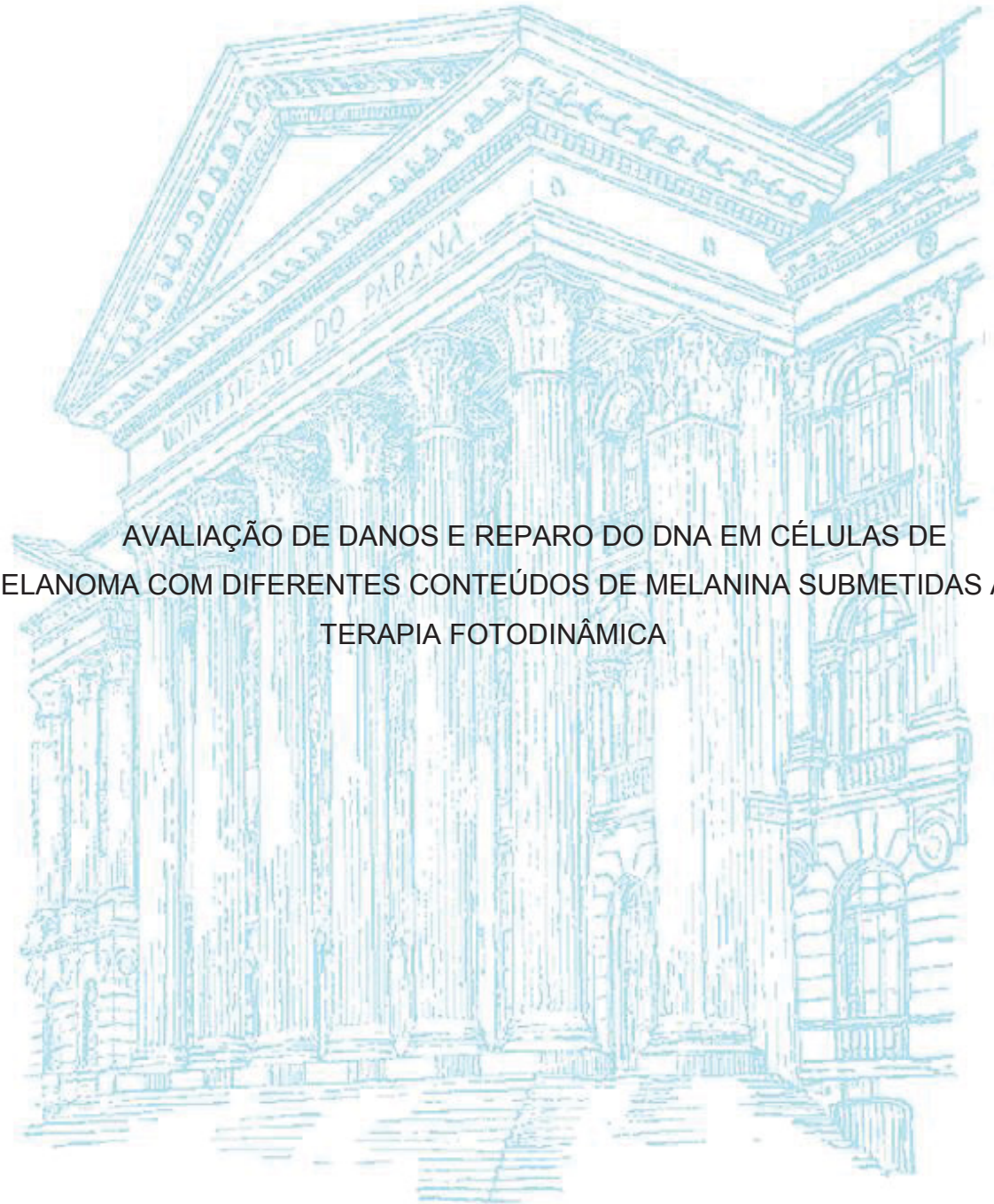
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PALOMA KALEGARI



AVALIAÇÃO DE DANOS E REPARO DO DNA EM CÉLULAS DE MELANOMA COM DIFERENTES CONTEÚDOS DE MELANINA SUBMETIDAS À TERAPIA FOTODINÂMICA

CURITIBA

2017

PALOMA KALEGARI

AVALIAÇÃO DE DANOS E REPARO DO DNA EM CÉLULAS DE MELANOMA COM DIFERENTES CONTEÚDOS DE MELANINA SUBMETIDAS À TERAPIA FOTODINÂMICA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Bioquímica, no Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra.Glaucia Regina Martinez - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular UFPR.
Coorientadora: Profa Dra Daniela Morais Leme - Departamento de Genética - UFPR

CURITIBA

2017

Kalegari, Paloma
Avaliação de danos e reparo do DNA em celulas de melanoma com diferentes conteudos de melanina submetidas à terapia fotodinâmica
Paloma, Kalegari – Curitiba, 2017
89 f il , 30cm

Orientadora Glaucia Regina Martinez
Coorientadora Daniela Morais Leme
Dissertação(Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica

1 Melanina 2 Enzima 3 Oxigênio singleto I Título II Martinez, Glaucia Regina III Leme, Daniela Morais IV Universidade Federal do Paraná Setor de Ciências Biologicas Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica

CDD (20 ed) 574 192

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **PALOMA KALEGARI** intitulada: **AVALIAÇÃO DE DANOS E REPARO DO DNA EM CÉLULAS DE MELANOMA COM DIFERENTES CONTEÚDOS DE MELANINA SUBMETIDAS À TERAPIA FOTODINÂMICA**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

CURITIBA, 30 de Março de 2017.

GLAUCIA REGINA MARTINEZ
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

SILVIA MARIA SUTER CORREIA CADENA
Avaliador Interno (UFPR)

EDVALDO DA SILVA TRINDADE
Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida e proteção em todos os passos da minha vida.

Aos meus pais, José e Dilma, meus maiores exemplos, que sempre me apoiaram e me incentivaram, não medindo esforços para que eu alcançasse meus sonhos.

Ao meu amor, Ricardo, por me incentivar, por me fazer acreditar que sou capaz, muitas vezes acreditando mais em mim do que eu mesma. Por todo seu carinho e sua compreensão.

Aos meus irmãos, Diego e Milena, por estarem sempre ao meu lado.

As minhas amigas de coração e de vida, por todo apoio e carinho.

À minha orientadora Profª Glaucia Regina Martinez pela ótima orientação, confiança e dedicação durante esses dois anos de trabalho.

À Profª Daniela Morais Leme, pela ótima coorientação, pelas ideias e pela disponibilidade em me ajudar e esclarecer minhas dúvidas.

À Profª Silvia Cadena, pela correção dos projetos e relatórios.

A todas as professoras do Grupo de Oxidações Biológicas, pelo apoio e contribuição e a todos os professores do Depto de Bioquímica.

Ao Geonildo Rodrigo Disner, pela ajuda imprescindível nos ensaios cometas e pela paciência de me ensinar e me acompanhar nos dias de experimento.

À Lisandra Santos Ferreira, pela leitura das lâminas do ensaio cometa e pela disponibilidade em auxiliar sempre que foi preciso.

À Hulyana Brum, querida IC. Pela amizade, dedicação e alegria que sempre trouxe ao laboratório.

Aos amigos, Carolina Ribeiro, Otávio Cruz, Rafaela Gomes, pela grande amizade e parceria, risadas e alegrias proporcionadas, além de sempre estarem compartilhando o conhecimento. À Juliana Bark, por tudo isso e por estar ao meu lado desde o início desta caminhada, por todas as conversas e reflexões sobre a ciência e sobre a vida. Ao Willian Meira, meu querido amigo e companheiro no laboratório oxidações 03, por tudo isso e pelos ensinamentos no cultivo celular assim como pela troca de ideias, discussões e conversas. Vocês tornaram minha caminhada mais fácil e divertida.

Aos demais colegas do Laboratório de Oxidações Biológicas do Departamento de Bioquímica da UFPR, pelos auxílios e ideias.

Aos colegas da turma de mestrado de 2015, pelas conversas e troca de ideias.

À pós-graduação em Ciências - Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade.

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

“ *Le courage est la lumière de l´adversité*. ”

Vauvenargues

RESUMO

O melanona é uma neoplasia com incidência crescente, considerado o mais agressivo entre os tipos de câncer de pele e o que possui maior letalidade. Este tipo de tumor é originado nos melanócitos, células produtoras de melanina que é o pigmento que confere coloração à pele e possui um papel protetor em relação ao principal agente etiológico do melanoma, a radiação solar. No entanto, estudos vêm demostrando que a fotoproteção da melanina está mais relacionada aos raios UVB, principalmente pela absorção dessa radiação. Já em relação aos raios UVA e a luz visível, a melanina poderia estar relacionada à promoção de danos às biomoléculas, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) quando irradiada, sendo o oxigênio molecular singlete ($^1O_2$) uma das espécies formadas. A formação do $^1O_2$ também é a base para o mecanismo da terapia fotodinâmica (PDT), utilizada para o tratamento de diferentes tipos de câncer. Contudo, pouco se sabe em relação à resposta adaptativa do tumor após o tratamento com o PDT. O entendimento deste processo poderia auxiliar no melhoramento da terapia para o tratamento do melanoma. Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar danos e reparo do DNA em células de melanoma com diferentes conteúdos de melanina submetidas à fotossensibilização, assim como caracterizar a atividade enzimática da glutationa redutase e glutationa peroxidase após o tratamento. Para isto, as células de melanoma B16-F10 foram estimuladas para produção de melanina com 0,4 mM L-tirosina e 10 mM NH_4Cl durante 48 h. Após a incubação de 2 h com 10 $\mu g.mL^{-1}$ do fotossensibilizador Rosa Bengala Acetato (RBAc), as células foram irradiadas por 15 minutos (lâmpadas de LED - 1.5 J/cm^2 dose total de luz), avaliadas imediatamente após este tratamento e após 18 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT, o qual mostrou redução da viabilidade em quase 60% nas células com maior quantidade de melanina que foram tratadas com RBAc-PDT, comparada com uma redução de 14% para as células não-estimuladas e submetidas a RBAc-PDT. A análise pelo método do Cristal Violeta mostrou resultados similares, mas menos intensos na redução da viabilidade celular. A avaliação dos danos ao DNA foi realizada pelo ensaio Cometa, com a utilização de enzimas de reparo, que permitem a avaliação de danos oxidativos do tipo 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) e de dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD). Quando as análises foram feitas imediatamente após a irradiação, ambos os danos foram maiores nas células estimuladas para a melanogênese, incubadas com RBAc e fotossensibilizadas, o que indica que a presença do $^1O_2$ e da melanina favoreceram tanto a formação de 8-oxodGuo como a formação de CPD. No entanto, após 18 h, o dano do tipo 8-oxodGuo aumentou em relação ao tempo inicial, o que demostra que a melanina pode estar impedindo o reparo desta lesão e ainda promovendo sua formação pós-PDT. Já o dano do tipo CPD diminuiu, provavelmente devido ao reparo. Também foi avaliada a atividade enzimática da glutationa redutase e glutationa peroxidase. Observou-se que, após 18 h, a atividade de ambas as enzimas diminuiu em relação aos controles. Os dados obtidos apontam o envolvimento da melanina na geração de danos ao DNA quando submetida à RBAc-PDT e a permanência do dano 8-oxodGuo na células com melanogênese estimulada, a implicação desses resultados na instabilidade genômica da célula tumoral e no desenvolvemento de resistência à terapia ainda precisam ser melhor investigados.

