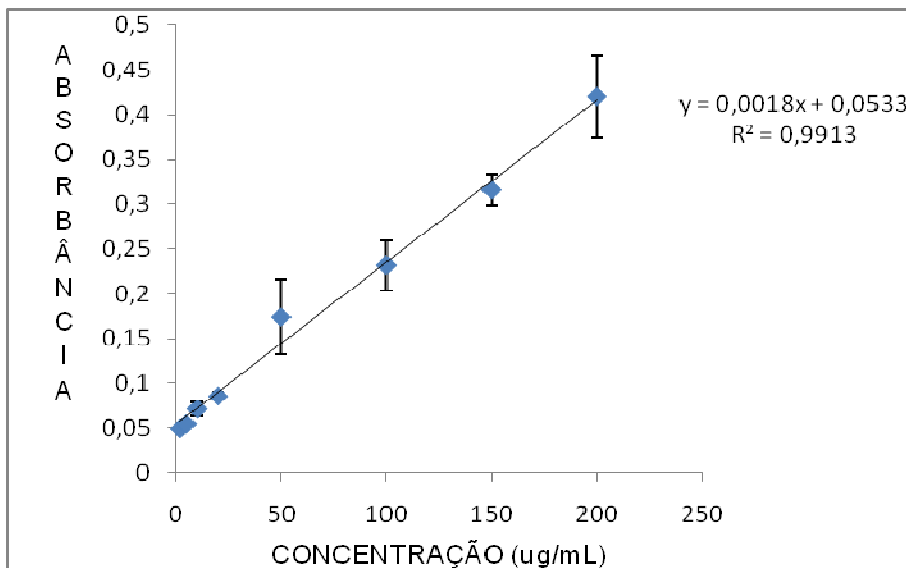
FIGURA 8 – MICROGRAFIAS DAS CÉLULAS (A) MELAN-A E (B) B16-F10 COM AUMENTO DE 100x.

FONTE: o autor (2010).

6.4 AVALIAÇÃO DA MELANOGÊNESE

Células B16-F10 foram plaqueadas em placas de 60 cm², na quantidade de 1×10^5 . Foram incubadas por 4 h em estufa sob atmosfera a 5% de CO₂ a 37°C para a adesão nas placas e posteriormente foram tratadas. O tratamento consistiu em adicionar 400 µmol/L de L-tirosina (Sigma-Aldrich) e 10 mmol/L de cloreto de amônio NH₄Cl (Sigma-Aldrich) para o estímulo da melanogênese (HOOGDUIJN *et al.*, 2003; KONGSHOJ *et al.*, 2007) e ácido kójico (Sigma-Aldrich) na concentração de 200 µmol/L para a inibição da melanogênese (SATO *et al.* 2008). Como controle foi mantido um grupo sem estímulo, apenas com o meio de cultura. Após a adição do estimulante ou do inibidor da melanogênese, as células foram incubadas por 48h. Após incubação, o meio foi retirado e as células B16-F10 e Melan-a lavadas com PBS. Com o auxílio de um rodinho (*cell scraper*), essas células foram removidas e ressuspensas em 600 µL de solução de PBS e a suspensão das células foi transferida para um microtubo. Posteriormente, uma alíquota de 500 µL dessa suspensão de células foi centrifugada a 4.000g por 10 min. Descartado o sobrenadante, ao pellet foi adicionado 200 µL de NaOH 1 mol/L. As células foram lisadas em sonicador por 30 segundos a 20 W e mantidas no escuro de um dia para o outro e em temperatura ambiente. Foi realizada então a leitura da quantidade de melanina, por espectrofotometria utilizando leitor de microplacas Tecan infinite 200 series (Suíça), com o programa i-control em 470 nm (SHIMADA *et al.*, 2001). Para analisar os resultados utilizou-se uma curva de calibração de melanina de *Sepia officinalis* (Sigma-Aldrich) em várias concentrações que variaram de 2 a 200 µg/mL (FIGURA 9A). Os restantes 100 µL da suspensão de células foram lisadas em um sonicador por 30 segundos a 20W e 5 µL dessas amostras foram colocadas em poços de uma placa de 96 poços com 250 µL de solução de Bradford (BRADFORD,1976). Foi feita a leitura da dosagem de proteínas, em leitor de microplacas Tecan infinite 200 series a 590nm. Para análise dos resultados foi feito uma curva de calibração com albumina bovina (Sigma-Aldrich) em várias concentrações que variaram de 0,5 a 2 µg/mL (FIGURA 9B).

A



B

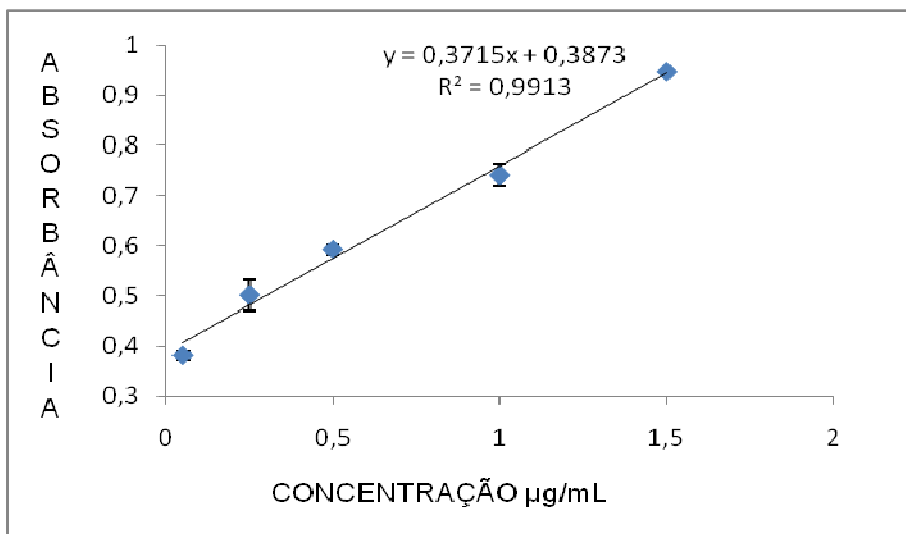


FIGURA 9 – (A) CURVA DE CALIBRAÇÃO DA MELANINA DE *Sepia officinalis*, (B) CURVA DE CALIBRAÇÃO DE PROTEÍNA

FONTE : o autor (2010)

NOTA: (A) Melanina de *Sepia officinalis* foi dissolvida em NaOH 1 mol/L à 90 °C por 60 min para uma concentração final de 200 µg/mL. Foram feitas diluições para concentrações de 2 a 150 µg/mL com solução de NaOH 1 mol/L, leitura da absorbância em 470 nm em leitor de microplaca. (B) Albumina bovina foi dissolvida em H₂O ultrapura e foram feitas diluições nas concentrações de 0,5 a 2 µg/mL. Para leitura foi usado 5 µL de cada concentração de albumina bovina preparada e foram adicionados 250 µL de solução de Bradford, leitura da absorbância em 590 nm em leitor de microplaca.

6.5 TRATAMENTOS DAS CÉLULAS COM LASER

Para realização dos ensaios para avaliação de viabilidade celular foram plaqueadas cerca de 1×10^4 células por poço na placa de 96 poços ou em placas de 24 poços (células B16-F10 e células Melan-a). A contagem da quantidade de células foi feita na câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas em poços espaçados, pulando poços e alternando o início das fileiras dos poços, para evitar o contato da energia laser irradiada de um poço para outro. As células foram incubadas para aderência em meio RPMI com 7,5% SFB. Posteriormente foram feitos os tratamentos para estímulo (400 $\mu\text{mol/L}$ de L-tirosina e 10 nmol/L de cloreto de amônio) e inibição (200 $\mu\text{mol/L}$ de ácido kójico) da melanogênese em 48h. Para a Melan-a o tratamento foi somente na condição sem estímulo com o meio usual de cultivo (RPMI 7,5% SFB com PMA 200 nmol/L). Após esse tratamento, as células foram irradiadas com diferentes dosagens e posterior incubação por 24, 48 e 72 h.

6.5.1 Viabilidade celular pelo método de Cristal Violeta

A viabilidade celular foi quantificada através do corante cristal violeta, preparado a 0,2% em etanol 2%, que faz a coloração dos ácidos nucléicos das células aderidas e fixadas (KUENG *et al.*, 1989). Após os tratamentos com modulação da melanogênese e irradiação com laser infravermelho 780nm, o meio foi retirado e as células foram incubadas com a solução do corante por 2 a 5 min, depois os poços foram bem lavados (em torno de 5 a 10 vezes com PBS) e o corante eluído com 200 μL de solução de citrato de sódio 0,05 mol/L em etanol 50%, durante 10 min. A leitura foi realizada em 540nm de absorbância em leitor de microplacas Tecan infinite 200 series. Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle (100%).

6.5.2 Detecção de espécies reativas (ROS) com sonda DCF-DA (2,7 diacetato diclorofluoresceína)

6.5.2.1 DCF-DA em melanina de *Sepia officinalis*

A detecção das espécies reativas de oxigênio pela sonda DCF-DA neste trabalho foi realizada de acordo com método descrito por Armstrong; Whiteman (2007), com modificações devido às condições diferentes utilizadas no método. A DCF-DA pode ser oxidada pelo H_2O_2 na presença de um desses componentes (peroxidases, citocromo C e Fe^{2+}), gerando um composto fluorescente o DCF (MARCHESI *et al.* 1999). Esse composto fluorescente é detectado por leitor de microplaca.

Foram realizados ensaios com a DCF-DA em solução de DMSO (dimetilsulfóxido) para análise de espécies reativas de oxigênio. Em função dos resultados obtidos, foram testadas diferentes condições experimentais.

Inicialmente foi realizado um ensaio com DMSO, DCF-DA, H_2O_2 , melanina e laser infravermelho 780nm. Os ensaios foram feitos em placa de fluorescência de 96 poços, em triplicata para cada amostra. Cada poço com 200 μ L de soluções no final do plaqueamento. A solução de melanina de *Sepia officinalis* (2mg/mL) foi preparada em NaOH 1 mol/L. A sonda DCF-DA foi preparada em DMSO em uma concentração de 10 μ mol/L. O H_2O_2 foi preparado à uma concentração de 100 μ mol/L em água. O laser infravermelho de 780 nm, 70 mW, foi programado para irradiar doses de 89,7 e 538,2 J/cm² com ponta ativa de 0,0078 cm², por 10 e 60s. O plaqueamento foi feito no escuro (iluminação indireta com penumbra), seguindo uma ordem: inicialmente colocado DMSO em todos os poços e em quantidades para completar 200 μ L, melanina, DCF-DA, H_2O_2 , nas concentrações finais de 0,1 mg/mL; 0,5 μ mol/L e 5 μ mol/L, respectivamente. Os poços foram cobertos com papel alumínio para evitar a luz. Os poços foram irradiados e, após incubação por uma hora em estufa 37°C, 5% CO₂, foi feita a leitura da fluorescência, para detecção da oxidação da sonda com comprimento de onda de 480 nm de excitação e 534 nm de emissão em leitor de microplaca com fluorescência (Tecan).

No segundo ensaio foi utilizado o Fe^{2+} para oxidação da sonda, como descrito por MARCHESI *et al.*, 1999. Foi utilizado também o NaOH na concentração final de 50 mmol/L no controle positivo com H_2O_2 , pois a melanina foi dissolvida em NaOH. Em placa de fluorescência de 96 poços, em triplicata para cada amostra. Cada poço com 200 μL de soluções no final do plaqueamento que foi feito no escuro (iluminação indireta com penumbra), seguindo uma ordem: inicialmente colocado DMSO em todos os poços e em quantidades para completar 200 μL , melanina, DCF-DA, H_2O_2 , NaOH, Fe^{2+} nas concentrações finais de 0,1 mg/mL; 0,5 $\mu\text{mol/L}$; 5 $\mu\text{mol/L}$; 50 mmol/L e 8 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Posteriormente o tratamento com irradiação de laser infravermelho 780nm doses 89,7 e 538,2 J/cm^2 nas amostras com melanina. Após incubação por uma hora em estufa 37°C , 5% CO_2 , foi feita a leitura da fluorescência para detecção da oxidação da sonda com comprimento de onda de 480 nm de excitação e 534 nm de emissão em leitor de microplaca com fluorescência (Tecan).

O terceiro ensaio foi feito com tampão, usando H_3PO_4 (na concentração final de 32,5 mmol/L para neutralizar o NaOH (50 mmol/L). As amostras foram plaqueadas em triplicatas e com vários controles, tais como: DMSO, H_3PO_4 e NaOH; DMSO, H_3PO_4 , NaOH e Fe^{2+} ; DMSO, H_3PO_4 , NaOH e DCF-DA; DMSO, H_3PO_4 , NaOH, Fe^{2+} e DCF-DA; DMSO, H_3PO_4 , melanina, Fe^{2+} e DCF-DA e o controle positivo (DMSO, H_3PO_4 , NaOH, Fe^{2+} , DCF-DA e H_2O_2). O plaqueamento foi feito no escuro cobrindo a placa de fluorescência com papel alumínio. Os poços foram irradiados e, após incubação por uma hora em estufa 37°C , 5% CO_2 , foi feita a leitura da fluorescência para detecção da oxidação da sonda, com comprimento de onda de 480 nm de excitação e 534 nm de emissão em leitor de microplaca com fluorescência (Tecan).

6.5.2.2. DCF-DA em células B16-F10 e Melan-a

Os experimentos foram realizados nestas células para verificar se ocorreria a geração de espécies reativas de oxigênio nas mesmas após a irradiação com laser infravermelho 780nm. Os experimentos foram feitos com algumas adaptações e modificações do protocolo descrito por (ARMSTRONG;

WHITEMAN, 2007); (CHIGNELL; SIK, 2003), para utilizar nas células B16-F10 e Melan-a.

Para os experimentos com a DCF-DA, as células B16-F10 foram plaqueadas em placas de 60 cm², na quantidade de 1×10^5 em triplicata. Foram incubadas para a adesão por 4 h em estufa sob atmosfera a 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente, foram tratadas por 48h com 400 µmol/L de L-tirosina e 10 mmol/L de cloreto de amônio para o estímulo da melanogênese ou ácido kójico na concentração de 200 µmol/L para a inibição da melanogênese ou mantidas sem estímulo apenas com o meio de cultura (RPMI 7,5% SFB). Para as células Melan-a foram feitos os mesmos procedimentos, o tratamento foi somente na condição sem estímulo com o meio usual de cultivo (RPMI 7,5% SFB com PMA 200 µmol/L). As células foram soltas com 50 µL de tripsina e ressuspensas em 200 µL de solução de PBS. A suspensão das células foi transferida para um microtubo. As células foram contadas (para obter quantidade iguais de célula em cada poço) e plaqueadas (1×10^5 células/poço) em placas de fluorescência, foi acrescida 10 µL de a solução de DCF-DA (100 µmol/L) e PBS até completar 200 µL, o procedimento foi realizado em ambiente escuro ou iluminação indireta. Foram plaqueadas em triplicatas deixando controles: controle somente com células e controle positivo com H₂O₂ 100 µmol/L. A irradiação foi feita com laser infravermelho de 780 nm, 70 mW, com ponta ativa de 0,0078 cm² nas B16-F10, nas doses 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm² tanto para as células sem estímulo, com inibição da melanogênese e estímulo da melanogênese. Nas Melan-a, a irradiação foi feita nas doses 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm². Após a irradiação, a placa foi recoberta com alumínio e incubada por uma hora em estufa 37C°, 5% CO₂. A leitura da fluorescência foi feita com comprimento de onda de 485 nm de excitação e 535 nm de emissão em leitor de microplaca com fluorescência (Tecan).

Foi também modificado o experimento para verificar se a geração de espécies reativas na B16-F10 com estímulo da melanogênese, novamente seriam captadas pela sonda DCF-DA. Esses novos experimentos foram feitos seguindo outros protocolos com modificações e adaptações para estas células, descrito por Chignell; Sik (2003); Wang; Joseph (1999).

Foram realizados os experimentos com DCF-DA nas células B16-F10 com a melanogênese estimulada e com a Melan-a. As células foram plaqueadas diretamente em placas de fluorescência e incubadas para a adesão por 4 h em estufa sob atmosfera a 5% de CO₂ a 37°C. Após tratamento para estímulo da melanogênese com 400 µmol/L de L-tirosina e 10 mmol/L de cloreto de amônio (NH₄Cl), as células foram incubadas por 48 h. O meio foi removido, lavado com PBS. Em ambiente escuro ou iluminação indireta foi adicionado 10 µL de DCF-DA 100 µmol/L e PBS completando 200 µL. Após a incubação de 30 min, foi retirado o meio, as células foram lavadas uma vez com PBS e foi colocado novo PBS acrescido de H₂O₂ para concentração final de 100 µmol/L nos poços de controles positivos, os demais foram irradiados com dose de 538,2 J/cm² e após 10 min de incubação, as células foram irradiadas novamente com dose de 538,2 J/cm² e imediatamente foi feita leitura da fluorescência, para detecção da oxidação da sonda com comprimento de onda de 485 nm de excitação e 530 nm de emissão no leitor de microplaca Tecan.