Palavras-chave: Melanina.Oxigênio Singlete.Danos ao DNA.Enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

Melanoma is a neoplasm with increasing incidence, considered the most aggressive among skin cancers and the one with the highest lethality. This type of tumor originates in melanocytes, cells that produce melanin which is the pigment that gives color to the skin and has a protective role in relation to the main etiological agent of melanoma, solar radiation. However, studies have shown that the photoprotection of melanin is more related to UVB rays, mainly by the absorption of this radiation. In relation to UVA and visible light, melanin could be related to the promotion of damage to biomolecules, producing reactive oxygen species (ROS) when irradiated, with the formation of singlet molecular oxygen ($^1O_2$). The formation of $^1O_2$ is also the basis of the mechanism of photodynamic therapy (PDT), used for the treatment of different types of cancer. However, little is known about the adaptive response of the tumor after treatment with PDT. The understanding of this process could aid in the improvement of therapy for the treatment of melanoma. Thus, the objective of this study was to investigate DNA damage and repair in melanoma cells with different melanin contents submitted to photosensitization, as well as to characterize the activity of glutathione reductase and glutathione peroxidase after treatment. For this, B16-F10 melanoma cells were stimulated to produce melanin with 0.4 mM L-tyrosine and 10 mM NH_4Cl for 48 h. After 2 h-incubation with 10 $\mu g.mL^{-1}$ of the photosensitizer Rose Bengal Acetate (RBAc), the cells were irradiated for 15 minutes (LED lamps - 1.5 J/cm^2 total light dose), evaluated immediately after this treatment and after 18 h. Cell viability was evaluated by MTT, which showed a reduction of almost 60% in viability of cells with the highest amount of melanin treated with RBAc-PDT compared to a reduction of 14% for non-stimulated cells submitted to RBAc-PDT. Analysis by Crystal Violet method showed similar, but less intense reduction on cell viability. The evaluation of DNA damage was performed by the Comet assay, using repair enzymes, which allow the evaluation of oxidative damage 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) and pyrimidine cyclobutane dimers (CPD). When analyses were performed immediately after irradiation, both damages were greater in cells stimulated for melanogenesis, incubated with RBAc and photosensitized, indicating that the presence of $^1O_2$ and melanin favored both the formation of 8-oxoduo as the formation of CPD. However, after 18 h, 8-oxodGuo damage increased compared to the initial time, which shows that melanin may be preventing the repair of the lesion and still promoting its post-PDT formation. The CPD damage type decreased, probably due to the repair. The enzymatic activity of glutathione reductase and glutathione peroxidase was also evaluated. It was observed that, after 18 h, the activity of both enzymes decreased relative to controls. The data obtained indicate the involvement of melanin in the generation of DNA damage when submitted to RBAc-PDT and the permanence of 8-oxodGuo damage in cells with stimulated melanogenesis, the implication of these results in tumor cell genomic instability and the development of resistance still need to be better investigated.

Key-words: Melanin.Oxygen Singlete.Damage to DNA.Antioxidant enzymes

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FASES DA EVOLUÇÃO DO MELANOMA 23
FIGURA 2 - VIA DA MELANOGÊNSE: PRODUÇÃO DE EUMELANINA E FEOMELANINA.....25
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TERAPIA FOTODINÂMICA .27
FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO FOTOSSENSIBILIZADOR ROSA BENGALA ACETATO 30
FIGURA 5 - VIA BIOQUÍMICA PARA A FORMAÇÃO DE CPD 40

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO CIENTÍFICO

FIGURE 1 – B16-F10 CELL VIABILITY MEASURED BY MTT AND CRYSTAL VIOLET 57
FIGURE 2- LEVELS OF DNA DAMAGES QUANTIFIED BY THE ALKALINE VERSION OF THE COMET ASSAY. 61
FIGURE 3 - LEVELS OF DNA DAMAGES QUANTIFIED BY THE HOGG1-MODIFIED ALKALINE VERSION OF THE COMET ASSAY 64
FIGURE 4 - LEVELS OF DNA DAMAGES QUANTIFIED BY THE T4-MODIFIED ALKALINE VERSION OF THE COMET ASSAY. 67
FIGURE 5 - MELANIN DOSAGE OF B16-F10 CELLS STIMULATED FOR MELANOGENESIS 69
FIGURE 6 - ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY – GLUTATHIONE REDUCTASE AND GLUTATIONE PEROXIDASE.....72
FIGURE 7 – CONTROLS OF COMET ASSAY 89

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO CIENTÍFICO

TABLE 1 - TREATMENTS OF DIFFERENT GROUPS OF B16-F10 CELLS 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^{3}\sum g^{-}$ - estado triplete

$^{1}\Delta g$ - primeiro estado singlete

$^{1}\sum g^{+}$ - segundo estado singlete

1PT* - fotossensibilizador no excitado singlete

3PT*- fotossensibilizador no estado triplete

5-ALA - ácido 5-aminolaevulínico

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

ABCG2 - *ATP-binding cassette sub-family G member 2*

BER - reparo por Excisão de Base

BRAF- gene humano que produz uma proteína chamada B-Raf

CBC - carcinoma basocelular

CDKN2A - *cyclin- dependent kinase inhibitor 2*

CEC - carcinoma espinocelular

CPD - dímero de pirimidina ciclobutano

BSO - butionina sulfoximina

dGuo - 2'-desoxiguanosina

DHI - dihidroxi-indol

DHICA - ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxiribonucleico

DQ – dopaquinona

dSp - diasterioisômeros da espiroiminodihidantoína

EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético

EndoIII - endonuclease III

EROS - espécies reativas de oxigênio

FAD - flavina adenina dinucleotídeo

FPG - formamidopirimidina–DNA glicosilase

GPx – glutationa peroxidase

GRed – glutationa redutase

GST - glutationa-S- transferase

GSH - glutationa reduzida

GSSG - glutationa oxidada

HBSS - solução balanceada de Hanks

HEPES – 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfônico

hOGG1 - 8-hidroxiguanina DNA-glicosilase humana

HPLC - Cromatografia líquida de alta performance

INCA - Instituto Nacional de Câncer

LEDs - diodos emissores de luz (*light-emmiting diodes*)

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazil-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

NER - Reparo por Excisão de Nucleotídeo

NF- kB - *factor nuclear kappa B*

NMSC - câncer do tipo não-melanoma

PBS - solução salina fosfato tamponada

PDT - Terapia Fotodinâmica

PTEN - *phosphatase and tensin homolog*

PT - molécula fotossensibilizadora (fotossensibilizador)

RB - Rosa Bengala

RBAc - Rosa Bengala Acetato

RGP - fase crescimento radial

SFB - soro fetal bovino

T4 - T4 pyrimidine dimer glycosylase – endonuclease V

TFIIH - *Transcription factor II Human*

ThdGly - *thymidine glycol*

TP53 - *tumor protein p53*

TYR – tirosinase

UV- radiação ultravioleta

UVA - radiação ultravioleta A

UVB - radiação ultravioleta B

UVC - radiação ultravioleta C

VGP - fase de crescimento vertical

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
1.1 JUSTIFICATIVA 18
1.2 OBJETIVOS 19
1.2.1 Objetivo Geral 19
1.2.2 Objetivos Específicos 19
1.3 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL 20
2 REVISÃO DE LITERATURA 21
2.1 MELANOMA 21
2.1.1 Melanina 23
2.1.2 Tratamento 26
2.2 TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT) 27
2.2.1 Fotossensibilizadores 28
2.2.2 Espécies reativas de oxigênio 31
2.3 RESISTÊNCIA DO MELANOMA À PDT 33
2.4 DANOS AO DNA 35
2.4.1 8-oxodGuo 37
2.4.2 Dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) 38
2.5 REPARO DO DNA 41
2.6 SISTEMA ANTIOXIDANTE 43
3 ARTIGO CIENTÍFICO 46
3.1 ABSTRACT 46
3.2 INTRODUCTION 47
3.3 MATERIALS AND METHODS 49
3.3.1 Chemical and Reagents 49
3.3.2 Equipments 50
3.3.3 Cell culture 50
3.3.4 Melanogenesis stimulus 50
3.3.5 Photosensitization (PDT) 51
3.3.6 Quantification of melanin 52
3.3.7 Cell viability and proliferation assays 53
3.3.8 DNA damages 53
3.3.9 Antioxidant activity enzymes 55

3.3.9.1 Activity of Glutathione peroxidase (GPx) 55
3.3.9.2 Activity of Glutathione reductase (GRed) 55
3.3.10 Statistical analysis 55
3.4 RESULTS AND DISCUSSION 56
3.4.1 Cell viability.....56
3.4.2 DNA damages 59
3.4.3 Melanin dosage 68
3.4.4 Antioxidant enzymes.....70
4 CONCLUSION.....73
5 ACKNOWLEDGMENTS.....74
6 CONCLUSÕES 74
7 REFERÊNCIAS.....76
SUPPLEMENTARY MATERIAL 1.....89

1 INTRODUÇÃO

O melanoma é considerado o mais agressivo entre os tipos de câncer de pele e o que possui maior letatidade, mesmo tendo uma baixa icidência. (BALDEA et al., 2016a, INCA, 2016). A luz ultratioleta (UV) é um dos principais fatores ambientais relacionados com o surgimento de melanomas, sendo que a interações entre este fator com o acúmulo de alterações genéticas levam ao desenvolvimento deste tipo de tumor (TUONG et al., 2012). Estudos revelam que a exposição solar está relacionada ao surgimento de diversas formas de câncer cutâneo, incluindo o melanoma (ZAIDI et al., 2008; CARLSON, J. ANDREW et al., 2009).

Os tumores de melanoma são originados dos melanócitos, presentes na pele, na mucosa e na úvea. Estas células estão localizadas na camada basal da epiderme e são produtoras do pigmento denominado melanina (SLOMINSKI et al., 2004), o qual é sintetizado em organelas especializadas, os melanossomos. A síntese da melanina é denominada melanogênse, um processo que envolve diversas reações que podem resultar em dois principais tipos, a feomelanina, que confere coloração a peles claras e a eumelanina, que é descrita como característica de peles escuras (BUSCA e BALLOTTI, 2000; ITO; WAKAMATSU, 2003).

Considera-se a principal função da melanina a proteção celular contra possíveis danos causados pela radiação UV, por sua capacidade de absorver fótons principalmente em relação aos raios ultravioleta B (UVB) (YAMAGUCHI et al., 2007). Além disso, este pigmento pode atuar como *scavenger* de espécies reativas de oxigênio (EROS) (TADA et al., 2010;DAVIDS; KLEEMANN, 2011). No entanto, estudos demostram que a melanina pode exercer um papel tanto fotoprotetor como fotossensibilizador (HILL et al., 1997). A fotoproteção da melanina relaciona-se com a radiação UVB, a qual é absorvida pela epiderme. Já a fotossensibilização está relacionada com a radiação UVA e luz visível (CHIARELLI-NETO, 2014), sendo sua penetração mais profunda alcançando a camada da derme na pele (ZAIDI et al., 2008). A melanina quando excitada pode levar a geração de espécies como o oxigênio molecular singlete ($^1O_2$), podendo levar por consequência à formação de danos às biomoléculas (HALLIDAY et al., 2007). O $^1O_2$ é caracterizado como o estado eletronicamente excitado do oxigênio molecular, sendo uma das formas mais reativas e tóxicas entre as EROS.

Cunha et al. (2012) demostraram que o estímulo com L-tirosina e NH_4Cl para aumentar a síntese de melanina em células foi capaz de gerar EROS, demostrando que além da interação da melanina e seus precursores com a irradiação UV (MUNOZ-MUNOZ et al., 2009), a própria melanogênese pode contribuir na geração de EROS (CUNHA et al., 2012).

Estudos realizados com os dois tipos de melanina, eumelanina e feomelanina, e seu precursor, o ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico (DHICA), mostraram que esses compostos são capazes de promover quebras no DNA, podendo até mesmo impossibilitar a ação de enzimas de reparo (SUZUKAWA et al., 2012; PELLOSI et al., 2014). Quando submetidos à luz visível, os melanócitos também podem sofrer danos, através da fotossensibilização da melanina e geração do $^1O_2$, o que pode levar a fotoxidação do DNA e a morte celular (CHIARELLI-NETO et al., 2014).

A formação de EROS é a base de terapia fotodinâmica (PDT), um tratamento que vêm sendo utilizado para diversos tipos de câncer, sendo também explorada como uma alternativa para o tratamento de melanoma (DAVIDS; KLEEMANN, 2011). No mecanismo desta terapia, utiliza-se um fotossensibilizador, que excitado em determinado comprimento de onda, interage com o oxigênio, levando à formação de radicais de oxigênio (mecanismo do tipo I) e do $^1O_2$ (mecanismo do tipo II) o que pode mediar citotoxidade e morte celular (KUSHIBIKI et al., 2013).

Um fotossensibilizador muito utilizado para este fim é o corante Rosa Bengala (RB), que fotocatalisa a conversão do estado triplete do oxigênio para o estado singlete. Uma vez fotossensibilizado, o RB pode ser utilizado para eliminar microrganismos, tais como vírus e bactérias gram-positivas. Além disso, pode induzir efeitos fotodinâmicos *in vitro* em diferentes tipos celulares, tais como células epiteliais pigmentadas da retina, glóbulos vermelhos entre outros (PANZARINI et al., 2014). No entanto, uma vez que a estrutura do corante é aniônica, mesmo em altas concentrações, ele não consegue atravessar a membrana com eficiência, então são necessários derivados hidrofóbicos, tais como os obtidos pela adição do grupo acetato à molécula, gerando o Rosa Bengala Acetato (RBAc) (PANZARINI et al., 2011).

Existem alguns mecanismos de resistência do melanoma a este tipo de terapia, os quais podem ser atribuídos à própria melanina, ao efluxo mediado pelos transportadores ABCG2, resposta citoprotetora por indução de autofagia, entre outros (HUANG et al., 2014).

O DNA é uma molécula alvo para as EROS, sendo que o principal dano gerado pela oxidação do DNA por $^1O_2$ é a 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo). Este tipo de dano é capaz de induzir transversões de guanina para timina e, caso não seja reparado, a mutação torna-se permanente (MARTINEZ et al., 2002; CADET; WAGNER, 2013). As lesões à molécula de DNA podem estar relacionadas com os mecanismos celulares de doenças e o envelhecimento. Além dos danos oxidativos, o DNA pode ser alvo das mutações induzidas pela luz solar, das quais surgem os chamados fotoprodutos, como os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) (SCHUCH et al., 2017). Estes são gerados quase instantaneamente pela radiação UVB, uma vez que este tipo de radiação é o componente mais energético da radiação solar. Os raios UVA, de menor energia, induzem preferencialmente CPDs em locais TT, considerados ineficientes para geração de CPDs que causam mutações entre citosinas e timinas (LAZOVICH et al., 2010).

PREMI et al. (2015) mostraram que quando melanócitos são expostos à radiação UVA, CPDs são gerados em menos de três horas após a exposição. Além disso, evidenciaram que na via bioquímica para a formação deste tipo de dano, a melanina mostra-se como um participante ativo e importante. Assim como os danos oxidativos, estes fotoprodutos podem interferir em processos celulares vitais da célula, podendo levar ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer de pele (CADET et al., 2012; MECH, 2014).

O reparo de DNA para diferentes tipos de lesões, tais como as descritas acima, é considerado uma forma de proteção celular. Além disso, o sistema antioxidante celular constitui barreiras contra as EROS e outras espécies nocivas, prevenindo ou removendo o dano oxidativo na molécula-alvo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Uma molécula de grande importância no sistema antioxidante celular é a glutationa, tripeptídeo que possui capacidade de proteção que é mediada pelas enzimas glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (Gred) (MITTLER, 2002; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Considerando a importância do $^1O_2$ na etiologia e no tratamento do melanoma, assim como o papel fotossensibilizador da melanina, neste estudo foi investigado como o $^1O_2$ poderia interferir na formação de danos ao DNA e no seu reparo. Os danos ao DNA estão envolvidos no processo de carcinogênese e alguns tipos de lesões podem resultar em mutações. Assim, a compreensão dos efeitos da interação entre a melanina, o DNA e o $^1O_2$ poderia ser importante para melhorar os

tratamentos do melanoma. Para isto, foram utilizadas células de melanoma murino B16-F10 induzidas para aumentar a síntese de melanina, sendo os danos ao DNA e atividade de enzimas antioxidantes avaliados imediatamente ou 18 h após a fotossensibilização.

1.1 JUSTIFICATIVA

O melanona, originado nos melanócitos, é uma neoplasia com incidência crescente, sendo um tipo de câncer de elevada letalidade. O principal agente etiológico ambiental para o melanoma é o espectro de UV da radiação solar. A melanina, pigmento que confere coloração à pele, possui um papel considerado fotoprotetor em relação a este tipo de radiação, uma vez que possui a capacidade de absorver a luz ultravioleta. A proteção celular está relacionada contra os raios UVB, uma vez que pode ser capaz de eliminar os radicais livres e as EROS. No entanto, estudos têm discutido sobre a participação deste pigmento na promoção de danos às biomoléculas, principalmente quando submetidas à irradiação UVA e fontes de $^1O_2$. Uma vez que o dano ao DNA está envolvido no processo de carcinogênese e que alguns tipos de lesões podem resultar em mutações, é importante entender os efeitos da interação entre a melanina e o DNA, assim como o $^1O_2$ poderia afetar este sistema. Desta forma, tais fatores poderiam estar relacionados à resistência do melanoma ao tratamento do câncer pela terapia fotodinâmica. A este respeito, a resposta adaptativa após o tratamento com o $^1O_2$ ainda é pouco conhecida e o entendimento deste processo poderia auxiliar no delineamento de terapias alternativas para o seu tratamento.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

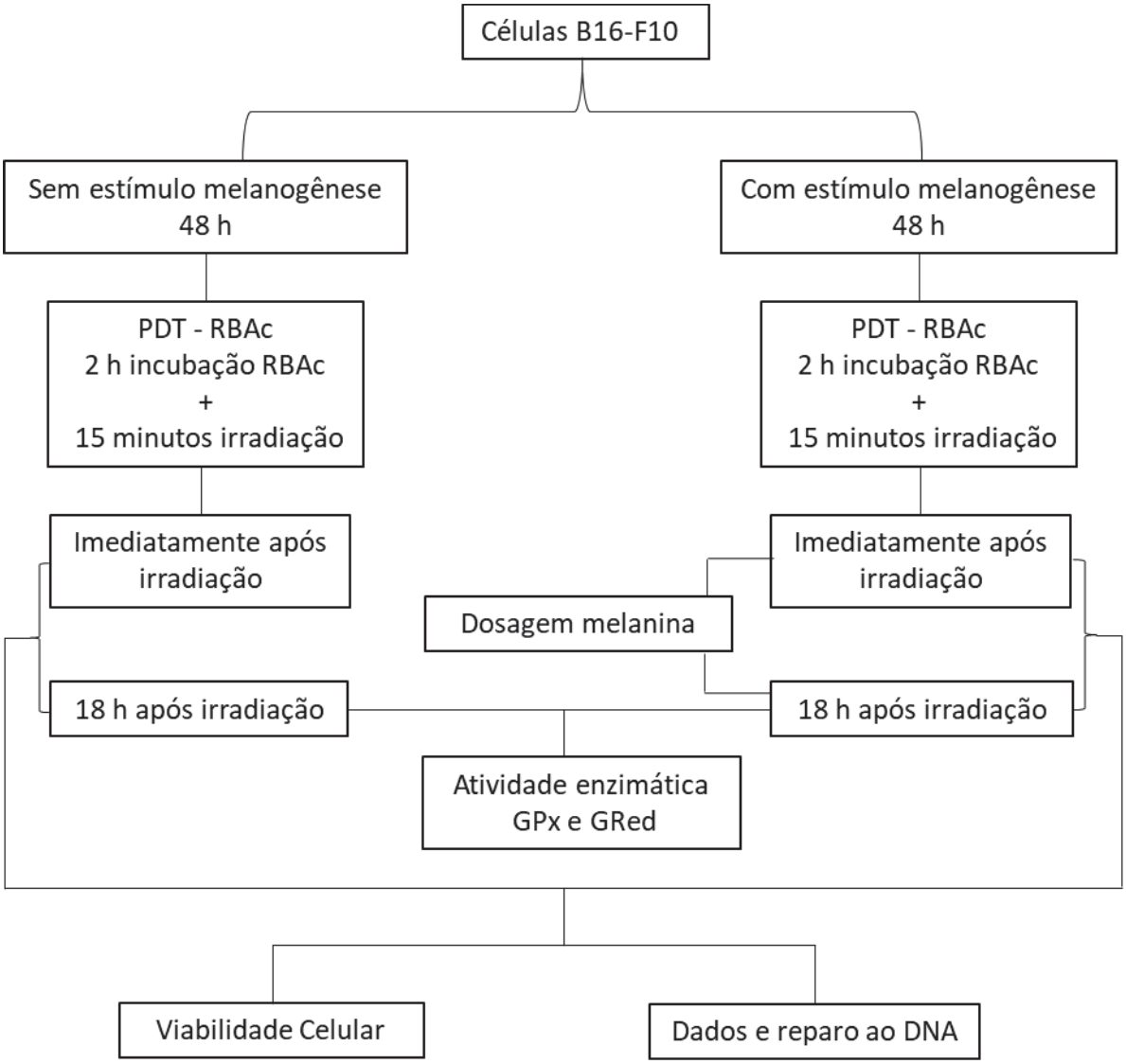
Investigar danos e reparo do DNA em células de melanoma com diferentes conteúdos de melanina e submetidas à fotossensibilização, assim como medir a atividade das enzimas antioxidantes após o tratamento.

1.2.2 Objetivos Específicos

São objetivos específicos desse estudo avaliar em células de melanoma murino B16-F10 após indução da melanogênese e submetidas à fotossensibilização com Rosa Bengala e luz visível:

- A viabilidade celular;
- Os danos ao DNA do tipo 8-oxo-2`-desoxiguanosina (8-oxodGuo) e dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) e capacidade de reparo desses danos;
- O conteúdo de melanina;
- A atividade de enzimas relacionadas com o sistema antioxidante da glutationa: glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (GRed).

1.3 Estratégia experimental



2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MELANOMA

Segundo o *National Cancer Institute*, o termo câncer pode ser utilizado para doenças em que as células anormais se dividem sem controle e podem invadir os tecidos circundantes e se espalhar por diversas partes do corpo. O câncer de pele é um dos tipos de câncer mais comuns, podendo ser dividido em câncer do tipo não-melanoma (NMSC) e câncer do tipo melanoma. Entre os tipos de câncer de pele não melanoma estão o carcinoma basocelular (CBC) e o carcinoma espinocelular (CEC) (SKIN CANCER FOUNDATION, 2016).

O melanoma é um tipo de câncer de pele que possui elevada letalidade, porém baixa incidência (INCA, 2016). O melanoma pode ser categorizado em: nodular, acrolentiginoso, lentiginoso maligno e disseminativo superficial. O primeiro citado é a forma mais invasiva do melanoma (SKIN CANCER FOUNDATION, 2016).

Indivíduos com tumor metastático de melanoma possuem um tempo médio de sobrevida de 8 a 9 meses, sendo a taxa de 3 anos de sobrevida inferior a 15% (BALCH et al., 2015). A incidência de melanomas vem crescendo no mundo (ERDEI; TORRES, 2010), sendo 4% dos casos de câncer dermatológicos e responsável por 80% das mortes ocasionadas por câncer de pele (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). Nos Estados Unidos estima-se que uma morte ocorre por hora como consequência do melanoma e para o ano de 2017 foram estimados 87.100 novos casos deste tipo de tumor (SKIN CANCER FOUNDATION, 2017). No Brasil, no ano de 2014 foram estimados aproximadamente 6000 novos casos de melanoma (INCA, 2014).

Os tumores de melanoma são originados nas células produtoras de pigmento, os melanócitos, localizados na camada basal da epiderme (SLOMINSKI et al., 2004). A pele é dividida em três camadas distintas: epiderme, derme e hipoderme. Os queratinócitos são o principal tipo celular presente na epiderme, sendo os melanóticos presentes nas proximidades da junção da epiderme com a derme (MADISON, 2003;LEPHART ,2016).

O desenvolvimento dos melanócito é constituído de várias etapas, incluindo sua diferenciação a partir da crista neural, migração, proliferação e diferenciação de melanoblastos em melanócitos, a proliferação e maturação de melanócitos nos locais-

alvo (CICHOREK et al., 2013). Estão localizados na pele, cabelo e olhos, sendo responsáveis pela quantidade, qualidade e distribuição do pigmento melanina (ITO; WAKAMATSU, 2003).