Para as células Melan-a, o experimento foi realizado plaqueando as células em placas de fluorescência somente na condição sem estímulo com o meio usual de cultivo (RPMI 7,5% SFB com PMA 200 µmol/L) e após incubação por 24 h em estufa sob atmosfera a 5% de CO₂ a 37°C, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS. Em ambiente escuro ou iluminação indireta, foi adicionado 10 µL de DCF-DA 100 µmol/L e PBS completando 200 µL. Após a incubação de 30 min, foi retirado o PBS, as células foram lavadas uma vez com PBS e foi colocado novo PBS acrescido de H₂O₂ para concentração final de 100 µmol/L nos poços de controles positivos e os poços de tratamento foram irradiados com dose de 538,2 J/cm² e mantidos sob incubação por mais 10 min. Após essa incubação, as células foram irradiadas novamente com dose de 538,2 J/cm² e imediatamente foi feita leitura da fluorescência para detecção da oxidação da sonda, com comprimento de onda de 485 nm de excitação e 535 nm de emissão no leitor de microplaca Tecan.

6.5.3 Peroxidação lipídica

A determinação da lipoperoxidação em células B16-F10 e Melan-a foi realizada de acordo ao método descrito por OHKAWA *et al.* (1979) com modificações. Foram plaqueadas 4×10^5 células B16-F10 ou Melan-a em placas de 6 poços em triplicatas para cada amostra, após 4h para a adesão as células foram tratadas. As células B16-F10 com condição sem estímulo da melanogênese, com melanogênese estimulada (L-tirosina 400 $\mu\text{mol/L}$ e 10 mmol/L de NH_4Cl) ou inibida (ácido kójico 200 $\mu\text{mol/L}$) e as Melan-a o tratamento foi somente na condição sem estímulo com o meio usual de cultivo (RPMI 7,5% SFB com PMA 200 nmol/L). As células foram incubadas por 48h e irradiadas com laser infravermelho 780 nm, 70 mW, com ponta ativa de 0,0078 cm^2 , dose de 538,2 J/cm^2 para B16-F10 e doses 89,7 e 538,2 J/cm^2 para a Melan-a. Após 24 h da irradiação, as células foram soltas das placas com tripsina. Posteriormente foram sonicadas durante 30 segundos a 20 W, alíquotas de 250 μL foram retiradas e misturadas com 100 μL de SDS 7%, 150 μL de ácido TCA (ácido tricloroacético) 15%, e 150 μL de TBA (ácido tiobarbiturico) 0,67% (preparado em HCl 67 mmol/L , no escuro e sob aquecimento). As amostras foram agitadas e incubadas a 95°C durante 1 hora, seguida de resfriamento em banho de gelo e 2 mL de n-butanol foram adicionados. Em seguida, foi realizada forte agitação em vortex e posterior centrifugação a 4000 x g durante 10 min. Foram distribuídos em torno de 2 mL da fase orgânica de cada amostra em uma cubeta de quartzo para a leitura no espectrofotômetro de fluorescência (Hitachi, modelo U – 2001 UV/VIS) com comprimento de onda de 520 nm de excitação e 553 nm de emissão

6.5.4 Avaliação da fragmentação do DNA

O experimento da fragmentação de DNA foi feito utilizando eletroforese em gel de agarose, adaptado segundo protocolo de KASIBHATLA *et al.* (2009). Foram plaqueadas $2,0 \times 10^5$ células B16-F10 ou Melan-a em placas de 60 cm^2 em triplicatas para cada amostra. Após aderência das mesmas (mais ou menos 4h), as células foram tratadas. O tratamento das Melan-a foi somente com meio

RPMI suplementado com 7,5% de SFB e 200 nmol/L de PMA. As células B16-F10 foram tratadas com RPMI suplementado com 7,5% de SFB ou tiveram a melanogênese inibida com 200 $\mu\text{mol/L}$ de ácido Kójico ou estimulada com 400 $\mu\text{mol/L}$ de L-tirosina e 10 mmol/L de cloreto de amônio. Esses tratamentos de inibição ou de estímulo da melanogênese foram feitos por 48h. Posteriormente, as células Melan-a foram irradiadas com laser 780 nm, 70 mW, com ponta ativa de 0,0078 cm^2 , nas doses de 89,7 e 538,2 J/cm^2 e as B16-F10 na dose de 538,2 J/cm^2 . Após 24h, as células foram removidas das placas com EDTA (2 mmol/L dissolvido em PBS), ressuspendidas em 600 $\mu\text{mol/L}$ de PBS/EDTA por 5 min, colocadas em microtubo e centrifugadas à 3000g por 5 min à 4 °C, descartando-se o sobrenadante ao final. Foram adicionados 20 μL da solução tampão de lise TES (EDTA 20 mmol/L, Tris, 100 mmol/L, pH 8,0 e 0,8% p/v SDS) no *pellet* e foram agitadas gentilmente com a mão, não usando vortex. Após a lise, as amostras foram mantidas no gelo. Posteriormente, foram adicionados 10 μL de RNase A (500 U/mL) e as amostras foram incubadas por 120 min no banho 37°C. Em seguida, foram adicionados 10 μL de Proteinase K (solução 20mg/mL) em cada amostra e agitadas levemente com a mão e incubadas overnight à 50 °C. A dosagem de DNA foi feita em 260 nm no Nanodrop (Thermo Scientific-USA), para cálculos da concentração de DNA nas mesmas. Foi preparado gel de agarose à 1,5% e posteriormente colocado na cuba de eletroforese. Foram aplicados 10 μL das amostras em cada poço do gel. No primeiro poço foi aplicado um marcador de peso molecular do DNA (Fermentas Life Sciences, Gene Ruter 1 Kb DNA Ladder 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). A cuba foi preenchida com tampão TAE (40 mmol/L de Tris-Acetato e 1 mmol/L de EDTA). A corrida foi realizada a 35 V e 400 mA por aproximadamente 4 h. O gel foi incubado em solução de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) com tampão TAE por 1h e lavado com água destilada por 10 min. A revelação do gel foi feita com luz UV (ultravioleta) e a aquisição da imagem foi feita pelo transiluminador (UVP, 2UV Transilluminator, Biolmaging Systems,USA).

6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados deste trabalho foram analisados estatisticamente pelo programa GraphPad Prism5 (GraphPad Software Inc.), os experimentos com repetições e os tratamentos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado para avaliação das diferenças entre os tratamentos e controle, o mesmo permitiu estabelecer a diferença mínima significativa entre duas médias e a significância dos resultados foi estabelecida como $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 AVALIAÇÃO DA MELANOGÊNESE NAS CÉLULAS B16-F10

O estímulo da melanogênese em células B16-F10 foi feito por 48h utilizando o aminoácido L-tirosina na concentração de 400 $\mu\text{mol/L}$ com cloreto de amônio (NH_4Cl) a 10 mmol/L , conforme descrito por Hoogduijn *et al.* (2003). Esses autores utilizaram esses estimuladores por 2 dias em cultura de melanócitos de caucasianos, obtiveram um aumento de 3,1 vezes nos níveis de melanina. Nesse protocolo, o NH_4Cl é capaz de neutralizar o pH de organelas ácidas como os melanossomos colaborando para aumentar a atividade da tirosinase e facilitar a entrada de L-tirosina no melanossomo.

Kongshoj *et al.* (2007), com os mesmos estimuladores em células de melanoma humano (LND-1), também tiveram a melanogênese estimulada, porém não relataram a percentagem e sim as diferenças de absorbâncias (0= controle e 0,189= melanogênese estimulada), a leitura foi feita em *Nanodrop spectrophotometer* ND-1000 em 340nm.

Para a inibição da melanogênese foi utilizado o ácido Kójico 200 $\mu\text{mol/L}$, onde, Sato *et al.* (2008) tiveram a melanogênese inibida em 64% nas células de melanoma B16, tratadas por cinco dias. Neste trabalho foram utilizados linhagens celulares diferentes das utilizadas nos trabalhos destes autores, mas os resultados obtidos na melanogênese inibida ou estimulada, concordam em parte com resultados obtidos pelos autores citados. Na FIGURA 10 verificamos que houve estímulo de 671,6% e inibição de 31,4% no ensaio da melanogênese das B16-F10 nas condições utilizadas.

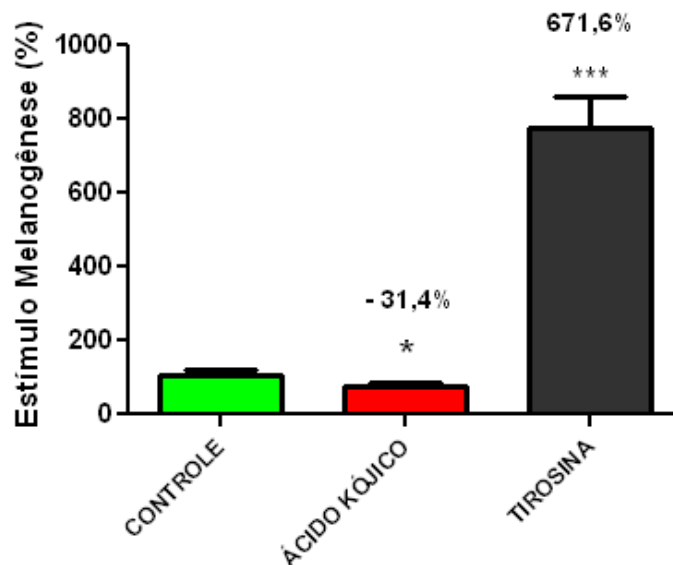


FIGURA 10 – DOSAGEM DE MELANINA DAS CÉLULAS B16-F10

FONTE: o autor (2010)

NOTA: As células B16-F10 foram plaqueadas 1×10^5 células em placas 60 cm² e incubadas por 4 h. Tratadas por 48h com 400 $\mu\text{mol/L}$ de L-tirosina e cloreto de amônio (NH_4Cl) a 10 mmol/L ou ácido Kójico na concentração de 200 $\mu\text{mol/L}$. Após a lise celular com NaOH 1 mol/L, a suspensão foi sonicada e mantida no escuro. Controle 100% contém células B16-F10 tratadas somente com o meio de cultura RPMI 7.5% SFB. Foi feita a leitura a 470 nm. Os resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores de 4 experimentos em triplicata. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

7.2 EFEITOS DO LASER INFRAVERMELHO 780 nm

7.2.1 Viabilidade das células B16-F10 e Melan-a

Na FIGURA 11 são mostrados os resultados da avaliação da viabilidade de células B16-F10 após 24 h de irradiação com laser infravermelho 780 nm nas doses de 17,5, 52,5 e 105 J/cm². Não foram observadas alterações em células B16-F10 nas condições sem estímulo, ou com melanogênese inibida (ÁCIDO KÓJICO), ou estimulada (TIROSINA).

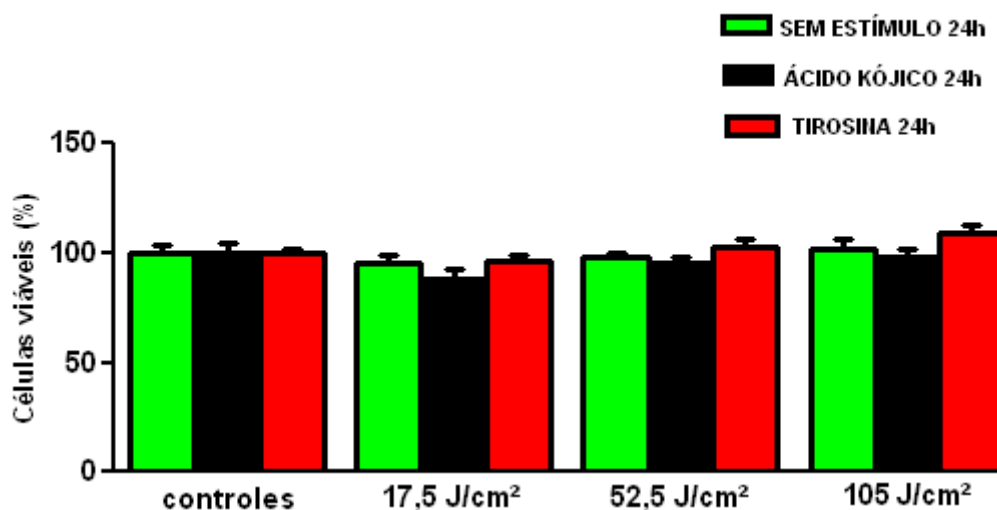


FIGURA 11 - VIABILIDADE CELULAR DA B16-F10 APÓS 24 h DE IRRADIAÇÃO NAS DOSES DE 17,5, 52,5 e 105 J/cm², NA CONDIÇÃO SEM ESTÍMULO E COM TRATAMENTOS DE ÁCIDO KÓJICO E TIROSINA

FONTE: o autor (2010)

NOTA: As células foram plaqueadas em placas de 24 poços com 1×10^5 de células/poço, a melanogênese foi inibida com 200 $\mu\text{mol/L}$ de ácido kójico e estimulada com 400 $\mu\text{mol/L}$ de L-tirosina e 10 mmol/L de cloreto de amônio. Após 24h da irradiação com laser 780nm, 70 mW, ponta ativa de 0,04 cm², doses de 17,5, 52,5 e 105 J/cm², a viabilidade foi analisada pelo método do cristal violeta como descrito em materiais e métodos no item 6.5.1. Controles 100% contém células B16-F10 com tratamentos sem estímulo, melanogênese inibida e melanogênese estimulada. Os resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores de cinco experimentos em triplicata.

Quando as células B16-F10 sem estímulo foram irradiadas com laser infravermelho 780 nm nas doses de 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm², a viabilidade foi analisada após 24 h, 48 h e 72 h da irradiação. Foi observado aumento de 38,9 % na viabilidade das células irradiadas com 538,2 J/cm², 24 h após irradiação em relação ao controle de 24 h, FIGURA 12. Nas outras dosagens e tempos não houve diferença estatística significativa em relação ao controle.

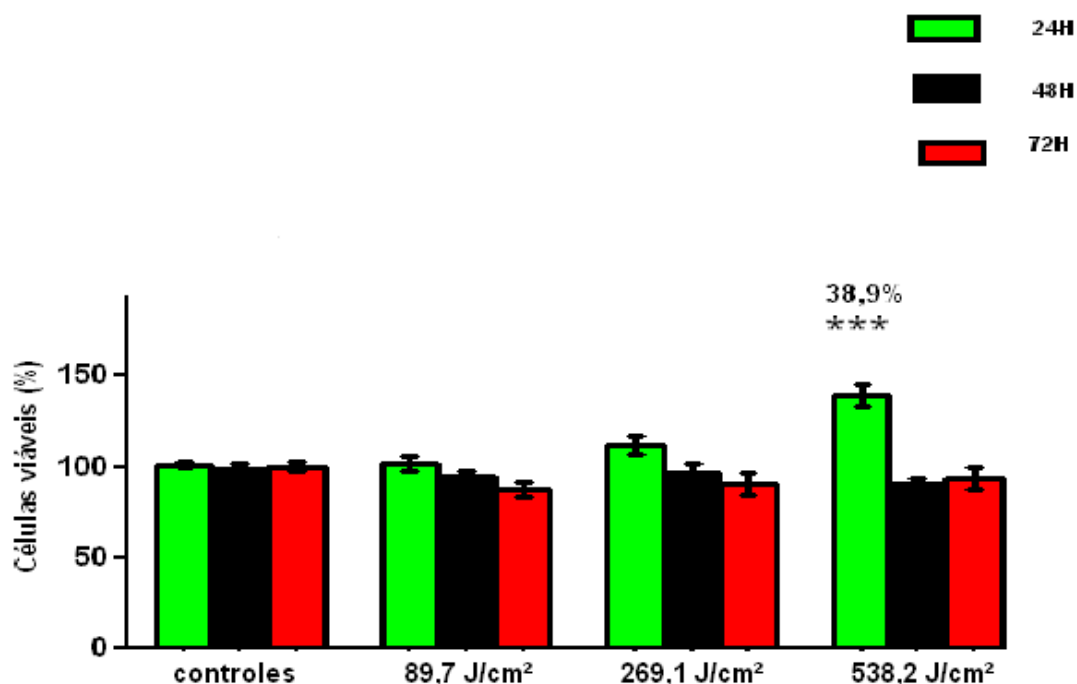


FIGURA 12 - VIABILIDADE CELULAR DA B16-F10 APÓS 24, 48, 72 h DA IRRADIAÇÃO COM DOSES DE 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm² NA CONDIÇÃO SEM ESTÍMULO

FONTE: o autor (2010)

NOTA: As células foram plaqueadas em placas de 96 poços com 1×10^4 de células/poço. A viabilidade foi avaliada em 24, 48 e 72 h após irradiação com laser 780nm, 70 mW, ponta ativa de 0,0078 cm², doses de 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm², pelo método do cristal violeta como descrito em materiais e métodos no item 6.5.1. Controle 100% contém células B16-F10 tratadas somente com o meio de cultura RPMI 7.5% SFB. Resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores de cinco experimentos em triplicata. *** $p < 0,001$ em relação aos controle 24h.