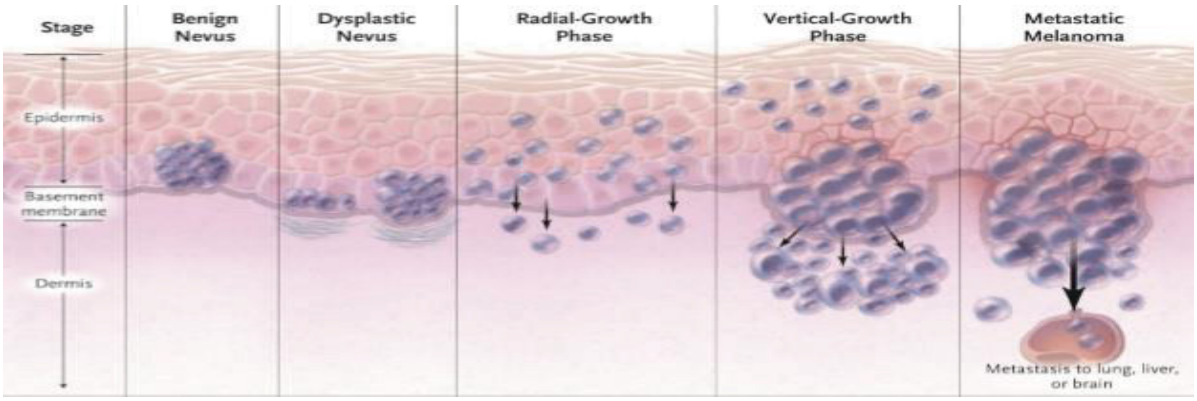
Os fatores associados ao surgimento de melanomas são diversos, como, por exemplo, fatores ambientais e genéticos. O principal agente etiológico ambiental para o melanoma é o espectro de UV da radiação solar sendo considerado um agente cancerígeno responsável pela iniciação e promoção de câncer de pele de células basais e de carcinoma escamoso, além exercer um importante papel na indução do melanoma maligno (ZAIDI et al., 2008; CARLSON, J ANDREW et al., 2009). A radiação ultravioleta é dividida em três regiões: UVA (320–400nm), UVB (280–320 nm) e UVC (200–280 nm) (GRUIJL, DE et al., 2001). A radiação UVC é considerada biologicamente irrelevante, uma vez que é quase completamente absorvida pela camada de ozônio. Já as radiações UVA e UVB chegam à superfície da Terra, sendo a radiação UVB absorvida pela epiderme e a radiação UVA penetra mais profundamente na derme (BINIEK et al., 2012). No entanto, a radiação UVB é considerada mais carcinogênica que o espectro UVA (ZAIDI et al., 2008). A penetração dos raios UV na pele pode iniciar uma série de reações fotoquímicas que contribuem para condições agudas, como, por exemplo, eritemas, como também para condições crônicas, como o fotoenvelhecimento e os diferentes tipos de câncer de pele (ARMSTRONG; KRICKER, 2001).

Fatores genéticos também estão relacionados à predisposição do melanoma: histórico familiar e características físicas da pele como, por exemplo, sardas, cabelos louro ou ruivo (SULEM et al., 2007). Além disso, o tipo fenotípico do indivíduo é considerado relevante no desenvolvimento deste tipo de câncer, uma vez que indivíduos de pele, cabelos e olhos claros são mais suscetíveis às queimaduras solares, consequentemente são mais suscetíveis a desenvolver o melanoma do que aqueles com a pele altamente pigmentada (BERWICK et al., 2009). Os fatores genéticos relacionados na etiologia do melanoma incluem genes herdados de alto, médio e baixo risco de susceptibilidade bem como inúmeras mutações somáticas nos tumores de melanoma. O gene CDKN2A (cyclin- dependent kinase inhibitor 2) é considerado o gene de maior susceptibilidade genética para melanomas, além de outroas como PTEN, TP53 e BRAF (HILL et al., 2013).

O desenvolvimento do melanoma ocorre de forma gradual, iniciando-se a partir de um nevo benigno que consiste em uma população clonal de melanócitos que

se prolifera a uma lesão hiperplásica, não progredindo devido a senescência celular (MOOI; PEEPER, 2006). No entanto, o nevo pode exibir displasia acarretada por mutações no DNA, progredindo para um estágio conhecido como espalhamento superficial (fase crescimento radial RGP) com característica de baixo potencial invasivo. Por fim, estas células podem gerar metástase, uma vez que adquirem habilidade para invadir a derme (fase de crescimento vertical VGP) (MILLER e MIHM, 2006). Este modelo, conhecido como modelo de Clark, é apresentado na FIGURA 1.

FIGURA 1 - FASES DA EVOLUÇÃO DO MELANOMA



FONTE: adaptado com permissão de *Massachusetts Medical Society, Publisher of the New England Journal of Medicine* (MILLER; MIHM (2006)). Copyright Massachusetts Medical Society.
NOTA: Progressão do melanoma, no qual, o melanócito pode adquirir a capacidade de invadir a derme e sofrer metástase. São 5 fases principais no desenvolvimento do melanoma: nevo benigno, nevo displásico, melanoma de crescimento radial, melanoma de crescimento vertical e melanoma metastático.

2.1.1 Melanina

A melanina, pigmento que confere coloração à pele, cabelos e olhos, tem sua síntese no interior de organelas especializadas, os melanossomos, presentes em células de melanócitos (RILEY, 2003). Este pigmento é derivado da oxidação e polimerização da tirosina (D'ISCHIA et al., 2015).

Em seres humanos, e nos vertebrados de uma maneira geral, a biossíntese da melanina, denominada melanogênese, é uma via metabólica onde ocorre a oxidação da tirosina em dopaquinona, seguida então de outras etapas que dão origem a um pigmento indólico, a eumelanina, ou a um pigmento contendo subunidades de benzotiazina, a feomelanina. A pigmentação em humanos envolve uma combinação

destas vias acarretando uma composição variada em cada indíviduo (PROTA, 1992;RILEY, 2003). A eumelanina tem sido descrita como característica de peles escuras e a feomelanina presente em peles claras (ITO; WAKAMATSU, 2003).

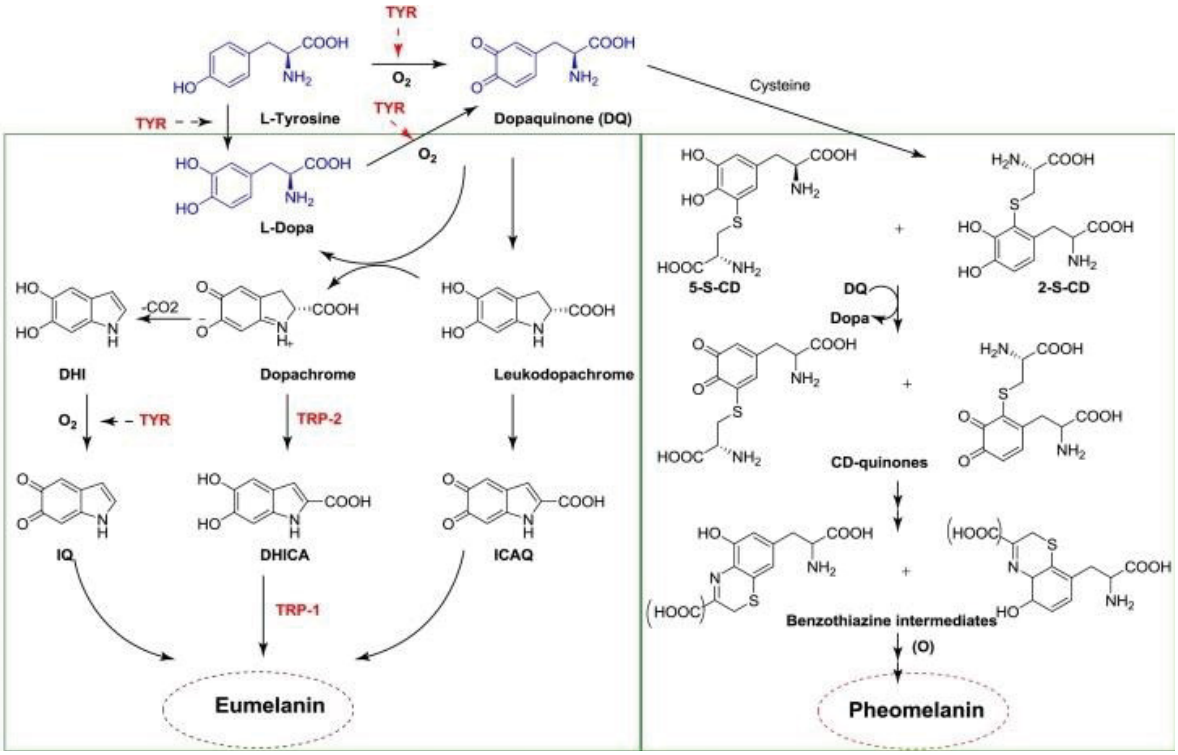
A eumelanina (FIGURA 2) é composta por unidades de dihidroxi-indol (DHI) e ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico (DHICA) derivadas da tirosina (PROTA, 1992) A polimerização oxidativa destes compostos em várias proporções dá origem a coloração escura encontrada neste pigmento (ITO; WAKAMATSU, 2011). A feomelanina pertence ao grupo de melaninas amarelas-avermelhadas, é derivada da oxidação de precursores cisteinil-DOPAs através da via do benzotiazina e seus intermediários (D´ISCHIA et al. 2013).

As primeiras etapas da síntese da melanina são catalisadas pela enzima tirosinase que atua na oxidação da tirosina (PARK et al., 2009). A via da melanogênese envolve muitos eventos celulares com diferentes vias de regulação transcricionais e traducionais (NORDLUND, 1998), assim como reações enzimáticas e não enzimáticas (FIGURA 2) tendo como passo inicial e limitante a oxidação do aminoácido tirosina à dopaquinona pela metaloenzima tirosinase (ANCANS et al., 2001).

A melanogênese inicia-se com a oxidação da L-tirosina em dopaquinona (DQ) pela ação da enzima tirosinase, considerada uma enzima chave de tal via. A formação desta quinona serve de substrato para a síntese de ambas as formas de melanina (eumelanina e feomelanina). Após a formação da DQ, ocorre uma ciclização intramolecular para a produção de ciclodopa, chamada também de leucodopacromo. A ciclodopa pode reagir com a DQ, gerando assim o dopacromo, que dará origem aos grupamentos indol do polímero de eumelanina. Durante esta última reação, há regeneração da L-DOPA. O dopacromo, então, é rearranjado para formar o DHI (5,6-dihidroxindol) e, se sofrer ação da enzima Tyrp2 (proteína 2 relacionada à tirosinase, também conhecida como dopacromo tautomerase - Dct), gera DHICA (5,6-dihidroxindol-2-ácido carboxílico). O DHI pode ser novamente oxidado pela ação da DQ; já o DHICA sofre oxidação pela Tyrp1 (proteína 1 relacionada à tirosinase, também chamada de DHICA oxidase) em murinos ou pela tirosinase, em humanos. A oxidação e polimerização desses dihidroxindóis produzem eumelanina. Entretanto, na presença de cisteína ou glutationa, DQ é convertido em 5-S-cisteníldopaquinona, sendo oxidada por reações redox com dopaquinonas e cisteinildopaquinonas que,

sequencialmente formam de feomelanina (HEARING; JIMÉNEZ, 1987; ITO; WAKAMATSU, 2003; BARBI DE MOURA et al., 2012; PILLAIYAR et al., 2016).

FIGURA 2 - VIA DA MELANOGÊNSE: PRODUÇÃO DE EUMELANINA E FEOMELANINA



FONTE: Com permissão de Elsevier. PILLAIYAR et al. (2016).

NOTA: O esquema apresenta a síntese de melanina no melanossomo, iniciando com a oxidação da tirosina à L-DOPA pela tirosinase. A dopaquinona é um intermediário altamente reativo e na ausência de compostos tióis, sofre ciclização intramolecular, levando à produção de eumelanina. Entretanto, a presença de tióis, como cisteína, leva a geração de cisteinil-DOPAs, unidades formadoras da feomelanina.

A melanina é considerada fotoprotetora uma vez que possui a capacidade de absorver a luz ultravioleta (DAVIDS; KLEEMANN, 2011), absorvendo fótons, um efeito conhecido como *blackout* (YAMAGUCHI et al., 2007). A capacidade protetora da melanina atribui-se principalmente contra os raios ultravioleta B (UVB). Além disso, outras propriedades também podem contribuir para esse efeito, como a habilidade das melaninas de remover EROS ou de inibir sua formação, atuando como *scavenger* de radicais livres (HOOGDUIJN et al., 2004; TADA et al., 2010).