A irradiação com laser infravermelho 780 nm nas doses 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm² não alterou a viabilidade das células B16-F10 com inibição da melanogênese nos tempos 24, 48 e 72 h após irradiação, FIGURA 13.

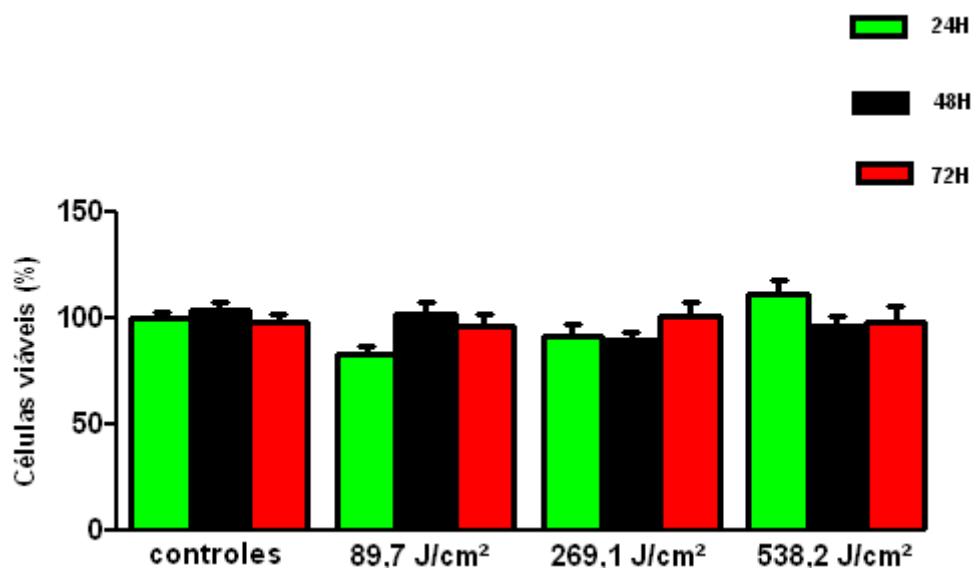


FIGURA 13 - VIABILIDADE CELULAR DA B16-F10 APÓS 24, 48, 72 h DA IRRADIAÇÃO COM DOSES DE 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm² COM TRATAMENTO DE ÁCIDO KÓJICO

FONTE: o autor (2010)

NOTA: As células foram plaqueadas em placas de 96 poços com 1×10^4 de células/poço na presença de ácido kójico (200 $\mu\text{mol/L}$), irradiação com laser 780nm, 70 mW, ponta ativa de 0,0078 cm², doses de 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm². A viabilidade foi avaliada em 24, 48 e 72 h após irradiação, pelo método do cristal violeta como descrito em materiais e métodos no item 6.5.1. Controles 100% contém células B16-F10 com melanogênese inibida. Resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores de cinco experimentos em triplicatas.

As células B16-F10 com a melanogênese estimulada com 400 $\mu\text{mol/L}$ de L-tirosina e 10 mmol/L de cloreto de amônio (NH₄Cl) tiveram leve tendência ao aumento na viabilidade nos tempos 48 e 72 h, porém não estatisticamente significativa em relação ao controle, quando irradiadas com laser infravermelho 780 nm nas doses de 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm² (FIGURA 14). Foram feitos novos experimentos com troca de meio todos os dias e a tendência se repetiu, mas não de forma estatisticamente significativa em relação aos controles 48 e 72 h (dados não mostrados).

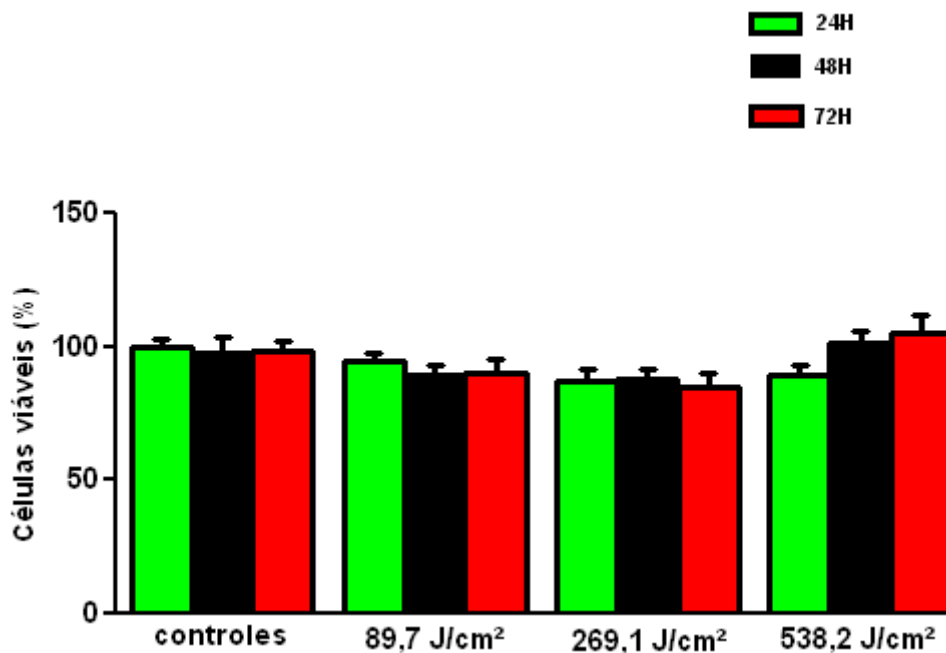


FIGURA 14 - VIABILIDADE CELULAR DA B16-F10 APÓS 24, 48, 72 h DA IRRADIAÇÃO COM DOSES DE 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm² COM TRATAMENTO DE TIROSINA E NH₄Cl

FONTE: o autor (2010)

NOTA: As células foram plaqueadas em placas de 96 poços com 1×10^4 de células/poço com L-tirosina 400 $\mu\text{mol/L}$ e NH₄Cl 10 mmol/L e irradiadas com laser infravermelho 780nm, 70 mW, ponta ativa de 0,0078 cm², doses de 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm². A viabilidade foi avaliada em 24, 48 e 72 h após irradiação, pelo método do cristal violeta como descrito em materiais e métodos no item 6.5.1. Controles 100% contém células B16-F10 com a melanogênese estimulada. Resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores de cinco experimentos em triplicatas.

A linhagem Melan-a foi irradiada com laser infravermelho 780 nm nas doses de 89,7, 538,2 e 1076,4 J/cm² na condição sem estímulo, ou seja, com meio RPMI 7,5% SFB e 200 $\mu\text{mol/L}$ de PMA, após 24, 48, 72 h foi avaliada a viabilidade celular e foi observada uma diminuição de 23% na viabilidade celular da Melan-a com 89,7 J/cm² em 48 h após a irradiação. Nos outros tempos e doses não houve diferenças estatisticamente significativas, FIGURA 15.

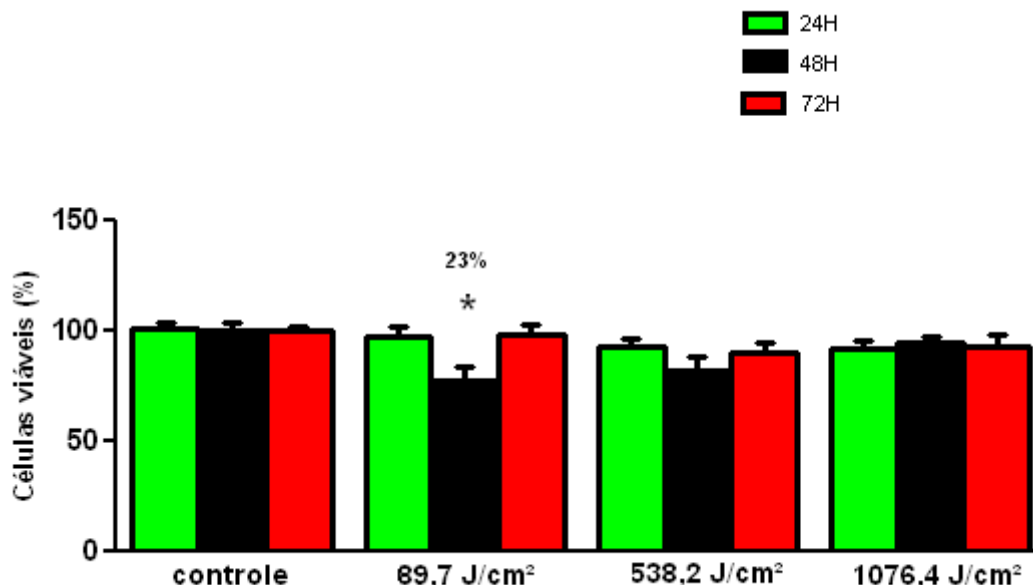


FIGURA 15 - VIABILIDADE CELULAR DA MELAN-A APÓS 24, 48 e 72 h DA IRRADIAÇÃO NAS DOSES DE 89,7, 538,2 e 1076,4 J/cm² NA CONDIÇÃO SEM ESTÍMULO

FONTE: o autor (2010)

NOTA: As células Melan-a foram plaqueadas em placas de 96 poços com 1×10^4 de células/poço. A viabilidade foi avaliada em 24, 48 e 72 h depois de irradiadas com laser infravermelho 780nm, 70 mW, ponta ativa de 0,0078 cm², doses de 89,7, 538,2 e 1076,4 J/cm², pelo método do cristal violeta como descrito em materiais e métodos no item 6.5.1. Controle 100% contém células Melan-a tratadas somente com o meio de cultura RPMI 7.5% SFB e PMA. Resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores de cinco experimentos em triplicata. * $p < 0,05$ em relação ao controle de 48h.

7.2.2 Detecção de espécies reativas de oxigênio em B16-F10 e MELAN-A com sonda DCF-DA (2,7-diacetato diclorofluoresceína)

A geração de espécies reativas nas células pode levar a lesões nos tecidos do organismo, causando danos ao DNA, às proteínas e aos lipídeos. Isso ocorre quando há o estresse oxidativo, ou seja, um desequilíbrio entre geração de espécies reativas e as defesas contra estas. É justificável verificarmos se a irradiação com esse laser em células que contenham

melanina gera espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL, 2005; HERMES-LIMA, 2004; WINTERBOURN, 2008).

Neste trabalho foram irradiadas duas linhagens celulares, as B16-F10 e Melan-a com o laser infravermelho 780 nm e utilizada uma sonda que detecta espécies reativas de oxigênio a DCF-DA seguindo o protocolo com modificações e alterações descrito por (ARMSTRONG; WHITERMAN, 2007; CHIGNELL; SIK, 2003). A irradiação com o laser foi feita depois de plaqueadas as células e adicionada a sonda DCF-DA nas placas de fluorescência. O controle positivo destes experimentos com células B16-F10 e Melan-a será o que contém H_2O_2 .

A irradiação de B16-F10 sem estímulo, ou seja, somente com meio RPMI 7,5% de SFB com laser infravermelho 780nm, doses de 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm^2 , não promoveu geração de espécies reativas nas células irradiadas em relação ao controle que contém as células com a sonda DCF-DA, FIGURA 16.

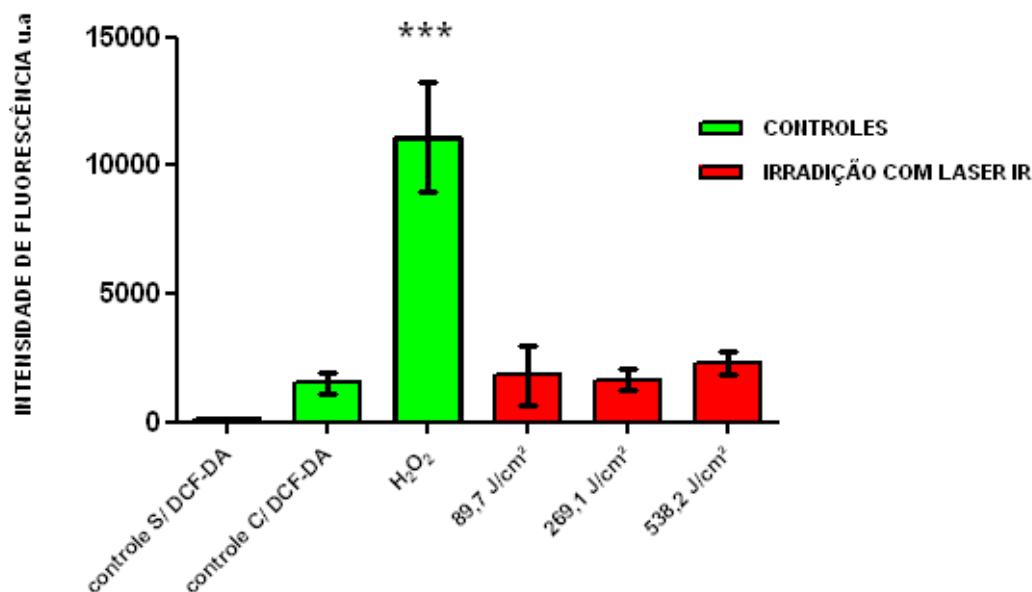


FIGURA 16 - DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM B16-F10 APÓS 1 h DA IRRADIAÇÃO COM DOSES DE 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm² NA CONDIÇÃO SEM ESTÍMULO

FONTE: o autor (2010)

NOTA: As células B16-F10 sem estímulo foram plaqueadas em placas de fluorescência de 96 poços com 1×10^5 células/poço. Os controles são células B16-F10 com e sem DCF-DA. O controle positivo contém células B16-F10 com DCF-DA (5 $\mu\text{mol/L}$) e H₂O₂ (100 $\mu\text{mol/L}$). Após adição de DCF-DA, as células foram irradiadas com laser infravermelho 780 nm, 70 mW, ponta ativa de 0,0078 cm², doses de 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm². Os resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores de fluorescência (excitação $\lambda=485$ nm e emissão $\lambda=534$ nm), de três experimentos em triplicata. *** $p < 0,001$ em relação ao controle com ou sem DCF-DA.

As células B16-F10 com a melanogênese inibida, com 200 $\mu\text{mol/L}$ de ácido kójico, foram irradiadas com laser infravermelho 780nm, doses de 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm². A sonda DCF-DA não demonstrou geração de espécies reativas de oxigênio nas células irradiadas em relação ao controle que contém células e sonda DCF-DA, FIGURA 17.