No entanto, pesquisas vêm mostrando que a melanina pode exercer um papel tanto fotoprotetor como fotossensibilizador (HILL et al., 1997). CHIARELLI-NETO et al. (2014) verificaram que a luz visível pode causar danos aos melanócitos através da

fotossensibilização da melanina e geração do $^1O_2$, causando a fotoxidação do DNA e a morte celular. Embora a melanina possa proteger a célula de danos celulares causados por irradiação UVB, a exposição à luz visível pode levar a lesões pré-mutagênicas ao DNA, as quais posteriormente podem contribuir para doenças como o câncer de pele.

Sendo assim, a fotossensibilização do pigmento relaciona-se com a radiação UVA e luz visível (CHIARELLI-NETO, 2014), uma vez que após a excitação da melanina podem ser geradas espécies como o $^1O_2$, que subsequentemente acarretam na formação de danos às biomoléculas (HALLIDAY et al., 2007). Uma vez que a radiação UVA penetra mais profundamente na pele comparada com a UVB, é considerada a fonte de radiação que mais contribui para o desenvolvimento de melanoma (AGAR et al., 2004). Além disso, a interação da melanina e seus precursores com a irradiação UV também pode gerar EROS (KOCH, CHEDEKEL,1987), como demonstrado em estudos *in vitro* em que foram detectadas espécies como superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio e radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) após irradiação da melanina em solução (KORYTOWSKI et al., 1987). MUNOZ-MUNOZ et al. (2009) demostraram *in vitro* que há formação de H_2O_2 durante a melanogênese, de forma dependente e não-dependente de enzimas. Cunha et al. (2012) demostraram que o estímulo melanogênico foi capaz de promover parada reversível no ciclo celular, gerar EROS e alterar o perfil de expressão de diversas proteínas celulares, como ATP sintase, CDK3 (*cyclin-dependent kinase*) e chaperonas, envolvidas no metabolismo, crescimento e recuperação celular, respectivamente.

2.1.2 Tratamento

Em relação ao tratamento do melanoma, a excisão cirúrgica é utilizada para tumores iniciais (TUONG et al., 2012). Neste caso, é recomendado que o tumor fosse removido com uma margem de 1 a 5 cm ao redor do mesmo, dependendo da sua espessura. Os tumores em estágios mais avançados são resistentes à radioterapia e a muitas drogas quimioterápicas que possuem atuação no DNA, microtúbulos e topoisomerases (DUDLEY et al., 2008). O primeiro quimioterápico aprovado para este tratamento foi a dacarbazina (MOUAWAD et al., 2010) sendo seguido pela utilização de outras drogas tais como a temozolamida, fotemustina, cisplatina e o paclitaxel, utilizados individualmente ou combinados (THOMPSON et al., 2005). Recentemente,

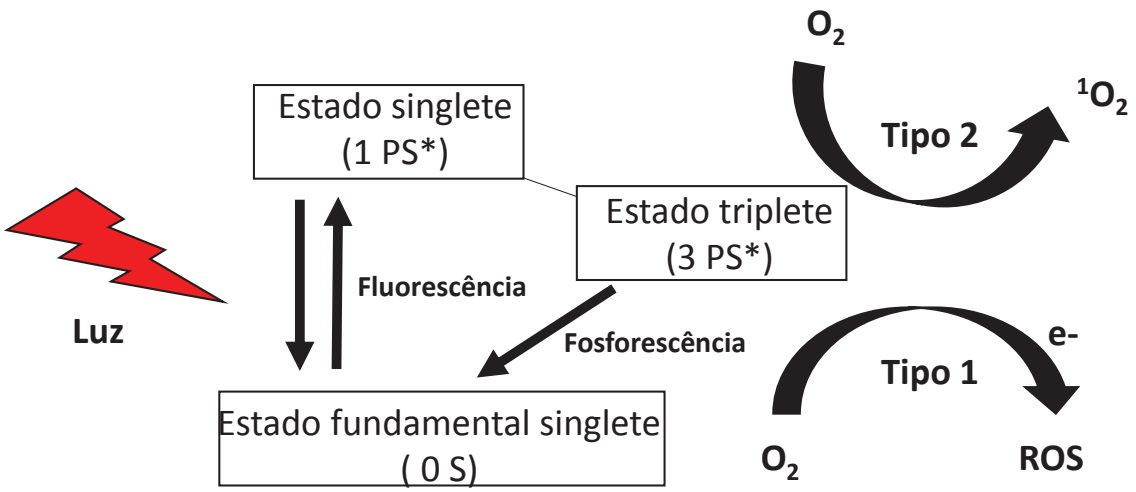
quimioterápicos que atuam nos genes BRAF como o Vemurafenib e o Dabrafenib, apresentam maior eficiência e menor toxicidade quando comparados às terapias usuais (LO et al., 2016). Uma terapia que tem sido utilizada para o tratamento de alguns tipos de câncer de pele é a terapia fotodinâmica (PDT) (DAVIDS; KLEEMANN, 2011).

2.2 TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT)

A terapia fotodinâmica (*photodynamic therapy* – PDT) pode ser definida como uma terapia que combina corantes não tóxicos (ou fotossensibilizadores) e luz visível para produzir EROS, as quais consequentemente podem levar à morte celular e à destruição tecidual (CASTANO et al., 2004; MROZ et al., 2011). O mecanismo de ação desta terapia baseia-se na utilização de um fotossensibilizador que uma vez ativado pela luz em um determinado comprimento de onda, favorece a geração de EROS, a partir do O_2 (KUSHIBIKI et al., 2013).

Quando os fotossensibilizadores (PS) são irradiados com luz ultravioleta ou visível em determinados comprimentos de onda, absorvem energia e passam a um estado excitado singlete (1 PS*), o qual é rapidamente convertido a um estado triplete (3PS*) por inversão espontânea do spin do elétron excitado. O estado 1 S* também pode decair para o estado fundamental singlete (0 S) com emissão de fluorescência (DAI et al., 2012; ALLISON; MOGHISSI, 2013). Como o tempo de vida do estado triplete (3PS*) é mais longo, ele pode transferir seu elétron para o substrato orgânico, levando à formação de radicais que, após interação com O_2, levam à geração de EROS como H_2O_2, $O_2^{\bullet-}$ e $^{\bullet}OH$, sendo denominada esta reação tipo I. Alternativamente, neste mesmo estado (3PS*) a energia do fotossensibilizador pode ser transferida diretamente para o O_2 dissolvido na solução, gerando o $^1O_2$, chamado mecanismo do tipo II. As reações do tipo I e II podem ocorrer simultaneamente e a importância de cada uma depende da molécula alvo, da eficiência da transferência de energia do sensibilizador para o O_2, do solvente e da concentração de O_2 (CASTANO et al., 2004; BUYTAERT, DEWAELE et al., 2007; DAI et al., 2012) (FIGURA 3).

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TERAPIA FOTODINÂMICA



FONTE: O autor

NOTA: O fotossensibilizador (PS) inicialmente absorve um fóton que o exita para o primeiro estado singlete, podendo ser convertido para o estado triplete. Desta forma, pode interagir com o oxigênio molecular em duas vias, tipo I e tipo II, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e oxigênio molecular singlete ($^1O_2$), respectivamente.

2.2.1 Fotossensibilizadores

Fotossensibilizadores são compostos naturais ou sintéticos que transferem energia luminosa. A fotossíntese é forma de transferência de energia que é a base da vida na Terra, desta forma, muitas estruturas permitem a transferência de luz (ALLISON; MOGHISSI, 2013). No entanto, para ser considerado um bom agente fotossensibizador para PDT, o composto deve ter algumas catacteristicas tais como: baixos níveis de toxicidade no escuro, tanto para humanos como para animais experimentais e baixo índice de toxicidade administrativa. Além disso, é necessário que o PS esteja localizado no local da ação fotodinâmica, absorva apropriados comprimentos de onda da luz visível (400 – 700 nm) e produza respostas biológicas (CASTANO et al., 2004; DETTY et al., 2004).

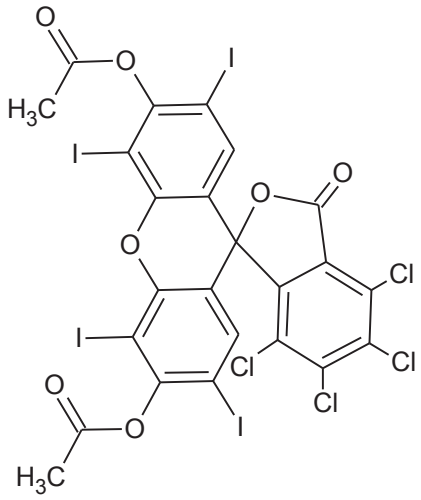
Os derivados de clorofila de plantas e bactérias são considerados excelentes agentes fotossensibilizadores, assim como os corantes e porfirinas. A maioria dos PS utilizados tanto clinicamente e experimentalmente são derivados do núcleo aromático tetrapirrólico (formado por quatro anéis pirrólicos) encontrado em pigmentos como heme clorofila e bacterioclorofila (ALLISON; SIBATA, 2010). Mesmo muitas estruturas tendo sido identificadas como agente fotossensibilizador, poucas são utilizadas em

ensaios clínicos, devido à especificidade já discutida acima. ONISZCZUK et al., 2016 compilaram alguns dos fotossensibilizadores utilizados atualmente tanto em testes *in vitro* como em estudos clínicos: fotossensibilizadores à base de porfirina, verde de indocyanina (ICG), Riboflavina, Azul de metileno, entre outros.

O Rosa Bengala (RB) é um corante sintético utilizado como fotossensibilizador, sendo um agente quimioterapêutico ativo para o tratamento de melanoma. Este composto pertence à classe dos xantenos solúvel em água, utilizado no cuidado com os olhos, por exemplo na avaliação de danos na córnea e na conjuntiva, podendo induzir fototoxicidade nas células epiteliais da retina (MCMASTER et al., 2010; KOEVARY, 2012). A estrutura deste corante é aniônica, o que faz com que em baixa concentração, o RB não atravesse a membrana celular com facilidade. Desta forma, para que a acumulação intracelular seja possível é necessário o desenvolvimento de derivados hidrofóbicos do RB, tais como acetato. O grupo acetato quando adicionado a este fotossensibilizador gera o chamado Rosa Bengala Acetato (RBAc) (FIGURA 4), o qual faz com que a molécula fique com caracter mais hidrofóbico, facilitando sua capacidade de internalizar nas células (PANZARINI et al., 2011).

Os xantenos são compostos cíclicos com três anéis aromáticos com um átomo de oxigênio no centro. São responsáveis pela absorção de luz na região espectral visível. Estes corantes não se ligam à membrana celular e estão localizados no citoplasma. O Rose Bengala é um haleto de fluoresceína que quando usado em terapia fotodinâmica pode matar microorganismos como vírus, bactérias e protozoários. Exposto à luz a 532 nm ativa a reação do tipo II, em que há conversão do estado triplete do oxigênio para o estado singlete. A vantagem de xantenos sobre outros fotossensibilizadores é que os xantenos podem ser administrados por via oral (SCHÄFER et al., 2000; WOOD et al., 2006; PERUSSI, 2007). As EROS são produzidas por meio da utilização do RB após irradiação com luz visível verde, nos comprimentos de onda entre 530 – 560 nm. Devido a esta capacidade mínima penetrante, o RB torna-se útil no tratamento de muitas lesões cutâneas e doenças dermatológicas (PANZARINI et al., 2011).

FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO FOTOSSENSIBILIZADOR ROSA BENGALA ACETATO



FONTE: O AUTOR (2017).

NOTA: Estrutura química do composto Rosa Bengala Acetato utilizado como agente quimioterapêutico ativo para o tratamento de melanoma.

A escolha da fonte de luz depende do tipo de fotossensibilizadores. As fontes mais significativas são lasers e fontes de luz incandescente. Uma fonte de luz alternativa é os diodos emissores de luz (LEDs) caracterizados por largura de banda espectral estreita e altas taxas de fluência. Além disso, LEDs capazes de produzir luz em comprimento de onda adequado e potência adequada para fotossensibilizadores (MANG, 2004; PEREIRA ROSA; SILVA, 2014).

O acúmulo dos produtos gerados pelas reações demostradas na FIGURA 4 inicia uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos que resultam na morte das células e destruição de tecidos, induzindo necrose e apoptose (CHOUDHARY et al., 2009). Em nível celular, o fotossensibilizador pode atuar por diferentes mecanismos, tais como mediador de fagocitose e endocitose, receptor de ligação de lipoproteína de baixa densidade, absorção via tirosina-quinase, receptor de crescimento epidérmico, difusão, biodistribuição e algumas outras vias ainda não bem elucidadas (CASTANO et al., 2005; ALLISON; MOGHISSI, 2013). Para entender como o fotossensibilizador interage com as células no tecido ou tumor alvo, precisa-se entender que ele pode estar localizado em diferentes locais das células, tais como em mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e membranas plasmáticas. Muitas pesquisas vêm elucidando as vias bioquímicas que ocorrem nas células quando estas são submetidas à PDT. Há uma resposta aguda ao estresse que levam,

por exemplo, às alterações no metabolismo de cálcio, lipídios e produção de citocinas e proteínas de estresse. Ainda, enzimas são ativdadas e fatores de transição são expressos. Muitas das respostas celulares estão relacionadas às mitocôndrias, o que frequentemente leva à indução da apoptose pela via mitocondrial, envolvendo caspases e liberação de citocromo c. No entanto, em determinadas circunstâncias, as células sujeitas a PDT também podem morrer por necrose. Além disso, danos ao DNA podem ser causados por este tipo de terapia (CASTANO et al., 2004).

CASTANO et al. (2005) identificaram três possíveis mecanismos, possivelmente inter-relacionados da ação da PDT para o tratamento de tumores. O primeiro mecanismo seria que as EROS geradas por esta terapia poderiam matar as células tumorais diretamente por apoptose e/ou necrose. Tais tipos de mortes programadas dependem dos parâmetros utilizados na PDT, como a natureza do fotossensibilizador, sua concentração, localização subcelular e a dose de luz utilizada. Um segundo mecanismo seria que a PDT poderia danificar a vascularização associada ao tumor, levando à privação de oxigênio e nutrientes ao tecido. Por fim, a terapia fotodinâmica poderia ativar uma resposta imunitária contra as células tumorais, sendo este o terceiro mecanismo.

PANZARINI et al. (2011) demostraram que a utilização do RBAc fotoativado por luz visível à 530 $\pm$ 15nm (Total dose 6 J/cm^2) em células HeLa resultou em morte por apoptose e autofagia. Os autores propõem que a apoptose pode ocorrer por quatro diferentes vias, tais como via mitrocontrial (ou instrinseca), via extrinseca, via mediada pelo estresse do retículo endoplasmático e via independente de caspases.

2.2.2 Espécies reativas de oxigênio

EROS e outros radicais estão envolvidos com uma grande variedade de fenótipos celular, tais como mutação, carcinogenese, doenças degenerativas entre outras doenças. Consideram-se como EROS todas as moléculas que contêm um oxigênio num estado altamente reativo.

O O_2 é um birradical que, embora apresente elétrons não emparelhados no orbital molecular de mais alta energia, é relativamente estável porque estes elétrons possuem o mesmpo spin, impedindo o O_2 de agir como radical livre. Mesmo sendo o oxigênio essencial para vida da maioria dos organismos, seus benefícios podem ter um custo nas funções celulares, como, por exemplo, a formação de radicais livres de

oxigênio (LEPHART, 2016). A entrada de energia ou de mais um elétron nesta molécula leva à formação de espécies químicas como o $^1O_2$ e o $O_2^{\cdot -}$ (KOHEN e NYSKA, 2002).

As EROS podem ser classificadas em dois grupos: espécies radicais e não radicais. O grupo de radicais é formado por compostos tais como radical óxido nítrico (NO), radical íon superóxido $O_2^{\cdot -}$, radical hidroxila ($HO^{\cdot}$), peroxil ($ROO^{\cdot}$), radicais alcoxil ($RO^{\cdot}$). São consideradas radicais uma vez que contem pelo menos um elétron desemparelhado e são capazes de existência independente. O grupo de EROS consideradas não radicais é composto por uma variedade de substâncias, dentre as quais existem algumas muito reativas mesmo não sendo consideradas radicais pela definição. Entre eles estão o ácido hipocloroso (HClO), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), peróxidos orgânicos, aldeídos, ozônio (O_3), entre outros (VASSALLE et al., 2004; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A geração de EROS pode ter um papel benéfico para as células, desempenhando função de sinalização inter e intracelular assim como pode ser prejudicial uma vez que modificam biomoléculas celulares, as quais em altos níveis estão associadas ao desenvolvimento de diversas doenças (EVANS *et al*., 2004). As células produzem tais espécies na respiração mitocondrial ou pela exposição de substâncias que estimulem sua produção. No passado, as EROS eram consideradas basicamente como tóxicas e capazes de produzir modificações oxidativas irreversíveis alterando o equilíbrio bioquímico celular de forma letal. No entanto, atualmente, como vários estudos têm mostrado que baixos níveis de EROS são indispensáveis como mediadores de muitos processos celulares, incluindo diferenciação, progressão do ciclo celular, crescimento, apoptose e imunidade, as EROS vêm ganhando um novo papel nos sistemas biológicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

2.2.2.1 Oxigênio molecular singlete

Dentre as EROS, o $^1O_2$ é uma das formas mais reativas e tóxicas, caracterizado como o estado eletronicamente excitado do oxigênio molecular e sendo capaz de oxidar grande parte das biomolécula (FOOTE, 1991). O oxigênio molecular no seu estado fundamental possui dois elétrons com spins paralelos ocupando dois orbitais π de mesma energia, caracterizando um estado chamado triplete ($^3\sum_g^-$). Com um acréscimo de energia, pode haver restrição à regra de conservação do spin, sendo

então gerada uma forma mais reativa do oxigênio, conhecida como o oxigênio molécular singlete. No seu primeiro estado $^1\Delta g$ existem dois elétrons com spins opostos no mesmo orbital e no segundo estado excitado, $^1\sum_g^+$, tem um elétron em cada orbital π degenerado, com spins opostos, fazendo com que tal espécie possua um tempo de meio vida muito curto. Portanto, apenas o primeiro estado apresenta interesse em sistemas biológicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE ,2007; RONSEIN et al., 2006).A geração de tal espécie pode ocorrer de diversas formas: fotossensibilização do tipo II, reação entre peróxido de hidrogênio e hipoclorito ou peroxinitrito e ainda por decomposição térmica deendoperoxidos derivados de naftaleno (HELD et al., 1978; FOOTE, 1991; DI MASCIO et al, 1994; PIERLOT et al., 2000). Em laboratório, o $^1O_2$ é comumente gerado por é geralmente gerado por reações de fotossensibilização, nas quais são utilizadas moléculas conhecidas como fotossensibilizadores (RONSEIN et al., 2006).

2.3 RESISTÊNCIA DO MELANOMA À PDT

Existem estudos que demostram resultados otimistas em relação à eficácia da PDT para tratamentos do câncer, tanto em experimentos *in vitro* quanto *in vivo*, sugerindo um possível papel desta terapia no tratamento de melanomas. Esse método apresenta como vantagens uma boa seletividade às células tumorais, sendo pouco invasivo e podendo ser aplicado sozinho ou em conjunto com outras terapias como quimioterapia e imunoterapia (JUARRANZ et al., 2008). A eficiência desta terapia tem sido demonstrada em câncer de pele não melanoma e outros tipos de câncer de pele tais como linfoma e em desordens dermatológicas como vitiligo e psoríase (BABILAS et al., 2010).

Um dos primeiros estudos realizados em 1988 para verificar a eficácia PDT em melanoma comparou o efeito do derivado de hematoporfirina (fotofrina II) em ratos com tumores de melanoma amelanótico e ratos com tumores de melanoma melanótico. Este estudo demonstrou efeito terapêutico no câncer amelanótico, mas não no melanoma melanótico. Os autores concluíram que a resistência do melanoma melanótico à PDT foi devida à presença da melanina que competiu com o fotossensibilizador para a absorção de fótons ou no processo de transferência de energia a partir do estado triplete excitado do sensibilizante para melanina em vez de oxigênio celular. Por isto, devido ao papel fotoprotetor conferido às células pela

melanina, a PDT inicialmente não teve muito sucesso contra o melanoma (WANG et al., 2008).

Posteriormente, estudos foram direcionados para investigar e sintetizar fotossensibilizadores capazes de exercer a sua ação após irradiação em diferentes comprimentos de onda (mais longos) a partir do espectro de absorção de melanina. Desta forma, o PS empregado é altamente importante na PDT, e alguns PS freqüentemente utilizados em clínica nem sempre são eficazes no câncer da pele do tipo melanoma (FELSHER, 2003). CÓRDOBA et al. (2005) analisaram os efeitos do ácido 5-aminolaevulínico (5-ALA), amplamente utilizado em aplicações clínicas em dermatologia, em linhagens de células de melanoma e em modelo transgênico de melanoma. Os resultados mostram que, embora mesmo as células de melanoma fossem vulneráveis à 5-ALA PDT *in vitro*, melanomas malignos *in vivo* foram bastante resistentes a este tipo de terapia em doses que são altamente eficazes *in vitro*.

Vários mecanismos de resistência do melanoma à PDT podem ser relacionados, tais como: interferência óptica, mecanismos de defesa antioxidante da melanina, resposta citoprotetora por indução de autofagia, e os transportadores ABCG2 que atuam como bombas de efluxo tornando as células capazes de eliminar quantidades tóxicas de porfirinas, por exemplo (HUANG et al., 2014).

No entanto, a PDT demonstrou-se eficaz em várias condições oncológicas e não oncológicas. Utilizando fotossensibilizadores lipofílicos estáveis de segunda geração com comprimentos de onda otimizados, a PDT pode ser uma ferramenta promissora para terapia adjuvante no combate ao melanoma. Para esta segunda geração, tem-se buscado fotossensibilizadores que sejam estáveis, acumulados preferencialmente no tecido-alvo, que apresentem mínima toxicidade na ausência de luz e máxima eficácia quando irradiados, além de maior rendimento da geração de $^1O_2$. Tem-se utilizado, principalmente, hidroxiquinonas cromóforas naturais (DAVIDS; KLEEMANN, 2011). Alguns alvos potenciais para a atuação da terapia fotodinâmica na erradicação do melanoma seriam: inibição da proliferação celular, a ativação da morte celular e a redução da autofagia pró-sobrevivência e uma diminuição no sistema antioxidante celular (DAVIDS; KLEEMANN, 2011).

KRESTYN et al. (2010) avaliaram os efeitos fotodinâmicos em células de melanoma humano G361 sensibilizadas por zinco-5,10,15,20-tetraquis (4-sulfonatofenil) porfirina (ZnTPPS4), cloroaluminio ftalocianina disulfonato e ácido 5-aminolevulínico (ALA), examinando a eficiência da PDT dependendo da dose de luz

aplicada. Os resultados demonstram o efeito fototóxico mais significativo da cloroaluminio ftalocianina disulfonato apesar da produção de ROS significativamente mais elevada induzida por ZnTPPS4-PDT em células G361. MAMOON et al. (2009) exploraram a eficiência do verde de indocyanina ICG como um agente PDT para o melanoma humano e seu papel na via da morte celular. Na via da morte celular, a geração de $^1O_2$ resultou em consequências que desencadeiam a apoptose após exposição a laser durante apenas 15 minutos, incluindo a liberação de citocromo c, a ativação de caspases totais, caspase 3 e caspase 9, a inibição de NF- KB, e o aumento da fragmentação do DNA e acetilação das histonas.

Com a utilização de novas cloridinas fundidas com 4,5,6,7-tetra-hidropirazolo [1,5-a] piridina, PEREIRA et al. (2015) estudaram a capacidade fotossensibilizadora em células cancerígenas melanóticas e amelanóticas. O novo fotossensibilizador conduziu à morte de células de melanoma humano, sendo apoptose e necrose mecanismos envolvidos na resposta ao tratamento. Em relação à PDT ser utilizado com coadjuvante para terapias de combate ao melanoma, RIZZI et al. (2017) avaliaram nanopartículas de sílica como nanotransportadores de fármacos, conjugados com o fotossensibilizador verteporfina de segunda geração, testando então um modelo de PDT *in vitro* como uma ferramenta potencial para o tratamento do melanoma. A técnica usada não afetou a proliferação celular na linhagem de queratinócito humano normal (HaCaT) ou na linhagem de melanoma de baixa capacidade metastática (A375P). Por outro lado, a PDT afetou significativamente o comportamento da linhagem celular de melanoma com alta capacidade invasiva (SK-MEL-28), o qual foi observado a partir da redução na proliferação e mudança na morfologia celular.