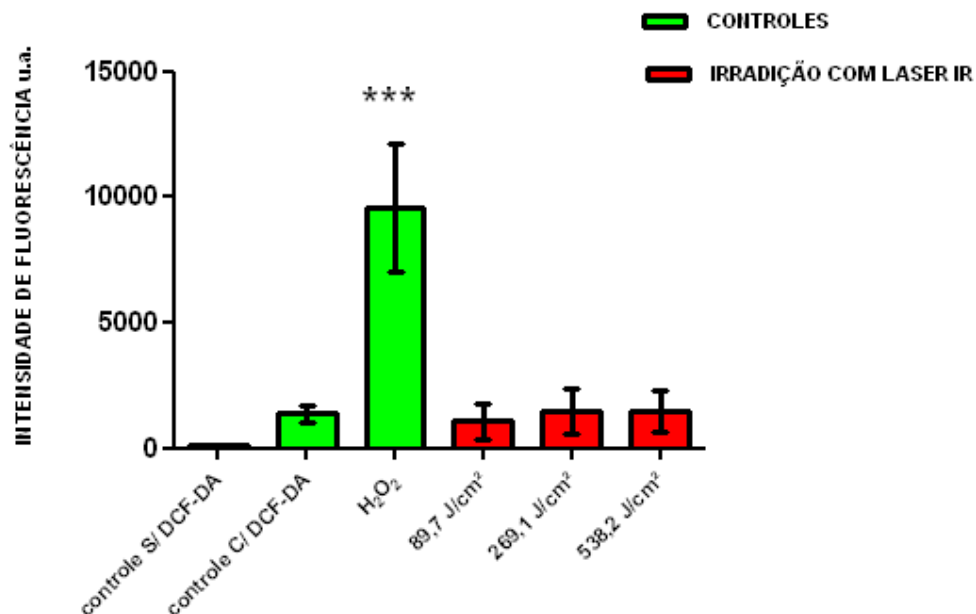


FIGURA 17 - DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM B16-F10 APÓS 1 h DA IRRADIAÇÃO COM DOSES DE 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm² COM TRATAMENTO DE ÁCIDO KÓJICO

FONTE: o autor (2010)

NOTA: As células B16-F10 foram plaqueadas em placas de fluorescência de 96 poços com 1×10^5 células/poços e meio com ácido kójico 200 $\mu\text{mol/L}$. Os controles são células B16-F10 com e sem DCF-DA. O controle positivo com DCF-DA (5 $\mu\text{mol/L}$) e H₂O₂ (100 $\mu\text{mol/L}$). Após adição de DCF-DA, as células foram irradiadas com várias dosagens de laser infravermelho 780 nm, 70 mW, ponta ativa de 0,0078 cm², doses de 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm². Resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores de fluorescência (excitação $\lambda=485$ nm e emissão $\lambda=534$ nm), de três experimentos em triplicata. *** $p < 0,001$ em relação ao controle com e sem DCF-DA.

As B16-F10 com a melanogênese estimulada com 400 $\mu\text{mol/L}$ de L-tirosina e NH₄Cl 10 mmol/L, irradiadas com laser infravermelho 780nm, doses de 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm², exibiram geração de espécies reativas de oxigênio na dose de 269,1 J/cm², FIGURA 18.

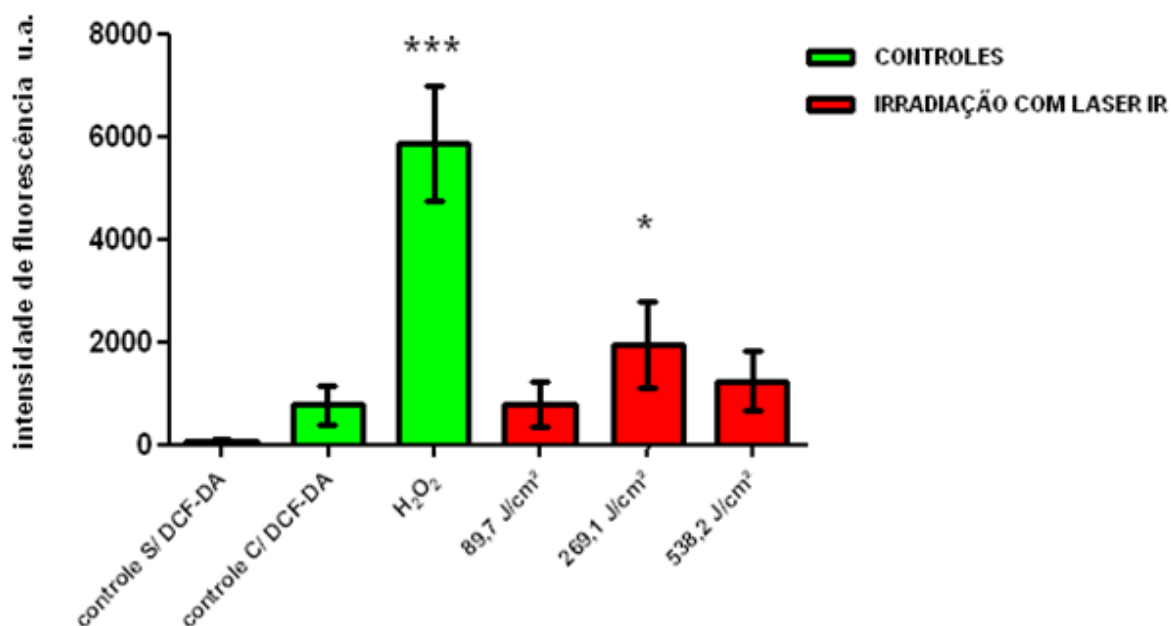


FIGURA 18 - DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM B16-F10 APÓS 1 h DA IRRADIAÇÃO COM DOSES DE 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm² COM TRATAMENTO DE TIROSINA E NH₄Cl

FONTE: o autor (2010)

NOTA: As células B16-F10 foram plaqueadas em placas de fluorescência de 96 poços com 1×10^5 células/poços e meio com 400 $\mu\text{mol/L}$ de L-tirosina e NH₄Cl 10 mmol/L. Os controles são células B16-F10 com e sem DCF-DA. O controle positivo com DCF-DA (5 $\mu\text{mol/L}$) e H₂O₂ (100 $\mu\text{mol/L}$). Após adição de DCF-DA, as células foram irradiadas com várias dosagens de laser infravermelho 780 nm, 70 mW, ponta ativa de 0,0078 cm², doses de 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm². Resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores de fluorescência (excitação $\lambda=485$ nm e emissão $\lambda=534$ nm), de três experimentos em triplicata. *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ em relação ao controle com e sem DCF-DA.

As células Melan-a irradiadas com laser infravermelho 780nm nas doses 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm², não demonstraram geração de espécies reativas de oxigênio em relação ao controle que contém células e sonda DCF-DA (FIGURA 19). Somente na dose 538,2 J/cm² observa-se uma leve tendência.

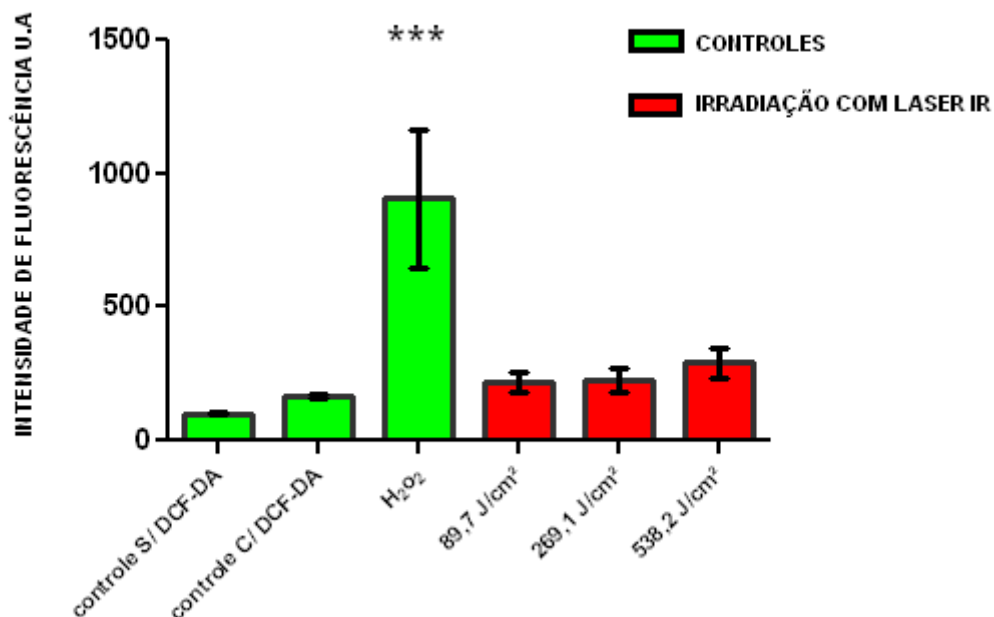


FIGURA 19 - DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM MELAN-A APÓS 1 h DA IRRADIAÇÃO COM DOSES DE 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm²

FONTE: o autor (2010)

NOTA: As células Melan-a sem estímulo foram plaqueadas em placas de fluorescência de 96 poços com 1×10^5 células/poço. Os controles são células Melan-a com e sem DCF-DA. O controle positivo contém células Melan-a com DCF-DA (5 $\mu\text{mol/L}$) e H₂O₂ (100 $\mu\text{mol/L}$). Após adição de DCF-DA, as células foram irradiadas com várias dosagens de laser infravermelho 780 nm, 70 mW, ponta ativa de 0,0078 cm², doses de 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm². Os resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores de fluorescência (excitação $\lambda=485$ nm e emissão $\lambda=534$ nm), de três experimentos em triplicata. *** $p < 0,001$ em relação ao controle com ou sem DCF-DA.

Foram feitos experimentos com DCF-DA nas células B16-F10 com a melanogênese estimulada e nas Melan-a para verificar se reproduziria os resultados encontrados usando pequenas modificações no protocolo do ensaio. Neste novo protocolo as células foram plaqueadas diretamente na placa de fluorescência (para não tripsinizar-las). A sonda DCF-DA foi incubada por 30 min e, após retirada do meio, foram feitos os tratamentos com laser e H₂O₂. As B16-F10 com a melanogênese estimulada e as Melan-a sem estímulo foram irradiadas duas vezes com intervalo de 10 min com laser infravermelho 780nm,

dose de 538,2 J/cm² e não mostraram geração de espécies reativas de oxigênio neste protocolo modificado (FIGURAS 20 E 21, respectivamente).

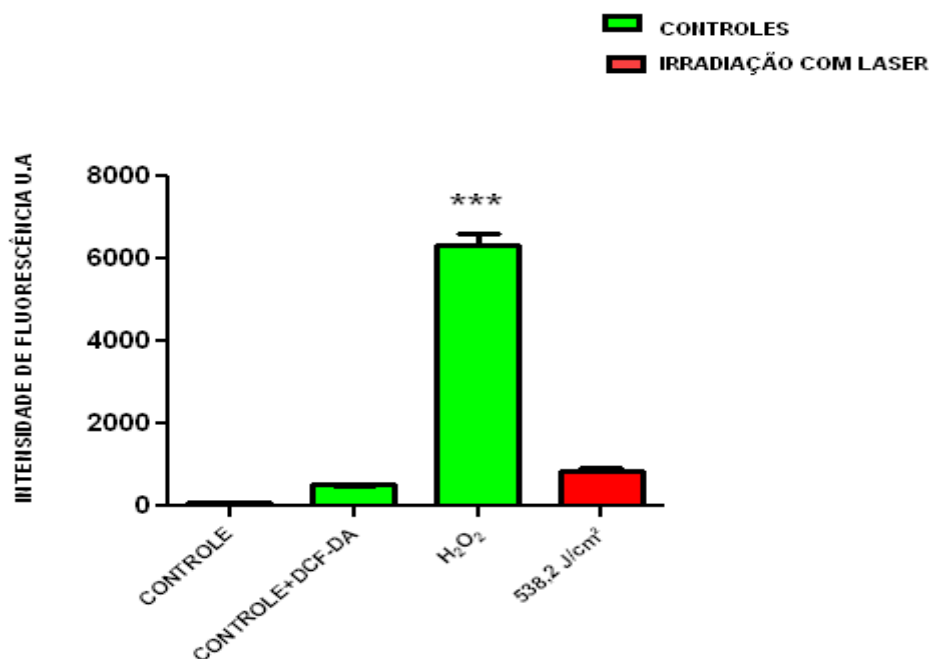


FIGURA 20 -DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM B16-F10 ESTIMULADAS COM TIROSINA E NH₄Cl E IRRADIADAS 2 VEZES COM DOSE 538,2 J/cm².

FONTE: o autor (2010)

NOTA: As células B16-F10 foram plaqueadas em placas de fluorescência de 96 poços com 1x10⁵ células/poços, meio com 400 µmol/L de L-tirosina e NH₄Cl 10mmol/L, por 48 h. Os controles são células B16-F10 com e sem DCF-DA. O controle positivo contém células B16-F10 com DCF-DA (5 µmol/L) e H₂O₂ (100 µmol/L). Foram incubadas 30 min com a DCF-DA em PBS. Após remoção do PBS, foram lavadas 1 vez com PBS, foi acrescido o H₂O₂ ou feita a irradiação com laser infravermelho 780 nm, 70 mW, ponta ativa de 0,0078 cm², dose de 538,2 J/cm². Após 10 min, foram irradiadas novamente com laser IR, dose 538,2 J/cm² e imediatamente foi feita leitura de fluorescência em leitor de microplaca. Os resultados representam a média ± desvio padrão dos valores de fluorescência (excitação λ=485 nm e emissão λ =534 nm), de três experimentos em triplicata. *** p<0,001 em relação ao controle com e sem DCF-DA.

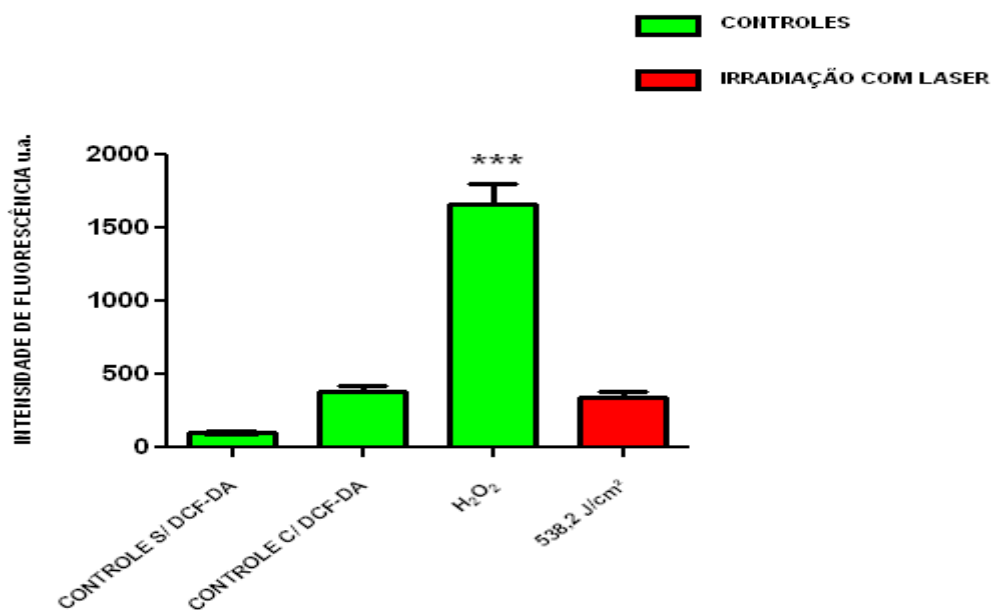


FIGURA 21 - DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM MELAN-A IRRADIADAS 2 VEZES COM DOSE 538,2 J/cm²

FONTE: o autor (2010)

NOTA: As células Melan-a foram plaqueadas em placas de fluorescência de 96 poços com 1×10^5 células/poços. Os controles são células Melan-a com e sem DCF-DA. O controle positivo contém células Melan-a com DCF-DA (5 μ mol/L) e H₂O₂ (100 μ mol/L). Foram incubadas 30 min com a DCF-DA em PBS. Após remoção do PBS, foram lavadas 1 vez com PBS, foi acrescentado o H₂O₂ ou feita a irradiação com laser infravermelho 780 nm, 70 mW, ponta ativa de 0,0078 cm², dose de 538,2 J/cm². Após 10 min, foram irradiadas novamente com laser IR dose 538,2 J/cm² e imediatamente foi feita leitura de fluorescência em leitor de microplaca. Os resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores de fluorescência (excitação $\lambda=485$ nm e emissão $\lambda=534$ nm), de três experimentos em triplicata. *** $p < 0,001$ em relação ao controle com e sem DCF-DA.

7.2.3 Detecção de espécies reativas de oxigênio em melanina de *Sepia officinalis* com sonda DCF-DA

Neste trabalho a melanina de *Sepia officinalis* foi irradiada com laser infravermelho 780nm em solução de DMSO e a geração de espécies reativas de oxigênio foi detectada pela sonda DCF-DA. Foram feitos três controles para análise do efeito da DCF-DA: um controle com apenas DMSO e DCF-DA, um

controle positivo com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 5 $\mu\text{mol/L}$), DMSO e DCF-DA e um outro com melanina (0,1 mg/mL), DMSO e DCF-DA sem irradiação. Os ensaios foram feitos em placa de fluorescência de 96 poços, em triplicata para cada amostra. Três triplicatas de amostras foram irradiadas: uma com DMSO, DCF-DA e laser infravermelho 780nm, 70 mW, ponta ativa de 0,0078 cm^2 , dose de 89,7 J/cm^2 e duas com DMSO, DCF-DA, melanina e laser infravermelho 780nm, 70mW, ponta ativa de 0,0078 cm^2 , doses de 89,7, e 538,2 J/cm^2

Ocorreu oxidação da sonda na amostra com peróxido de hidrogênio, assim como nas amostras com a melanina sem irradiação ou irradiada com laser na dose 89,7 J/cm^2 , mas sem diferença entre essas duas condições, FIGURA 22. Não ocorreu a geração de espécies reativas de oxigênio na amostra irradiada sem a melanina (laser 89,7 J/cm^2) e na amostra com melanina irradiada com laser na dose 538,2 J/cm^2 . Indicando que o laser não causa oxidação do DCF-DA na ausência de melanina ou na presença desse pigmento em doses de 89,7 e 538,2 J/cm^2 .