2.4 DANOS AO DNA

Os diferentes tipos de EROS podem causar danos ao DNA sendo o mecanismo de lesão dependente do tipo de espécie envolvida na reação (CADET; TREOULE, 1978). Uma variedade de agentes endógenos e exógenos pode induzir danos e levar à instabilidade genômica. As EROS são constantemente geradas como consequência do metabolismo endógeno, infecção e inflamação ou exposição à agentes tóxicos. Desta forma, as EROS podem causar danos diretamente ao DNA ou à outras biomoléculas que também podem atuar na geração deste tipo de dano. Os tipos de

lesões à molécula de DNA estão relacionados com transcrição, replicação e mutação, podendo estar envolvidos na etiologia de doenças e envelhecimento humano (YU et al., 2016).

A relação entre as EROS e o dano ao DNA envolve eventos como o aparecimento de sítios abásicos (apurínicos e apirimidínicos), purinas e pirimidinas oxidadas e quebra de fita simples e dupla do DNA, além de ligações cruzadas entre DNA e proteínas. Essas espécies também podem produzir anéis saturados de timina, hidroximetiluracila, fragmentos de timina e abertura do anel de adeninas (KRYSTON et al., 2011).

Uma grande variedade de lesões de DNA pode ser induzida por EROS diretamente, incluindo lesões de um único núcleo de uma base, lesões em tandem e adutos de DNA derivados de ácido hipocloroso (HOCl) e ácido hipobromoso (HOBr). Ainda, EROS também podem conduzir à peroxidação lipídica, cujos subprodutos também podem reagir com o DNA para produzir lesões de DNA exocíclicas. Nas últimas décadas, o envolvimento dessas lesões na etiologia de doenças e envelhecimento vem sendo investigado, sugerindo que os adutos de DNA induzidos por oxidação, especialmente lesões volumosas de DNA, podem servir como biomarcadores para explorar o papel do estresse oxidativo em doenças humanas (YU et al., 2016).

As quatro bases nitrogenadas são suscetíveis a danos oxidativos, pois possuem baixos potenciais de redução. A guanina é a base com menor potencial de redução, fato que explica a grande quantidade de danos causados por sua oxidação (STEENKEN; JOVANOVIC, 1997). A espécie mais reativa ao DNA é o $^{\bullet}OH$, podendo reagir tanto com as bases, quanto com os açúcares do DNA, não sendo a reação específica para nenhuma das espécies. Este radical pode gerar diversas de lesões, que envolvem a adição nas duplas-ligações das bases nitrogenadas ou abstração do hidrogênio do grupo metil da timina ou das ligações C–H da desoxirribose. Dependendo do mecanismo envolvido, vários produtos são originados devido às reações de rearranjo subsequentes à formação de radicais centrados no C ou no N (EVANS et al., 2004).

O $^1O_2$ é uma das EROS mais reativas e tóxicas, reativa à base guanina do DNA, mas não à pentose (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Estudos realizados com DNA demonstram que o principal dano gerado pela oxidação do $^1O_2$ é a 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) (RAVANAT, J. L. et al., 2001). A formação desse

produto de oxidação ocorre por reação do tipo cicloadição de Diels-Alder (CADET et al., 2006).

2.4.1 8-oxodGuo

O principal dano gerado pela oxidação do $^1O_2$ é a 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo). Outros produtos de oxidação também podem ser gerados pela reação do $^1O_2$ com a guanina, como o par de diasterioisômeros da espiroiminodihidantoína, (dSp), que pode ser gerada tanto pela oxidação direta da 2'-desoxiguanosina (dGuo) pelo $^1O_2$, quanto pela re-oxidação da 8-oxodGuo (8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina) anteriormente formada (MARTINEZ et al., 2002; CADET; WAGNER, 2013).

A 8-oxodGuo pode induzir transversões de guanina para timina (CADET; TEOULE,1978). A guanina uma vez oxidada é capaz de parear com adenina ao invés de citosina. Assim, um par, antes G-C, pode tornar-se um par T-A na próxima replicação do DNA. Se o dano não for reparado, a mutação torna-se permanente (Hermes-Lima, 2004). A presença deste produto é utilizada como biomarcador para indicar o grau de estresse oxidativo na célula (DAVID et al., 2010).

RAVANAT et al. (2001) mostraram um aumento significativo de 8-oxodGuo após incubação das células com um gerador químico de $^1O_2$. SUZUKAWA et al. (2012) investigaram o desenvolvimento de melanoma e relação da melanina na resistência à terapia fotodinâmica avaliando o efeito desses fatores sobre os danos e reparos do DNA. Os resultados apresentados em níveis de danos do tipo 8-oxodGuo e ThdGly mostram que ambos os tipos de melanina (eumelanina e feomelanina) levam à quebra do DNA na ausência de luz e que melaninas reagindo com o oxigêncio singlete podem ter modificações estruturais, o que resulta na redução da habilidade de promover quebras ao DNA. CHIARELLI-NETO et al. (2014) verificaram que a luz visível pode danificar os melanócitos por meio da fotossensibilização da melanina e da geração de $^1O_2$, diminuindo assim a viabilidade celular, aumentando a permeabilidade da membrana e causando tanto a fotooxidação do DNA quanto a morte celular necroapoptótica. A exposição à luz visível leva a lesões pré-mutagênicas do DNA, demostradas por análises de ensaio cometa onde foi possível a verificação de lesões como a 8-oxodGuo, entre outras modificações oxidativas em pirimidinas.

2.4.2 Dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD)

Além dos danos oxidativos ao DNA, existem as mutações induzidas pela luz solar, das quais surgem os chamados fotoprodutos, como por exemplo, os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD). Tais fotoprodutos podem ser formados pela radiação UVA (315 to 400 nm) e UVB (280-315nm) (LAZOVICH , 2010). O efeito direto da irradiação UV ocorre quando o DNA absorve fótons da UV-B, uma vez que este tipo de radiação é o componente mais energético. Isto resulta no rearranjo estrutural de nucleotídeos e, consequentemente, a alterações na cadeia da DNA. Os dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPD) e pirimidina (6-4) pirimidona (6-4 fotoprodutos, 6-4 PPs) são os principais produtos da lesão do DNA induzida por UVB. Esses fotoprodutos de DNA são formados quase instantaneamente, pois absorção direta de fótons UVB induz a cicloadição entre C5-C6 de duas bases adjacentes de pirimidina e as transforma em CPD. Já os produtos pirimidina (6-4) pirimidona (6-4 fotoprodutos, 6-4 PPs) formam-se a partir de uma ligação covalente entre C6 do 5'-base e C4 da base 3´ afim de distorcer o DNA (RAVANAT, J.-L. et al., 2001). Então, na formação deste tipo de dano pela radiação UVB, observa-se o efeito protetor da melanina. Os raios UVA de menor energia, os quais constituem cerca de 95% da energia ultravioleta que penetra na terra, são considerados ineficientes para a produção de CPDs que causam mutações entre citosinas e timinas (PREMI et al., 2015). Diferentemente da irradiação UVB, a radiação UVA induz preferencialmente a produção de CPDs em locais TT e é ineficiente na produção deste tipo de fotoprodutos que causam mutações C → T (LAZOVICH et al., 2010). Embora alguns estudos relacionem a radiação UVA à indução de CPDs em células de mamíferos, considera-se a radiação UVA pouco absorvida pelo DNA e seus efeitos genotóxicos podem ser explicados principalmente pela indução de estresse oxidativo (DOUKI et al., 2003, MOURET et al., 2006). Estas características podem indicar que a radiação UVA não induz CPDs através de uma via de excitação direta, mas mais provavelmente através do mecanismo de fotossensibilização, devido a uma transferência de energia (PAGLIOSA et al., 2010).

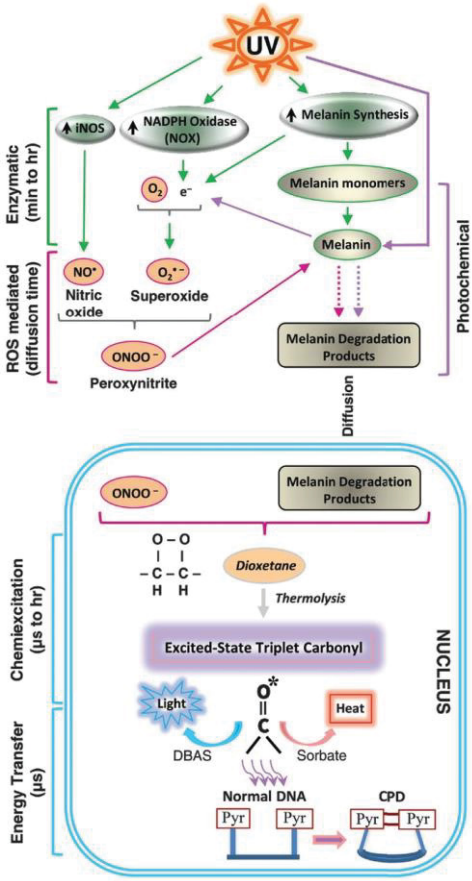
Embora a UVA seja fracamente mutagênica e produza tanto os produtos oxidativos de dano ao DNA, principalmente em guaninas, quanto baixos níveis CPDs, a UVB é considerada mais mutagênica devido à sua capacidade de produzir efetivamente CPDs. A maioria das mutações que ocorrem em melanomas humanos induzidas pela radiação UV são do tipo substituições citosinas por timinas em locais

adjacentes a pirimidinas. Estes danos surgem a partir de CPDs, que acabam causando a distorção do DNA. Desta forma, por mecanismos indireto, podem também ser formados danos oxidativos ao DNA (PFEIFER et al., 2005; CADET; DOUKI, 2011; BRASH, 2015).

As consequências biológicas da formação destes fotoprodutos podem ser variadas. Eles podem interferir nos processos celulares vitais da célula, como a transcrição e replicação, resultando na redução de RNA, parada do ciclo celular e resistência à apoptose, podendo levar ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer de pele (CADET et al., 2012; MECH, 2014).

PREMI et al. (2015) mostraram que em melanócitos, CPD são gerados em menos de três horas após exposição à radiação UVA. Neste estudo ainda forneceram evidências da via bioquímica para a formação deste tipo de dano, no qual a melanina mostra-se como um participante ativo (FIGURA 5).

FIGURA 5 - VIA BIOQUÍMICA PARA A FORMAÇÃO DE CPD



FONTE: Com permissão de *Science* (PREMI et al., 2015).

NOTA: Modelo para a geração de CPD em melanócitos por quimiexcitação, com melanina como um participante ativo. Sabe-se que a exposição de células à radiação UV regula iNOS (nitrito oxidase sintase), NADPH oxidase (NOX) e enzimas da síntese da melanina, o que ocasiona a geração de óxido nítrico (NO) e superóxido ($O_2^{\cdot -}$). A partir destes dois radicais forma-se o peroxinitrito ($ONOO^-$), responsável pela degradação da melanina em fragmentos. A melanina e seus fragmentos entram no núcleo e o $ONOO^-$ excita um elétron em um fragmento de melanina para seu estado triplete, que possui maior energia que um fóton UV. A reação intermediária para obtenção deste estado cria um dioxiteno instável, o qual sofre uma termólise espontânea para produzir duas carbonilas, sendo que uma delas adquire a maior parte da energia e termina em um estado triplete. Esta energia então é descarregada em microssegundos gerando luminescência visível, ou de forma independente de radiação, em DBAS (a ser emitida como fluorescência), sorbato (a ser dissipada na forma de calor e isomerização) ou evidentemente em bases do DNA, gerando os CPDs.