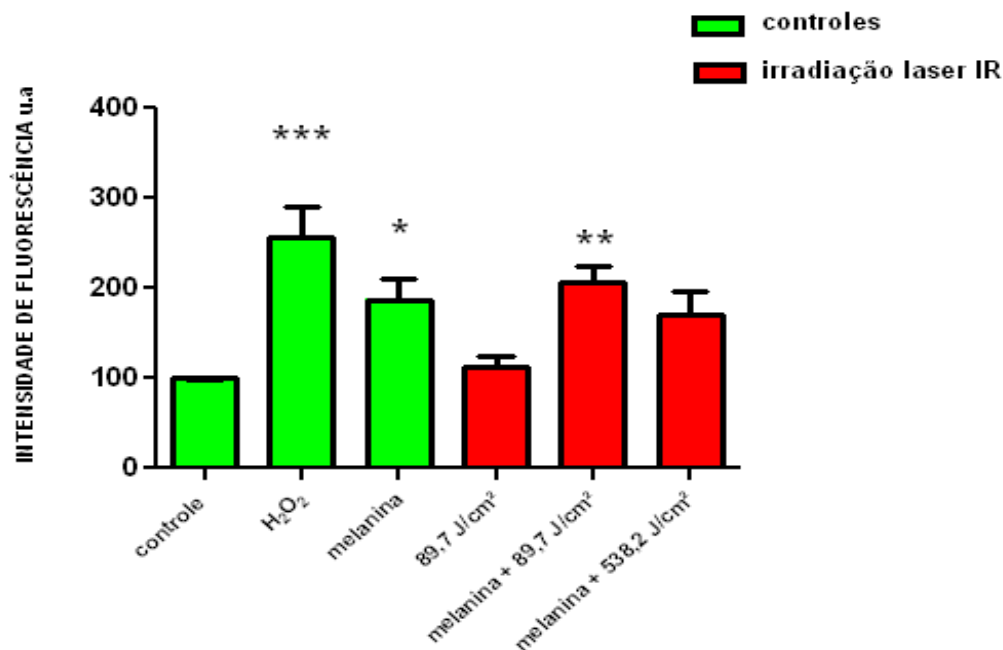


FIGURA 22 - DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM SOLUÇÃO DE MELANINA EM DMSO

FONTE: o autor (2010)

NOTA: Foram adicionados em placas de fluorescência de 96 poços, solução de DCF-DA em DMSO (concentração final de 0,5 $\mu\text{mol/L}$) em todas as amostras e o H₂O₂ (5 $\mu\text{mol/L}$) como controle positivo. Tratamento com irradiação de laser infravermelho 780 nm, 70 mW, ponta ativa de 0,0078 cm², doses de 89,7 e 538,2 J/cm². Resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores de fluorescência (excitação $\lambda=480$ nm e emissão $\lambda=534$ nm), de 4 experimentos em triplicata. *** $p<0,001$; ** $p<0,01$ e * $p<0,05$ em relação ao controle com DCF-DA.

Posteriormente, foi realizado um experimento em solução de DMSO com adição de Fe²⁺ (FeSO₄ em H₂O) para concentração final de 8 $\mu\text{mol/L}$. Foi utilizado o Fe²⁺ para oxidação da sonda, como descrito por MARCHESI *et al.* 1999, para verificar a sua ação sobre a DCF-DA e se a presença do Fe²⁺ nesta solução de DMSO mudaria a fluorescência por oxidação da DCF-DA na presença de melanina, com ou sem a irradiação do laser. Foram realizados vários controles para ver o comportamento da DCF-DA, como: DMSO; DMSO e Fe²⁺; DMSO e DCF-DA; DMSO, DCF-DA e Fe²⁺. Os controles foram

apresentados em gráficos separados para melhor visualização. Devido os valores serem muito diferentes, estão em escalas diferentes (FIGURA 23A).

Como a melanina utilizada nestes experimentos foi dissolvida em NaOH 1 mol/L, foram feitos novos ensaios para verificar a possibilidade de diferença de comportamento da melanina em relação ao pH do meio. De fato, HAFER *et al.* (2008) também relataram que o NaOH poderia contribuir na oxidação da sonda DCF-DA.

Foram feitos os seguintes controles sem irradiação: DMSO, NaOH (50 mmol/L) e DCF-DA; DMSO, NaOH (50 mmol/L), DCF-DA e Fe²⁺; DMSO, melanina, DCF-DA e Fe²⁺; e o controle positivo com H₂O₂, DMSO, DCF-DA e NaOH (50 mmol/L) (FIGURA 23B). As irradiações com laser infravermelho de 780nm foram feitas na dose de 538,2 J/cm² nas amostras com DMSO, NaOH (50 mmol/L) e DCF-DA; DMSO, NaOH (50 mmol/L), DCF-DA e Fe²⁺; DMSO, DCF-DA e Fe²⁺; e nas doses de 89,7 e 538,2 J/cm² nas amostras DMSO, melanina, DCF-DA e Fe²⁺ (FIGURA 23B).

As amostras DMSO, melanina, DCF-DA e Fe²⁺; e o controle positivo com H₂O₂, DMSO, DCF-DA e NaOH (50 mmol/L) sem irradiação (FIGURA 23B) e as amostras DMSO, melanina, DCF-DA e Fe²⁺ com irradiação (FIGURA 23B) geraram espécies reativas de oxigênio. Foi verificada a oxidação da DCF-DA na amostra controle com melanina contendo o Fe²⁺, com diferença de intensidade de fluorescência deste experimento (89,7 J/cm² = 5824 e 538,2 J/cm² = 6082 u.a de fluorescência) com o experimento anterior (FIGURA 22: 89,7 J/cm² = 207 e 538,2 J/cm² = 169 u.a de fluorescência). Esse mesmo comportamento na intensidade de fluorescência também foi observado para controle positivo com H₂O₂, indicando um efeito importante do pH alcalino e do Fe²⁺ na oxidação da DCF-DA. Além disso, nesse caso, a irradiação promoveu um significativo aumento de ROS nas amostras com melanina em relação à melanina não irradiada.

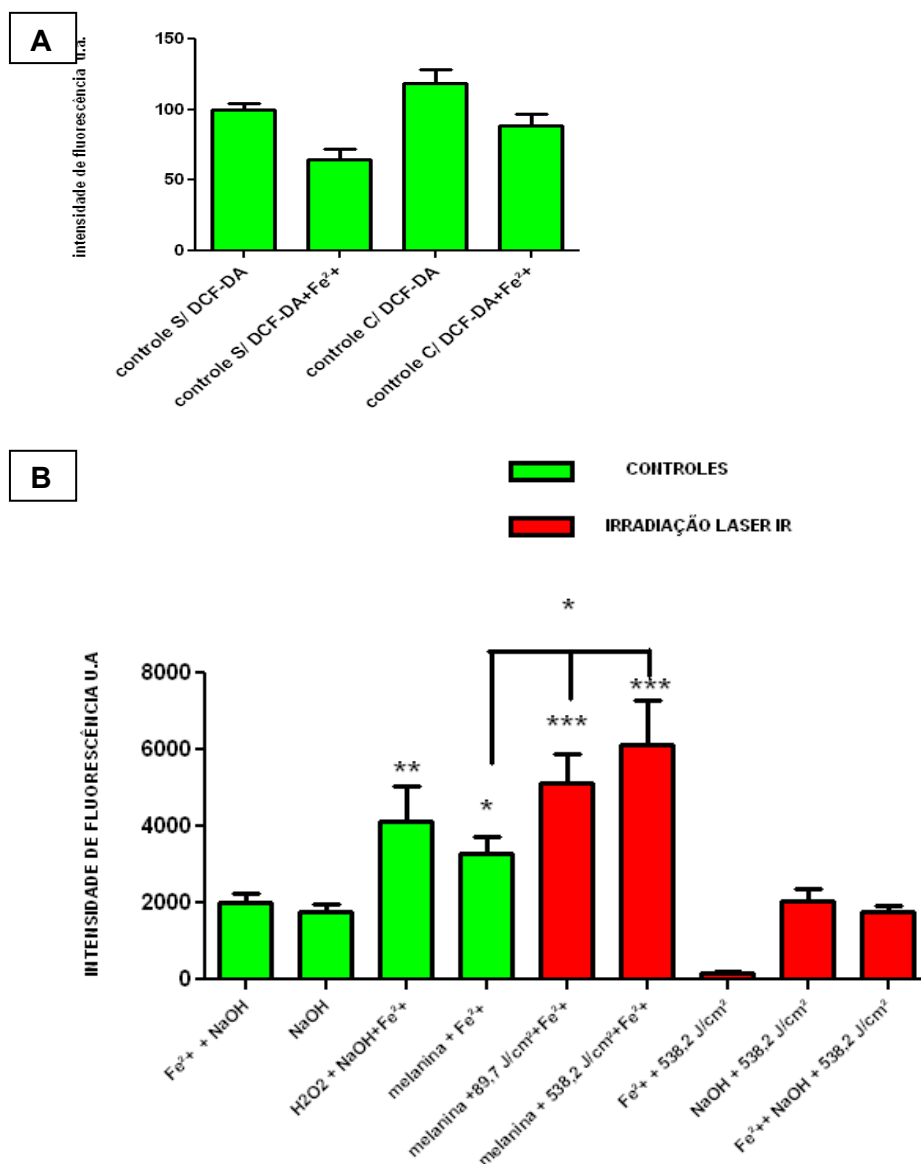


FIGURA 23 - (A e B) DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM SOLUÇÃO DE MELANINA EM DMSO NA PRESENÇA DE Fe²⁺

FONTE: o autor (2010)

NOTA: Foram realizados ensaios em placas de fluorescência de 96 poços em solução de DMSO. O controle positivo de H₂O₂ (5 µmol/L) foi feito na presença de NaOH 0,5 mmol/L. Irradiação de laser infravermelho 780 nm, 70 mW, ponta ativa de 0,0078 cm², doses de 89,7 e 538,2 J/cm². Resultados representam média ± desvio padrão dos valores de fluorescência (excitação λ=480 nm e emissão λ=534 nm) de 3 experimentos em triplicata. *** p <0,001; ** p <0,01 em relação aos controles com e sem DCF-DA e Fe²⁺ e * p <0,05 em relação ao controle com melanina e Fe²⁺ sem irradiação.

Dessa forma, foi também avaliada a produção de espécies reativas de oxigênio em solução de melanina em DMSO na presença de Fe^{2+} em tampão fosfato pH 7. Os resultados são mostrados na FIGURA 24.

Observa-se que ocorreu oxidação da DCF-DA somente no controle positivo com o tampão, Fe^{2+} e H_2O_2 (5 $\mu\text{mol/L}$), o que era esperado. Ao contrário do que se observou nos ensaios anteriores, o resultado mostrou uma forte influência do pH, pois nas amostras com melanina controle e melanina irradiadas com as duas doses de laser não houve geração de espécies reativas de oxigênio. Esses resultados demonstram que em pH neutro a melanina não contribui para geração de ROS.

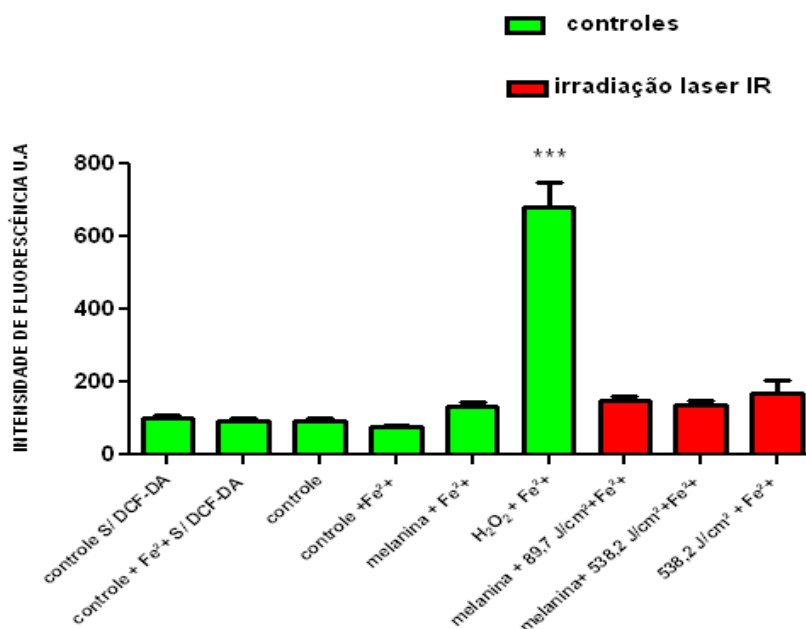


FIGURA 24 - DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM SOLUÇÃO DE MELANINA EM DMSO NA PRESENÇA DE Fe^{2+} EM TAMPÃO FOSFATO

FONTE: o autor (2010)

NOTA: Foram realizados ensaios em placas de fluorescência de 96 poços em solução de DMSO. O controle positivo de H_2O_2 (5 $\mu\text{mol/L}$) foi feito na presença de tampão. Tratamento com irradiação de laser infravermelho 780 nm, 70 mW, ponta ativa de 0,0078 cm^2 , doses de 89,7 e 538,2 J/cm^2 . Resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores de fluorescência (excitação $\lambda=480$ nm e emissão $\lambda=534$ nm) de 3 experimentos em triplicata. *** $p < 0,001$ em relação aos controles S/ DCF-DA e S/ DCF-DA com Fe^{2+} . Os outros valores dos ensaios não demonstrou diferenças estatísticas significativas.

7.2.4 Peroxidação lipídica pelo método TBARS

A análise da peroxidação lipídica nas linhagens celulares B16-F10 e Melan-a foi realizada de acordo ao método descrito por OHKAWA *et al.* (1979), com modificações para fazer a determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em células.

A verificação de radicais livres nos ensaios experimentais são difíceis de serem feitas devido terem meia vida extremamente curta. Então, comumente são utilizados métodos que podem detectar produtos resultantes das ações destes radicais. Produtos esses como os aldeídos formados durante a peroxidação de lipídios insaturados, como ácidos graxos e colesterol. O método utilizado neste trabalho para detecção dos aldeídos foi o método TBARS, que se baseia na reação do malondialdeído com o ácido tiobarbitúrico (NIKI, 2009).

Na FIGURA 25 observamos que não houve peroxidação lipídica nos tratamentos com a dose 538,2 J/cm² realizados na condição sem estímulo, com inibição e com estímulo da melanogênese nas células B16-F10.

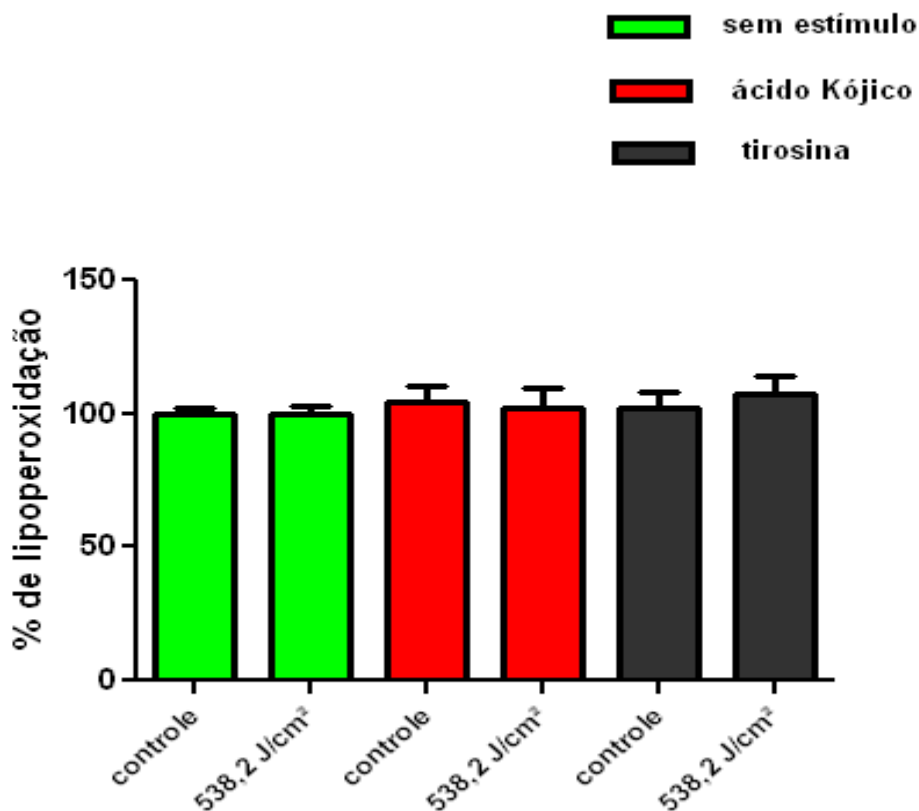


FIGURA 25 - PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DE CÉLULAS B16-F10 IRRADIADAS NA CONDIÇÃO SEM ESTÍMULO, COM ÁCIDO KÓJICO E COM TIROSINA

FONTE: o autor (2010)

NOTA: Foram plaqueadas 4×10^5 células B16-F10 em placas de 6 poços. Tratamentos sem estímulo, ácido kójico 200 $\mu\text{mol/L}$ e 400 $\mu\text{mol/L}$ de L-tirosina com 10 mmol/L de cloreto de amônio e irradiação de laser infravermelho 780 nm, 70 mW, ponta ativa de 0,0078 cm^2 , doses de 538,2 J/cm^2 . Após 24 h da irradiação, foi realizada a medida lipoperoxidação pelo método TBARS como descrito em materiais e métodos. Controles 100% com células B16-F10 sem estímulo, com a melanogênese inibida e melanogênese estimulada. Resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores de quatro experimentos em triplicata.

A FIGURA 26 mostra que para as células Melan-a houve uma leve tendência de peroxidação lipídica com a dose de 538,2 J/cm^2 após 24 h da irradiação, mas não estatisticamente significativa em relação ao controle. Não foi realizado a lipoperoxidação após 48 h de irradiação com laser infravermelho 780 nm dessas células, mas esse comportamento poderia ser a explicação

para a tendência à diminuição da proliferação das Melan-a com a dose de 89,7 J/cm².

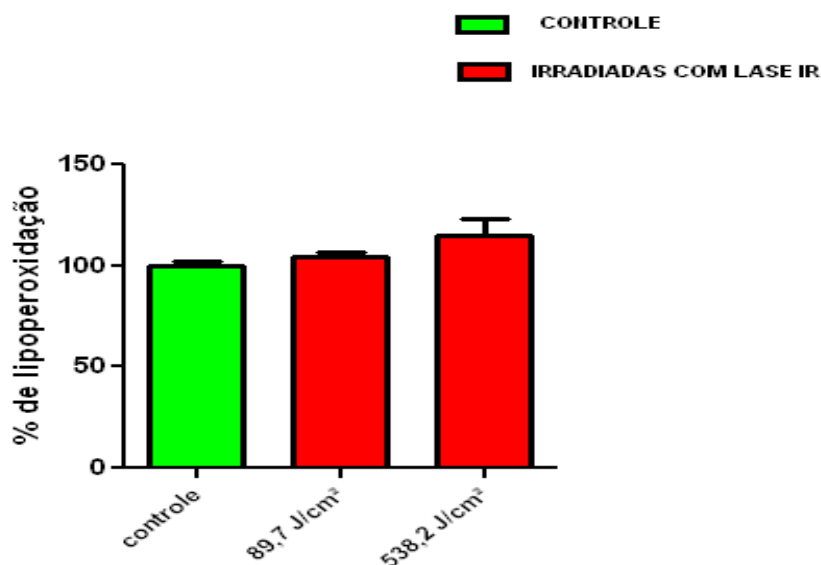


FIGURA 26 - PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DE CÉLULAS MELAN-A IRRADIADAS NA CONDIÇÃO SEM ESTÍMULO

FONTE: o autor (2010)

NOTA: Foram plaqueadas 4×10^5 células Melan-a em placas de 6 poços. Tratamentos com irradiação de laser infravermelho 780 nm, 70 mW, ponta ativa de 0,0078 cm², doses de 89,7 e 538,2 J/cm². Após 24 h da irradiação, foi realizada a medida lipoperoxidação pelo método TBARS como descrito em materiais e métodos. Controles 100% com células Melan-a sem estímulo. Resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores de quatro experimentos em triplicata.

7.2.5 Análise da fragmentação do DNA

O experimento da fragmentação de DNA foi feito utilizando eletroforese em gel de agarose, segundo protocolo de KASIBHATLA *et al* (2009). Na FIGURA 27 observa-se que não houve fragmentação de DNA em nenhuma das amostras de B16-F10 e Melan-a, tratadas e irradiadas irradiação de laser infravermelho 780 nm, 70 mW, ponta ativa de 0,0078 cm², doses de 89,7 e 538,2 J/cm² em relação ao seus respectivos controles.

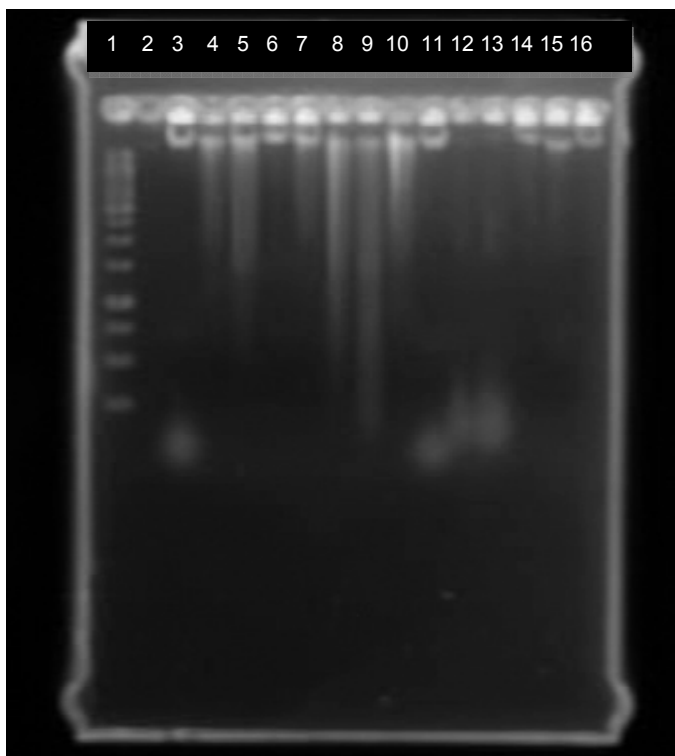


FIGURA 27 - GEL DE ELETROFORESE EM AGAROSE DE CÉLULAS B16-F10 E MELAN-A

FONTE: o autor (2010)

NOTA: As duas linhagens celulares B16-F10 e Melan-a, foram plaqueadas , tratadas sem estímulo, com inibição ou estímulo da melanogênese e irradiadas, posteriormente foi feito o gel de eletroforese em agarose. 1) Marcador de peso molecular de DNA; 2) Poço vazio; 3) Melan-a controle; 4-5) Melan-a irradiada 89,7 J/cm²; 6-7) Melan-a irradiada 538,2 J/cm²; 8) B16-F10 sem estímulo controle; 9-10) B16-F10 sem estímulo 538,2 J/cm²; 11) B16-F10 ácido Kójico controle; 12-13) B16-F10 ácido Kójico 538,2 J/cm²; 14) B16-F10 tirosina controle; 15-16) B16-F10 tirosina 538,2 J/cm².

8 DISCUSSÃO

Na atualidade, os lasers têm uma grande utilização na comunicação, na indústria, na ciência, na tecnologia, na medicina e odontologia. O laser utilizado neste trabalho é um laser infravermelho, diodo semiconductor (arseneto-alumínio-gálio) de baixa intensidade, com comprimento de onda de 780 nm usado mundialmente como uma ferramenta terapêutica por médicos, fisioterapeutas e cirurgiões dentistas. Há interesse nos estudos de suas interações nos sistemas biológicos com objetivos de esclarecer se é totalmente seguro a sua utilização, uma vez que essa energia penetra na pele e nas mucosas.

A radiação IR, quando proveniente do sol, tem demonstrado efeitos diversos em estudos feitos *in vivo* e *in vitro*. Segundo Kochevar *et al.* (2007), a radiação solar de grande incidência sobre a Terra é a IR, em torno de 30% na faixa de 760-1440 nm. Ao incidir na pele, a radiação IR entra em contato inicialmente com queratinócitos, melanócitos e sangue. Essa irradiação interage também com cromóforos da pele (moléculas absorvedoras de energia) como: água, hemoglobina, oxihemoglobina e com o pigmento existente nessas células, a melanina. A melanina absorve também a radiação de comprimentos de ondas mais curtos como UV-B (280-320 nm) (ANDERSON; PARRISH 1981). É certo que a melanina interage na faixa do IR, pois ao ser excitada utilizando uma fibra óptica de um espectrômetro NIR (NIR autofluorescence spectra) no comprimento de onda de 785 nm, emite fluorescência (HUANG *et al.*, 2006).

A pele tem propriedades ópticas de reflexão e absorção, mas ela permite que a radiação IR penetre mais profundamente que outras radiações na faixa do UV-B (penetra na epiderme). A penetração na pele pela radiação IR atinge até a derme (aproximadamente 3 mm) e 17% da sua energia chegam aos tecidos subcutâneos. Assim sendo, os resultados de observações epidemiológicas e clínicas e a capacidade de penetração na pele da radiação IR já não é mais analisada como inofensiva à pele humana (SHIECK *et al.*, 2003; ANDERSON; PARRISH, 1981). Essa radiação absorvida pela melanina pode ser transformada, uma vez que a melanina tem capacidade de transferir

elétrons, absorver diferentes tipos de radiação de baixa energia e convertê-la em um tipo de energia utilizável (SOLIS *et al.*, 2007). Clinicamente observa-se que na pele da raça afro-descendente, a qual contém grandes quantidades de melanina, a incidência de energia de laser IR, quando alta, pode gerar dor ou danos teciduais. Este fato da radiação ser absorvida pela melanina foi explorado por Brondon; Stadler; Lanzafame, (2007). Eles irradiaram células HEP-2 humanas, que não produz melanina, utilizando um filtro de melanina entre o LED de 670nm e as HEP-2 e mostraram que a melanina absorveu parte desta irradiação e assim afetou a fotobiomodulação destas células, resultando em diferenças na viabilidade celular.

Dessa forma, considerando essas informações em relação à pele, melanina, radiação IR e a interação desta radiação com este tecido, este trabalho investigou os efeitos da irradiação com laser infravermelho de 780nm em células B16-F10 (melanoma murino) e Melan-a (melanócito murino imortalizado), as quais contêm o pigmento melanina.

Foi realizada a avaliação da melanogênese somente das células B16-F10 para verificação da utilização dos inibidores e dos estimuladores da produção de melanina. O tratamento consistiu em adicionar 400 µmol/L de L-tirosina e 10 mmol/L de cloreto de amônio (NH₄Cl) para o estímulo da melanogênese, segundo Hoogduijn *et al.* (2003) e Kongshoj *et al.* (2007), e ácido kójico na concentração de 200 µmol/L para a inibição da melanogênese segundo Sato *et al.* (2008). Nos resultados obtidos na modulação da melanogênese das B16-F10, houve estímulo de 671,6% e inibição de 31,4%, concordando com os resultados desses autores.

Foram feitos experimentos para verificar a viabilidade das linhagens celulares B16-F10 e Melan-a. Na Melan-a, foi realizado somente o tratamento com meio RPMI 7,5% SFB e 200 µmol/L de PMA (12-miristato 13-acetato de forbol). As B16-F10 foram tratadas sem estímulo, com estímulo e com inibição da melanogênese. Posteriormente, as células foram irradiadas com laser infravermelho 780nm. O estímulo ou inibição da melanogênese nas B16-F10 foram feitos para verificar se o comportamento das células mudaria frente à irradiação com infravermelho em função da quantidade de melanina endógena. O meio de cultura permaneceu o mesmo durante todo o tempo dos

experimentos, ou seja, sem troca. Os experimentos que tiveram tendência à proliferação com 48 e 72 h na condição de estímulo da melanogênese foram repetidos com troca de meio durante o tempo do experimento para verificar se a ausência de nutrientes estaria alterando a proliferação celular. O resultado obtido não demonstrou diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle, mantendo a mesma tendência.

Neste trabalho, as células foram irradiadas com várias dosagens de laser 780 nm. Nas B16-F10, foram aplicadas doses de 89,7 a 538,2 J/cm² (equivalente a 8,9 W/cm² e 53,8 W/cm², respectivamente) e nas Melan-a, foram aplicadas doses de 89,7 a 1076,4 J/cm² (equivalente a 8,9 e 107,6 W/cm², respectivamente). Entretanto, os resultados com essas células não seguiram a tendência da maioria das células citadas nos trabalhos antigos, ou seja, células malignas e benignas quando irradiadas com doses baixas de laser, tendem a proliferar e, com doses altas, apresentam inibição da proliferação. Os lasers de baixa intensidade usados eram em torno de 5 a 40 mW, e considerado 1 cm² de área para o cálculo, a energia considerada não danosa (de estímulo) utilizada em experimentos com células e prática clínica era em torno de 1 a 100 W/m² (0,01 a 1 W/cm²), ou então até 10 J/cm² de dose de laser (KARU, 1990). Hoje, considera-se 8 W/cm² como intensidade baixa aplicada por ponto, podendo ser utilizados vários pontos de 8 W/cm² em uma sessão (LIZARELLI, 2005). Os valores atuais são maiores que os utilizados antigamente (0,01 a 1 W/cm²), devido à forma como os cálculos das doses eram realizados (item 6.1 de materiais e métodos).

Nossos resultados mostraram que as B16-F10 proliferaram com a dose mais alta do laser IR (538,2 J/cm² ou 53,8 W/cm²) em 24 h após a irradiação como mostrado na FIGURA 12. E as Melan-a tiveram uma diminuição na proliferação com a dose mais baixa de irradiação laser IR (89,7 J/cm² ou 8,97 W/cm²), em 48 h após a irradiação como mostrado na FIGURA 15.

Trabalhos sobre proliferação celular após irradiação com laser de baixa intensidade são descritos por vários autores. Esses trabalhos foram realizados em diferentes tipos celulares, com vários modelos de lasers e dosagens diferentes. As doses utilizadas nestes trabalhos, independente dos valores descritos, eram consideradas baixas (terapêuticas) até 10 J/cm² e altas (não

terapêuticas) acima de 10 J/cm². A irradiação com laser 632,9 nm (LG-52/1), na dose de 0,01 J/cm² em células HeLa levou à proliferação das mesmas (TIPHLOVA; KARU, 1988). Fibroblastos murinos (NIH/3T3) proliferaram com a irradiação de laser de diodo 780nm (Lasotronic) na dose 7 J/cm² (LUBART *et al.*, 1992). Mester, em 1971, mostrou a proliferação das células da epiderme no tratamento de cicatrização de feridas com um Laser de Ruby de 694,3 nm (laser de alta potência), 0,001 s o pulso, aproximadamente 0,6 J/pulso (sem citação de marca). Proliferação das células de melanoma murino B16 e células de melanoma humano *in vitro* pigmentadas foi observada quando estas foram irradiadas com laser de Ruby (sem citação de marca) de 694,3 nm com doses de 1 a 20 pulsos, aproximadamente 0,6 J/pulso (JAMIESON *et al.*, 1969). Algumas células são exceção para a resposta à irradiação laser mesmo em doses baixas, como as células NHK (queratinócitos humanos normais), que irradiadas com laser 780nm e doses 0,45–0,95 J/cm² tiveram o maior aumento da proliferação em 48 h após a irradiação e sofreram efeito inibitório nas doses entre 1,3 e 1,9 J/cm² (mesmo estas doses sendo consideradas estimulatórias), (GROSSMAN *et al.*, 1998).

No presente trabalho foram escolhidas para o tratamento das células B16-F10 doses mais baixas de laser infravermelho 780 nm, de 17,5, 52,5 e 105 J/cm², mas após 24h da irradiação não houve diferença significativa dos tratamentos em relação ao controle. Posteriormente, foram feitos experimentos com doses mais altas de irradiação com laser infravermelho 780 nm, ponta ativa de 0,0078 cm², 70 mW, doses de 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm² nas células B16-F10 sem estímulo. A viabilidade foi analisada após 24h, 48h e 72h de irradiação pelo método cristal violeta. Houve aumento de 38,9 % na viabilidade das células irradiadas com 538,2 J/cm², 24h após irradiação em relação ao controle de 24h. Nas outras dosagens e tempos não houve diferença estatística significativa em relação ao controle. Essa dose alta (538,2 J/cm²) seria considerada inibidora, mas, provavelmente pela presença da melanina nestas células e com essa irradiação resultou neste evento celular atípico.

Para verificar se realmente a melanina estaria envolvida nesta interação melanina/infravermelho, os ensaios seguintes foram feitos com a inibição e

estimulação da melanogênese. Analisando assim, se ocorreria alteração na resposta de viabilidade celular frente ao tratamento com radiação IR.

Na viabilidade das células B16-F10 com inibição da melanogênese, utilizando 200 $\mu\text{mol/L}$ de ácido Kójico, irradiadas com laser infravermelho 780 nm (doses 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm^2) em tempos 24h, 48h e 72h após irradiação, não tivemos resultados estatisticamente significativos em relação aos controles de 24, 48 e 72h. Vale destacar que Sato *et al.* (2008) demonstraram que o ácido kójico nesta dosagem (200 $\mu\text{mol/L}$) não tem efeito sobre a proliferação celular, permanecendo igual ao controle após o tratamento de 5 dias.

As células B16-F10 quando tiveram a melanogênese estimuladas com 400 $\mu\text{mol/L}$ de L-tirosina e 10 mmol/L de cloreto de amônio (NH_4Cl) e foram irradiadas com laser infravermelho 780nm (doses 89,7, 269,1 e 538,2 J/cm^2), tiveram leve tendência ao aumento na viabilidade nos tempos 48 e 72 h com a dose 538,2 J/cm^2 , porém, não estatisticamente significativa em relação ao controle. Após repetição dos experimentos trocando meio de cultura todos os dias, a tendência continuou sem diferença significativa.

Para a análise de viabilidade celular da linhagem Melan-a foi utilizado a condição sem estímulo e irradiação com laser infravermelho 780nm, nas doses de, 89,7, 538,2 e 1076,4 J/cm^2 em tempos 24, 48, 72 h. As dosagens foram escolhidas porque queríamos uma dose baixa (89,7 J/cm^2) e outras doses altas (538,2 e 1074 J/cm^2). A de 538,2 J/cm^2 foi escolhida, pois já tínhamos utilizado nas B16-F10 e a de 1076,4 J/cm^2 considerada uma dose extra de energia. Foi observada diminuição de 23% na viabilidade celular da linhagem Melan-a com o tratamento pela irradiação com IR de 89,7 J/cm^2 em 48 h após a irradiação. Nos outros tempos e doses não houve diferenças estatisticamente significativas. Houve uma tendência a diminuição em 538,2 J/cm^2 em 48 h. Na dose de 89,7 J/cm^2 (baixa) era esperada a proliferação destas células, o que não ocorreu. Possivelmente estas células se comportaram semelhantes aos queratinócitos normais do trabalho citado de Grossman *et al.* (1998), onde com doses baixas (cálculos antigos) entre 1,3 e 1,9 J/cm^2 após 48 h, foi inibida a proliferação dos mesmos. Outro detalhe importante que ocorreu foi que após 48 e 72 h não houve diferenças nas respostas celulares frente à irradiação,

provavelmente nestes tempos, as células já se recuperaram dos estímulos gerados pela energia irradiada.

Vários trabalhos mostram que a radiação IR incidindo nos tecidos da pele gera espécies reativas de oxigênio. Um trabalho publicado recentemente (MAXIM *et al.*, 2010) mostra a geração de radicais livres na pele humana durante a irradiação com luz infravermelha, entretanto, deve-se considerar que foram usadas doses altas devido ao tempo de irradiação (170 mW/cm² por 30 minutos e 115 mW por 30 minutos) de luz IR e a geração de radicais livres ter sido inferida pela degradação de β -carotenos e licopenos. Schieke *et al.* (2006), propõem um esquema da possível ação de ROS na mitocôndria, desencadeando as respostas biológicas (aumenta a ativação e fosforilação de quinases, produção de ROS e outros). Lubart *et al.* (2005) relatam que a irradiação com laser de baixa intensidade, utilizando doses baixas em células de eucarioto (humana e de outros mamíferos) e procarioto (*Escherichia coli*, *Torulopsis sphaerica*, e outras) leva à produção de pequenas quantidades de ROS. LAVI *et al.* (2004) mostrou a geração de ¹O₂ (oxigênio singlete) em fibroblastos (NIH/3T3) e nos espermatozóides de carneiro, ambos irradiados com comprimentos de onda entre 400–800 nm. Em nenhum destes trabalhos foi utilizada a DCF-DA como sonda para detecção das espécies reativas de oxigênio.

Os experimentos feitos para analisar a geração de espécies reativas utilizando a sonda DCF-DA em células B16-F10 e Melan-a, não apontaram para os resultados esperados. Não houve geração de espécies reativas em células B16-F10 nos tratamentos feitos sem estímulo, nem com inibição da melanogênese. Houve geração de ROS com o estímulo da melanogênese. Com a Melan-a também não houve geração de espécies reativas, somente uma tendência com 538,2 J/cm².

O experimento que gerou ROS (B16-F10 com estímulo da melanogênese) provavelmente captou a fluorescência dos ROS existentes no meio extracelular, uma vez que o PBS foi da ressuspensão das células acrescido da DCF-DA antes da irradiação. Como as células B16-F10 foram plaqueadas em placas para os tratamentos de inibição e estímulo da melanogênese, e posteriormente foram tripsinizadas e contadas. O fato de tripsinizar poderia

alterar os resultados. Com a modificação do protocolo, foram feitos experimentos com a B16-F10 (estímulo da melanogênese) e com a Melan-a, e não se observou a geração de ROS em nenhuma das duas linhagens. Esse resultado foi obtido porque, após a incubação da DCF-DA, o meio foi retirado e as células lavadas com objetivo de captar apenas os ROS intracelulares.

Provavelmente esta sonda DCF-DA que foi utilizada não seja adequada para as condições dos experimentos nestas células na detecção de possíveis espécies reativas geradas. Se realmente há formação de ROS nestas linhagens, poderiam ser espécies de ROS não captadas por esta sonda. No momento na literatura, há vários questionamentos dos resultados obtidos com essa sonda DCF-DA, principalmente por ela não ser específica na detecção de espécies reativas de oxigênio. Essa justificativa em relação à inadequação dos métodos ou do uso desta sonda DCF-DA nestas linhagens celulares é pertinente, uma vez que esperávamos a geração de espécies reativas nestas células irradiadas com IR em função de trabalhos publicados e não obtivemos.

Para verificar se realmente poderia existir interação entre radiação IR e melanina para geração de ROS, experimentos com a sonda DCF-DA foram feitos com solução de melanina de *Sepia officinalis* em DMSO irradiada com laser IR 780nm na dose $538,2 \text{ J/cm}^2$, mas não foi observado geração de ROS.

Marchesi *et al.* (1999) relatam a necessidade do Fe^{2+} (FeSO_4 em H_2O) para oxidar a sonda em células. Dessa forma, foi utilizado o Fe^{2+} para verificar se sua ação sobre a DCF-DA na solução de DMSO mudaria a fluorescência por oxidação da DCF-DA na presença de melanina com ou sem a irradiação do laser. Houve a oxidação da DCF-DA na amostra controle com melanina contendo o Fe^{2+} . Houve maior intensidade de fluorescência que o experimento sem ferro.

Hafer *et al.* (2008) também relataram que o NaOH poderia contribuir na oxidação da sonda DCF-DA. Como a melanina utilizada nestes experimentos foi dissolvida em NaOH 1 mol/L, foram feitos novos ensaios para verificar essa possibilidade de diferença de comportamento da melanina em relação ao pH do meio e as amostras foram neutralizadas com H_3PO_4 1 mol/L. O resultado mostrou que não houve oxidação da DCF-DA com a irradiação do laser, pois em pH neutro a melanina protege a sonda da oxidação.

Na lipoperoxidação pelo método TBARS, os resultados obtidos com as células B16-F10 nos tratamentos sem estímulo, com estímulo e com inibição da melanogênese não mostraram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle. Esse resultado indica que a irradiação não parece induzir um quadro de estresse oxidativo, o que não estaria ocasionando alteração na viabilidade celular. De fato, não ocorreram diferenças na viabilidade das B16-F10 em 24, 48 e 72 h (sem estímulo, com estímulo e com inibição da melanogênese) após a irradiação (89,7, 269,1 e 538,2 J/cm²). Os resultados obtidos para as células Melan-a realizados somente na condição sem estímulo mostraram uma tendência a lipoperoxidação, porém não estatisticamente significativa em relação ao controle, podendo talvez estar associada à diminuição na viabilidade destas células após a irradiação com IR na dose de 89,7 J/cm² em 48 h.

Na eletroforese em gel de agarose feita nas células B16-F10 sem estímulo, com inibição e com estímulo da melanogênese a irradiação foi realizada 24 h antes da realização do gel. Para a linhagem Melan-a a eletroforese foi realizada somente com o meio de cultivo e irradiadas 24 h antes da realização do gel, com duas doses de laser IR. Os resultados obtidos não mostraram fragmentação no DNA em nenhum dos tratamentos e linhagens utilizadas. Possivelmente teríamos resultados diferentes se fossem feitas várias irradiações seguidas nestas células, imitando os danos que a radiação IR solar contínuo causa às células.

9 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos nos experimentos realizados com células B16-F10 e Melan-a irradiadas com laser IR 780nm, concluímos que não há grandes alterações de viabilidade em função das doses, quantidade de melanina endógena ou dos tempos de recuperação, exceto em duas condições particulares: na linhagem B16-F10 sem estímulo e irradiadas com 538,2 J/cm², onde se observou um aumento de 38,9% na percentagem das células viáveis em relação ao controle após 24h e na linhagem Melan-a sem estímulo e irradiadas com 89,7 J/cm², que tiveram diminuição de 23% na percentagem das células viáveis em relação ao controle após 48 h. Não foi observada alteração da lipoperoxidação ou fragmentação de DNA em nenhuma condição das células após irradiação. Usando a sonda DCF-DA não foi observada a geração de ROS intracelular, entretanto, a melanina de *Sepia officinalis* irradiada com Laser IR 780nm em solução aquosa de DMSO, promoveu a geração de ROS de forma dependente do pH do meio em que se encontrava no momento da irradiação. Esses resultados em conjunto indicam que não há uma resposta biológica agressiva para as células B16-F10 e Melan-a quando submetidas a apenas uma aplicação para irradiação nas doses de laser IR 780 nm de 89,7 a 538,2 J/cm² e, além disso, a quantidade de melanina endógena não afeta os parâmetros de morte celular e geração de ROS. Entretanto, o aumento da proliferação da B16-F10, que são células de tumor de melanoma, após 24h da irradiação com 538,2 J/cm² alerta para que estudos mais profundos a respeito da irradiação IR sobre esses tumores sejam feitos.

REFERÊNCIAS

ABNT. (Associação Brasileira de Normas Técnicas), **Equipamento eletromédico**. Parte 2: Prescrições particulares para a segurança de equipamento terapêutico e de diagnóstico a laser, (NBR IEC 601-2-22:1997), Rio de Janeiro, 1997.

AHMAD, N.; MUKHTAR, H. Methods in enzymology, Mechanism of Photodynamic Therapy-Induced, Cell Death. **Academic Press** - VOL. 319, 0076-6879 , 2000.

AMETA, S. C. *et al.* Singlet molecular oxygen. **Asian Journal of Chemistry Reviews**. 1(2):106-124, 1990.

ANDERSON, R. R.; PARRISH, J. A. The Optics of Human Skin. **The Journal Investigate Dermatology**, 77:13-19. 1981.

ARMSTRONG, J. S.; WHITERMAN, M. Measurement of Reactive Oxygen Species in Cells and Mitochondria. **Elsevier Inc. Methods in cell biology**. Vol 80, chapter 18, 2007.

ARNAU, A. M. G. Bioquímica de la melanogénesis. Regulacion. **Acta Dermato-Venereologica (Stockh)**. 71,283-286, p.362, 1991.

ARNSTEIN, H. R. V.; BENTLEY, R. The biosynthesis of kojic acid. 1. . Production from $[1-^{14}\text{C}]$ and $[3:4-^{14}\text{C}_2]$ glucose and $[2-^{14}\text{C}]-1:3$ -dihydroxyacetone. **Biochem J**. Jun; 54, 3: 493–508, 1953.

BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut**, v.47, p.233-261, 1996.

BOATRIGH, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation, **Current Opinion in Cell Biology**. 15:725–731, 2003.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem.**, 72 (248), 1976.

BRANNON, H. Types of melanoma about.com updated: about.com health's disease and condition content. Is reviewed by the **Medical review board**, november 29, 2004.

BRINCKERHOFF, C. E.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.** **3**, 207–214, 2002.

BRITO, F. C.; KOS, L. Timeline and distribution of melanocyte precursors in the mouse heart. **Pigment Cell Melanoma**, Res. 21, 464–470, 2008.

BRONDON, P.; STADLER, I.; LANZAFAME, R. J. Melanin Density Affects Photobiomodulation Outcomes in Cell Culture. **Photomedicine and Laser Surgery**. Vol 25, Number 3, 2007.

CALLES, C. *et al.* Infrared A Radiation Influences the Skin Fibroblast Transcriptome: Mechanisms and Consequences, **Journal of Investigative Dermatology**, advance on line publication, 4 February 2010.

CARNEVALLI, C. M. M. *et al.* N.S. Laser Light Prevents Apoptosis on Cho K-1 Cell Line. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, V. 21, p. 193–196, N° 4, 2003.

CHAKRABORTY, D. P.; ROY, S. Chemical and Biological Aspects of Melanin. In: Cordell Geoffrey A. The Alkaloids, Chemistry and Pharmacology, **Academic Press**, Vol. 60, p. 345, 2003.

CHEMBLINK. **Chemical Listing of Kojic acid**. Disponível no www.chemblink.com/ - 13k, acesso 12/02/2009. Database of Chemicals from Around the World, 2009.

CHIGNELL, C. F; SIK R. H. A Photochemical study of cells loaded with 2',7'-dichlorofluorescein: Implications for the detection of reactive oxygen species generated during UVA irradiation. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 34, N. 8, pp. 1029–1034, 2003

CINGOLANIA, H. E.; HOUSSAY, A. B. Fisiologia Humana de Houssay. Tradução de KLEIN A. B. *et al.* 7ª Ed. atual. ampl., **Artmed editora**. S.A. Porto Alegre, p 620, p623, 2004.

CLARK, W. H. A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and biologic behaviour, In: The Pigmentary System, ed. Montagna, W., Hu, F., London, **Pergamon Press**, Vol. 8, pg. 621-647, 1967.

COLLINS, A. R. Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer **Bio Essays**, 21:238–246, 1999.

CONSTANZO, L. S. Fisiologia. Tradução de VARGAS, V. R. S. 3ª Ed., **Elsevier**, Rio de Janeiro, p 392-393, 2007.

COOKE, M. S. *et al.* Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **FASEB J.** 17,1195–1214, 2003.

CRUÑANES, J. C. La terapia laser, hoy. Barcelona, **Centro de Documentación Láser Meditec S.A.**, p11, 12, 14, 1984.

DATTA S.; VOORHEES, J. J. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Arch. Dermatol.** 138, 1462–1470, 2002.

DEGTEREV, A.; YUAN, J. REVIEWS, Expansion and evolution of cell death Programmes. **Nature** Publishing Group, 378, volume 9, May 2008.

DOUGHERTY, C. J. *et al.* Photodynamic therapy **J. Natl. Cancer Inst.** 90, 889, 1998.

ELECTROMAGNETIC RADIATION. Acesso jan. 2009. Disponível no site. www.fieldscan.co.uk/images/electromagnetic_sp.

EMAMI, S. *et al.* Kojic acid and its manganese and zinc complexes as potential radioprotective agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol 17, Issue 1, 1 january 2007, p 45-48, 2006.

ENDRES, L.; BREIT, R. UV radiation, irradiation, dosimetry. In: KRUTMANN J, *et al.* Dermatological Phototherapy and Photodiagnostic, Methods. NewYork: **Springer-Verlag**, p 3-53; 2001.

FILHO, G. B. Patologia Geral. **Ed. Guanabara**, Rio de Janeiro, Cap. 5, p.87-89, 2004.

FISHER, G. J. *et al.* Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging. **Arch. Dermatol**, vol 138, 1462-1470, 2002.

FOOTE, C. S.; CLENNAM, E. L. Active Oxygen in Chemistry Properties and of Oxygen Dioxygen. Reactions. First Edition for **Chapman and Hall**, Contents 4, page105-124, 1995.

FOUNDATION SKIN CANCER, Acesso fev. 2009. **Melanoma**. Disponível em: <<http://www.skincancer.org>>.

GOMES, A. J. *et al.* The antioxidant action of Polypodium leucotomos extract and kojic acid: reactions with reactive oxygen species. Vol.: 79 (2001) (p. 607), **Braz J Med Biol Res**, v.34, p.1487-1494, 2001.

GOULD, R. G. "The LASER-Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation". in Franken, P. A. and Sands, R. H. (Eds.). **The Ann Arbor Conference on Optical Pumping**, the University of Michigan, June 15 through June 18, 1959.

GROSS, J.; LAPIERE, C. M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proc. Natl Acad.Sci. USA** **48**, 1014–1022, 1962.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica; Tradução de MARTINS, B. A. 11ª Ed., **Elsevier**, Rio de Janeiro, p 95, 2006.

HAFER, K. *et al.* Radiation-Induced Long-Lived Extracellular Radicals do not Contribute to Measurement of Intracellular Reactive Oxygen Species Using the Dichlorofluorescein Method. **Radiation research** **169**, 469–473, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed., **Oxford: Clarendon Press**, 1999.

HALLIWELL, B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease, **Encyclopedia of life sciences**, May 3, 2005.

HELD, A. M.; HALKO, D. J.; HURST, J. K. Mechanisms of chlorine oxidation of hydrogen peroxide. **J Am Chem Soc** **100**:5732–5740, 1978.

HERMES-LIMA, M. "Functional Metabolism Regulation and Adaptation" Chapter 12: Oxygen in biology and biochemistry role of free radicals. Edited by **Kenneth B. Storey**. Wiley, USA, p. 319-368, 2004.

HISTORY OF LASER - October 3rd, 2009. **blog.geodat.biz/?p=156**, acesso fev. 2009.

HOOGDUIJN, M. J. *et al.* Melanin has a role in Ca²⁺ homeostasis in human melanocytes. **Pigment Cell Research**, USA, v. 16, p.127-132, 2003

HUANG, Z. *et al.* Cutaneous melanin exhibiting fluorescence emission under near-infrared light excitation. **Journal of Biomedical Optics** **11**(3), 034010 May/June, 2006.

INCA, **Câncer de Pele, Melanoma**. Acesso fev. 2009. Disponível em www.inca.gov.br.

ITO S.; WAKAMATSU, K. Chemical degradation of melanins: application to identification of dopamine-melanin. **Pigment Cell Res**, **11**:120–126, 1998.

ITO, S.; WAKAMATSU, K. Quantitative Analysis of Eumelanin and Pheomelanin in Humans, Mice and Other Animals: a Comparative Review - **Pigment Cell Res**, 16: 523–531, 2003.

JAMIESON, C. W. *et al.* Enhancement of melanoma cell culture growth rate by ruby laser radiation. **Life Science**. Jan 15; 8(2): 101-6, 1969.

JOHNSON, A. *et al.* Biologia Molecular da Célula. **Editora Artes**, 3^o ed., Porto Alegre, R.S., cap 17, p 983-1026, 1977.

KADEKARO, A. L. *et al.* Review-Cutaneous Photobiology. The Melanocyte vs. the Sun: Who, Will, Win the Final Round? **Pigment cell res**, 16: 434–447. 2003.

KAMEYAMA, K. Histological and clinical studies on the effects of low to medium level infrared light therapy on human and mouse skin. **J Drugs Dermatol**, 7(3):230-5, 2008.

KARU T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE J Quantum Electron.**; 23(10), 1987.

KARU, T. Effects of Irradiation with monochromatic visible light on cAMP content in chinese hamster fibroblasts. **Il Novo Cimento**, Vol.9D, N.10. Ottobre 1987.

KARU, T. Invited Review., Primary and secondary mechanisms of action of visible-to-near IR radiation on cells. **Photochem. Photobiol., B. Biology**, 49, 1–17, 1999.

KARU, T.; PYATIBRAT, L. V.; AFANASYEVA, N. I. Cellular Effects of Low Power Laser Therapy Can be Mediated by Nitric Oxide. **Lasers in Surgery and Medicine**, 36:307–314, 2005.

KARU, T.; KALENDO. G. S.; LETOKHOY, V. S.; LOBKO V. V. Bioestimulation of HeLa cells by low-intensity visible light. **Il Novo Cimento**, Vol.1D, N.6. Novembre-Dicembre, 1982.

KARU, T. REVIEW, Effects of visible radiation on cultured cells. **Photochemistry and Photobiology**. Vol 52, n^o 6, p 1089-1098, 1990.

KASIBHATLA *et al.* Analysis of DNA Fragmentation Using Agarose Gel Electrophoresis. **Cold Spring Harb. Protoc.**, doi:10.1101/pdb, prot. 4429, 2006.

KIERSZEMBAUM, A. Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia. Tradução de RANGEL, N. V.; AZEVEDO, R. A. **Elsevier**, Rio de Janeiro, cap. 11, p.324-325, 2004.

KIM, M. S. *et al.* Regulation of type I procollagen and MMP-1 expression after single or repeated exposure to infrared radiation in human skin. **Mechanisms of Ageing and Development**, 127 (12) 875–882, 2006.

KIM, M. S. *et al.* Infrared exposure induces an angiogenic switch in human skin that is partially mediated by heat. **Br. J. Dermatol**, 155(6):1131-8, 2006.

KIM, J. *et al.* Oxidative modification of cytochrome c by singlet oxygen. **Free Radical Biology & Medicine** 44; 1700–1711; 2008.

KOBAYASHI, N. *et al.* Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis, **J. Invest. Dermatol.** 110, 806–810, 1998.

KONGSHOJ, B. *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.

KORNER, A.; PAWELEK, J. Activation of melanoma tyrosinase by a cyclic AMP. **Nature**, vol 276, 2, june, 1970.

KOCHEVAR, I. E.; TAYLOR, C. R.; KRUTMANN, J. Fundamentals of cutaneous photobiology and photoimmunology. In: **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine** (Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, eds), New York: McGraw-Hill (in press), 2007.

KRISLER, M.; *et al.* Low-level 809nm GaAlAs laser irradiation increases the proliferation rate of lumen laryngeal carcinoma cells *in vitro*. **Laser in Medical Science**, vol 18 (2), p 100-103, 2003.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Anal. Biochem.** 182:16–19; 1989.

KUSHNAREVA Y. E.; MURPHY A. N.; ANDREYEV A. Y. Complex mediated reactive oxygen species generation: Modulation by Cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. **Biochem.J.** vol,368;p, 545–553; 2002.

LASSALLE, M. W. *et al.* Effects of Melanogenesis-Inducing Nitric Oxide and Histamine on the Production of Eumelanin and Pheomelanin in Cultured Human Melanocytes. **Pigment cell res** 16: 81–84, 2003.

LAVI, R. *et al.* Low Energy Visible Light Induces Reactive Oxygen Species Generation and Stimulates an Increase of Intracellular Calcium Concentration in Cardiac Cells. **The journal of biological chemistry**, Vol. 278, No. 42, Issue of October 17, pp. 40917–40922, 2003.

LAVI, R. *et al.* ESR. Detection of $^{1}O_2$ Reveals Enhanced Redox Activity in Illuminated Cell Cultures. **Free Radical Research**, Volume 38 Number 9 p. 893–902, 2004.

LIU, X. *et al.* Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell** 86,147–157, 1996.

LIZARELLI, R. F. Z. Protocolos Clínicos Odontológicos. Uso do Laser de Baixa Intensidade, MM Optics Ltda. **Ed. Bons Negócios**, p 21-37, 2005.

LUBART, R. *et al.* Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. **Photomed Laser Surg**, Feb; 23(1): 3-9, 2005.

MAIMAN, T. H. "Stimulated optical radiation in ruby". Nature 187 (4736): 493–494, 1960 **History of Lasers. Inventores do laser.** Disponível em: <http://inventors.about.com/od/1startinventions/a/laser.htm>. Acesso em janeiro de 2009.

MARCHESI, E. *et al.* Photoreduction of the fluorescent dye 2-7dichlorofluorescein: A spin trapping and direct electron spin resonance study with implications for oxidative stress measurements. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 26, Nos. 1/2, pp. 148–161, 1999.

MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Utilização de endoperóxidos de derivados de naftaleno como fontes químicas de 1O_2 em sistemas biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, p. 686-689, 2000.

MAXIM, E. D. *et al.* Formation of Free Radicals in Human Skin during Irradiation with Infrared Light. **Journal of Investigative Dermatology**;130, 629–631, 2010.

MESTER, E. *et al.* Effects of laser rays on wound healing. **Am. J. Surg**, 122: 532-535, 1971.

MOORE, K. L. Embriologia básica. Colaboração de TORCHIA, M. G. Tradução de COSTA, A. M. M. *et al.* **Ed. Elsevier**, Rio de Janeiro, cap18, p.300, 2008.

NAKAGAWA, M.; KAWAI, K.; KAWAI, K. Contact allergy to kojic acid in skin care products. **Contact Dermatitis**, v.32, Issue 1, p.9-13, 1995.

NAPPI, A. J.; VASS, E. Hydrogen peroxide generation associated with the oxidations of the eumelanin precursors 5,6-dihydroxyindole and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid. **Melanoma Res.** 6, 341–349, 1996.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Princípios de Bioquímica. Tradução SIMÕES, A. A. e LODI, W. R. N., 4ª edição, **Sarvier**, São Paulo , p 1-7, p 684-743), 2006.

NICOLAUS, R. A .Revision will be possible after **The Pigment Cell Conference**, 18-23 September, Reston USA, 2005-. factor. Link 4-Melanin 95-97. Disponível em: www.tightrope.it/nicolaus/index.htm. Acesso jan. de 2009.

NIKI, E. Review Article. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology & Medicine** 47469–484, 2009.

NORDLUND, J. J. *et al.* The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology. Colaborador BOISSY, R. E. AND HEARING, V.J. Edition: 2, **Blackwell Publishing**, cap 15, p. 300, 2006.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, n.2, p.351-358, 1979.

OLEINICK, N. L.; MORRIS, R. L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochem. Photobiol. Sci**, 1, 1–21, 2002.

OLEINICK, N. L.; EVANS, E. H. H. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. **Radiat. Res.** 150 (Suppl.), S146–S156, 1998.

OREN, D. A. *et al.* Stimulation of Reactive Oxygen Species Production by an Antidepressant Visible Light Source Biol Psychiatry. . **Society of Biological Psychiatry**, 49, 464–467, 2001.

OTSU, K. *et al.* An abortive apoptotic pathway induced by singlet oxygen is due to the suppression of caspase activation. **Biochem. J.** Printed in Great Britain, 389, 197–206, 2005.

OW, Y. P. *et al.* Cytochrome c: functions beyond respiration. **Nature**, p 532, vol 9, JULY 2008.

PASS, H. I. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. **J.Nat. Cancer Inst**, 85:443-456, 1993.

RANDHAWA, M. *et al.* Evidence for the ectopic synthesis of melanin in human adipose tissue. **FASEB** (Federation of American Societies for Experimental Biology) Journal .October 29, 2008 as doi: 10.1096/fj.08-116327, Publish in march 2009.

ROY, S. Melanin, Melanogenesis, and Vitiligo Institute of Natural Products, 8, **J. N. Roy Lane**, Kolkata, India, p. 133, 139, 2007.

SAKURAI Y.; YAMAGUCHI M.; ABIKO Y. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. **Eur J Oral Science**, 108: 29-34,2000.

SARNA, T.; MENON, I. A.; SEALY, R. C. Photosensitization of melanins: a comparative study. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.42, p.529–532, 1984.

SATO, K. *et al.* Down-Regulation of Tyrosinase Expression by Acetylsalicylic Acid in Murine B16 Melanoma. **Biol. Pharm. Bull.** 31(1), 33-37, 2008.

SCHIEKE, S. M. *et al.* "Infrared-A radiation-induced matrix metalloproteinase 1 expression is mediated through extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human dermal fibroblasts," **J. Invest. Dermatol**, vol. 119, no. 6, pp. 1323-1329, 2002.

SCHIEKE, S. M.; SCHROEDER, P.; MORITA, A. Skin Aging .Premature Skin Aging by Infrared Radiation, Tobacco Smoke and Ozone. **Spring Berlin Heidelberg**, cap5, p 45-53, 2006.

SCHIEKE, S. M.; SCHROEDER, P.; KRUTMANN, J. Review article Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms. Blackwell Munksgaard, **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, 19: 228–234, 2003.

SCHROEDER, P. *et al.* Infrared radiation-induced matrix metalloproteinase in human skin: implications for protection. **J Invest Dermatol**, 128 (10), 2491-7, 2008.

SETLOW, R. B. *et al.* Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Genetics, Vol. 90, pp. 6666-6670, July 1993.

SHIMADA, M. *et al.* Melanin and blood concentration in human skin studied by multiple regression analysis: experiments. **Phys. Med. Biol.** 46 (2385-2395), 2001.

SLOMINSKI, A. *et al.* Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. **Physiological Reviews.** 84: p.1155, 2004.

SMIT, N. P.M. *et al.* Increased Melanogenesis is a Risk Factor for Oxidative DNA Damag-Study on Cultured Melanocytes and Atypical Nevus Cells. **Photochemistry and Photobiology**, 84: 550–555, 2008.

SOLIS, A.; LARA, M. E.; RENDON, L. E. Photoelectrochemical Properties of Melanin. **Nature** Precedings : hdl:10101/npre,1312.1, 2007.

SONNTAG, C. V. Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair. DNA and Double-Stranded Oligonucleotides. A Chemical Perspective. **Springer Berlin Heidelberg**. CAP 12, March 20, 2006.

STADLER .I. *et al.* *In vitro* effects of low-level laser irradiation at 660 nm on peripheral blood lymphocytes. **Lasers in surgery and medicine**, 27 (3): 255-261,2000.

STELLER, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. **Science**, 67, 1445–1449. 1995.

SUTO, D. *et al.* Suppression of the pro-apoptotic function of cytochrome c by singlet oxygen via a haem redox state-independent mechanism. **Biochem. J.** Printed in Great Britain, 392, 399–406, 2005.

TADOKORO, T. *et al.* UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin and photosensitivity. **FASEB J.** 17, 1177–1179, 2003.

TIMARES, L.; KATIYAR, S. H.; ELMETS, C. A. Review DNA Damage, Apoptosis and Langerhans Cells—Activators of UV-induced Immune Tolerance. **Photochemistry and Photobiology**, 84: 422–436, 2008.

TIPHLOVA, O.; KARU, T. Stimulation of *Escherichia coli* division by Low-intensity monochromatic visible light. **Photochemistry and Photobiology**. Vol. 48, n° 4, p 467-471, 1988.

VALKO, M. *et al.* Mini-review Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced câncer. **Chemico-Biological Interactions**, 160,1–40, 2006.

WAKAMATSU, K.; ITO, S. Advanced chemical methods in melanin determination. **Pigment Cell Res**; 15:174–183; 2002.

WANG, H.; JOSEPH. J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol.27, No. 5/6, p. 612-616, 1999.

WEINBERG, R. A. A Biologia do Câncer, 1º Ed, **Ed. Artmed**, 2008.

WINTERBOURN, C. C. Review. Reconciling the chemistry and biology reactivities oxygen species- **Nature-chemical biology**, NPG, 2008.

WOERT, M. H. V. Oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide by melanin. **Life Sciences, Pergamon Press Ltd.**, Vol . 6, p. 2605-2612, 1967.

WOODBURN, K. W. *et al.* Photodynamic therapy of B16-F10 murine melanoma with lutetium texaphyrin. **J. Invest Dermatol**, 110: 746-751, 1998.

WU, S. *et al.* Mechanistic study of apoptosis induced by high-fluence low-power laser irradiation using fluorescence imaging techniques. **Journal of Biomedical Optics**, 12(6), (064015) November/December, 2007.

YAMAGUCHI, Y. *et al.* Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis. **FASEB Journal Express**, article fj.06-5725fje. Published online June 22, 2006.

YOULE, R. J.; STRASSER, A. Ref-The bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nature reviews, Molecular cell biology**. 47, volume 9, january 2008.

ZHAO, H. *et al.* Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from methidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 34, No. 11, p. 1359–1368, 2003.

ZONIOS, G.; DIMOU, A. Optical properties of Human Melanocytic Nevi *in vivo*. **Photochemistry and Photobiology**, 85: 298-303, 2009.