2.5 REPARO DO DNA

O pareamento específico das bases nitrogenadas do DNA é essencial para a preservação da informação contida no genoma. No entanto, devido a agentes tóxicos endógenos e exógenos, como por exemplo, a radiação UV, as propriedades estruturais e propriedades de pareamento destas bases podem ser afetadas. Quando estes danos do DNA permanecem não reparados por períodos prolongados em locais do DNA essenciais, a replicação e a transcrição do DNA são dificultadas ou a mutação é induzida, o que pode causar morte celular, senescência celular e carcinogênese (MORIWAKI, 2016). Para se proteger contra esses danos causados por UV, os organismos possuem os chamados "sistemas de reparo do DNA", os quais podem reparar eficientemente os danos "nocivos" do DNA através de mecanismos precisos pelas funções integradas de muitas proteínas. Existem muitas vias de reparo no DNA, sendo que, para cada tipo de dano, existe uma via de reparo específica (PETERSON; CÔTÉ, 2004).

Danos ao DNA podem ser reparados pelos sistemas de reparo celulares. Consideram-se três tipos de reparos possíveis aos danos oxidativos do DNA: reparo de excisão de bases (BER), reparo de excisão de nucleotídeos (NER) e reparo de erro de pareamento (LUNEC *et al.*, 2002). A maioria dos danos oxidativos são reparados por BER. A via BER é considerada a via de maior relevância danos oxidativos (MORIWAKI, 2016).

O mecanismo da via de reparo por excisão de bases envolve diversos tipos de enzimas glicosilases que reconhecem o dano no DNA e catalisam uma clivagem hidrolítica da ligação N-glicosídica entre a base modificada e o açúcar. Uma vez que a base foi removida, o par resultante açúcar-fostato é chamado sítio abásico (apurínico ou apirimidínico). Nestes sítios atuam as enzimas AP endonucleases, as quais clivam a ligação fosfodiéster imediatamente adjacente ao sítio AP. Então o gap resultante é preenchido com o auxílio da enzima DNA polimerase (POLβ), que incorpora o nucleotídeo correto e o DNA é ligado pela ação da ligase 3 (LIG3), caracterizado como mecanismo de via curta. Por outro lado, o DNA também pode sofrer a ação das DNA polimerases normalmente envolvidas na replicação do DNA, POLδ ou POLε, dando origem à chamada via longa. Neste mecanismo, há incorporação de 2 a 10 nucleotídeos, sendo que a fita substituída é removida pela

DNAse IV ou pela FEN1 (flap endonuclease I) e a ligação das fitas é realizada pela DNA ligase 1 (LIG1) (HEGDE et al., 2008; ZHARKOV, 2008).

No mecanismo de reparo para 8-oxodGuo em humanos, atuam as enzimas N-glicosidases MutYH e a hOGG1 em uma via BER, sendo em bactérias *E. coli* esta enzima denominada Fpg (FPG - formamidopirimidina-DNA-glicosilase). A guanina quando oxidada, resultando em 8-oxodGuo, tem preferência em parear com uma adenina, ao invés de citosina, podendo ser reparada pela enzima hOGG1 ou ser pareada de forma errada com uma adenina. A enzima MUTYH pode reconhecer este erro e então remove a adenina, permitindo que o par 8-oxodGuo – citosina seja reconhecido pela hOGG1. Caso o reparo não ocorra pode haver mutação da sequência em um próximo ciclo de replicação (DAVID *et al.*, 2010).

Muitos estudos utilizam enzimas prócarioticas para a identificação de danos ao DNA, uma vez que estas são mais acessíveis e menos custosas. SUZUKAWA et al. (2012) avaliaram as lesões de DNA mediadas por melanina utilizando as enzimas de reparo EndoIII e FPG para identificação do grupo de lesões induzidas. Ambas as enzimas catalisam uma reação de duas etapas, onde a primeira etapa é a retirada da base oxidada (atividade N-glicosilase) seguida de uma clivagem 3`e 5` neste sítio para que se forme um *gap* de uma base nitrogenada. A enzima FPG reconhece 8-oxoguanina, 8-hidroxiguanina e formamidopirimidina, enquanto a enzima EndoIII reconhece quebras na cadeia, sítios abásicos e modificações adicionais oxidativas de pirimidina (TCHOU *et al.*, 1994). CHIARELLI-NETO et al. (2014) também demostraram por meio das mesmas enzimas de reparo os danos de DNA causados pela fotosensibilização da melanina na luz visível.

Por sua vez, o reconhecimento das lesões CPD é realizado principalmente pela via de reparo de excisão de nucleotídeos (NER). Nesta via existem dois mecanismos, o reparo global do genoma (GG-NER) e transcrição-acoplada ao reparo (TC-NER). O GG-NER elimina as lesões geradas no conjunto genoma, enquanto TC-NER preferencialmente remove as lesões localizadas nas cadeias de DNA transcritas e de molde. Uma série de etapas fazem parte do mecanismo NER, sendo iniciada pelo o reconhecimento de danos ao DNA por um grupo de proteínas seguida pelo desenovelamento o DNA de cadeia dupla nas lesões, onde o fator de transcrição TFIIH torna-se importante além de proteínas envolvidas na estabilização da região de DNA de cadeia simples e na abertura para prosseguir para a próxima etapa. Posteriormente, ocorre a excisão de ambos os lados do DNA danificado por enzimas

endonucleases, seguida da síntese de DNA da única cadeia e ligação com a cadeia parental, completando o reparo (FOUSTERI; MULLENDERS, 2008; KAMILERI et al., 2012; MORIWAKI, 2016).

Em algumas circunstâncias, os CPDs podem ser reparados por reparo de excisão de base pela enzima endonuclease T4 (CAFARDI; ELMETS, 2008). Esta enzima realiza o reconhecimento de CPDs em procariotos. Esta enzima reconhece o dano e insere a extremidade 5´ da ligação glicosídica nos dímeros de pirimidina. Além disso, a enzima T4 hidrolisa os locais apúricos e apirimídicos no oligonucleotídeio (KIM et al., 2010). Já foi demostrado que a enzima acelera o reparo de CPD tanto em células cultivadas quanto em pele intacta (GILCHREST; ELLER, 1999). CECCOLI et al., 1989 encapsularam a endonuclease T4 em lipossomos. A enzima encapsulada era ativa, e quando aplicada a células humanas irradiadas por radiação ultravioleta (UV) em cultura, os lipossomas aumentaram a incisão de DNA celular irradiado com UV, aumentaram a replicação de reparo de DNA e aumentaram a sobrevivência de células irradiadas com UV.

2.6 SISTEMA ANTIOXIDANTE

Além do mecanismo de reparo do DNA, também considerado parte do sistema antioxidante celular, as células possuem outros diversos tipos de mecanismos antioxidantes, constituindo assim barreiras contra as EROS e outras espécies nocivas. Segundo HALLIWELL; GUTTERIDGE (2007) um antioxidante é *"qualquer substância que retarda, previne ou remove o dano oxidativo em uma molécula-alvo".* O sistema antioxidante pode ser dividido em quatro classes: antioxidantes primários que agem diretamente com as EROS; defensores auxiliares que possuem papel de suporte para o sistema antioxidante primário; proteínas/enzimas complexadas com metais e compostos de baixo peso molecular que minimizam a participação de íons cobre e ferro; sistemas de reparo que reparam os danos em biomoléculas causados por tais tipos de espécies (HERMES-LIMA, 2004).

Uma molécula de grande importância no sistema antioxidante celular é a glutationa, um tripeptídeo constituído por glutamato, cisteína e glicina. É um antioxidante solúvel presente no meio intracelular em concentrações de 0,1 a 10 mM que, além de servir como cosubstrato para enzimas como a glutationa peroxidase, pode reagir com espécies tais como $^{\bullet}OH$, HOCl, $ONOO^-$ e $^1O_2$. A glutationa presente

nas células encontra-se principalmente em sua forma reduzida (GSH) e a razão entre esta forma e sua forma oxidada (GSSG) varia durante condições de estresse oxidativo, sendo considerada um marcador para tal tipo de evento (HERMES-LIMA, 2005; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O sistema redox que envolve a glutationa é considerado essencial para a proteção da pele, uma vez que existe uma correlação entre a melanogênese e o estado redox intracelular, principalmente mantido pelos antioxidantes baseados em grupos tióis. Acredita-se que glutationa pode exercer um papel crucial tanto na regulação da pigmentação como na adaptação do processo de melanogênese mediado por estresse oxidativo (PANICH et al., 2012). Desta forma, a razão GSH/GSSG é indicativa não somente do estado redox de células cutâneas, mas também da eficácia dos sistemas de regeneração. Por isso a diminuição do nível de glutationa é considerada um indício de estresse oxidativo (OBIN *et al.*,1998). MELONI e FRANC, 2003 monitoraram o nível de glutationa em epiderme após irradiação UV-B em diferentes tempos de recuperação. A quantificação de GSH e GSSG foi realizada por HPLC (Cromatrografia líquida de alta eficiência). O esgotamento da GSH foi observado imediatamente após a irradiação e manteve-se entre 1 e 5 horas.

A síntese de GSH ocorre no citoplasma por um processo que envolve a enzima γ-glutamilcisteína ligase, a qual participa da ligação do glutamato à cisteína, seguida da ligação da glicina ao dipeptídeo formado, catalisada pela glutationa sintetase. A atuação antioxidadente da GSH ocorre devido a sua capacidade de oxidação, catalisada pela glutationa peroxidase. As glutationas peroxidases são enzimas responsáveis por decompor o H_2O_2 e outros derivados de peróxidos em água ao mesmo tempo que ocorre a oxidação de GSH até GSSG. Uma vez que o grupamento tiol livre é responsável pela atividade antioxidante, a GSSG não possui tal atividade, sendo necessário ser reconvertida à sua forma reduzida. A glutationa redutase (GRed) que catalisa a redução da GSSG à GSH tem seu poder redutor proveniente do NADPH, que é oxidado durante a redução do GSSG, qual é formada por 2 moléculas de GSH ligadas por uma ponte dissulfeto (MITTLER, 2002; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Existem 4 tipos de GPx: a GPx1, encontrada no citoplasma de mamíferos, chamada também de “isoforma clássica”, a GPx2, que é encontrada no trato intestinal; a GPx3, nos fluidos extracelulares e a GPx4, que possui como particularidade a habilidade de decompor peróxidos derivados de lipídeos. Para exercer sua função

redox, a GPx utiliza o selênio como cofator (Hermes-Lima, 2005). A GRed possui 2 subunidades; cada uma contém um FAD (flavina adenina dinucleotídeo) no sítio ativo, que atua na transferência de elétrons para a ponte dissulfeto do GSSG. (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Outra enzima relacionada com a glutationa é a glutationa-S-transferase (GST), a qual catalisa a conjugação de glutationa com diferentes xenobióticos, tornando-os mais hidrosolúveis assim, facilitando sua metabolização e excreção. (TEW et al., 1997).

Neste contexto, SUZUKAWA (2012) investigou o potencial modulador do $^1O_2$ dos processos redox celulares de linhagens de melanoma humano que apresentavam diferentes conteúdos de feomelanina. Os níveis celulares totais de glutationa imediatamente após o tratamento não foram alterados, porém após 18 horas observou-se um aumento destes níveis em todas as linhagens. No entanto, isto não foi acompanhado por alterações no nível da glutationa redutase, glutationa peroxidase ou γ-glutamilcisteína ligase. Esse resultado diverge do que seria esperado para um quadro de estresse oxidativo e merece novos estudos para melhor entender essa resposta celular.

O envolvimento da glutationa na resposta contra o $^1O_2$ tem sido sugerido pelos dados presentes na literatura, pois o tratamento prévio de células HepG2 com BSO (butionina sulfoximina), inibidor da biossíntese da glutationa, aumentou a sensibilidade destas células ao $^1O_2$, gerado através da decomposição de endoperóxidos (OTSU et al., 2005). O tratamento prévio de células de melanoma murino B16-F1 com glutationa preveniu a indução de apoptose nestas células após exposição ao $^1O_2$, por fotossensibilização com azul de metileno (CHEN et al., 2008).

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Esta dissertação foi escrita conforme a Norma Interna 12/2013 da Pós Graduação em Ciências – Bioquímica (PGBq) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), a qual prevê no Art. 1º que as dissertações devem ser apresentadas segunda as Normas de Apresentação de Documentos Científicos publicadas pela Editora da UFPR (baseado em documento da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)) ou em formato de artigo científico. O artigo científico apresentado neste trabalho será submetido para a revista *Free Radical Biology & Medicine*, onde a submissão é realizada no formato *Your Paper Your Way*, ou seja, não há uma formatação específica requisitada pelo periódico no momento da submissão.

Title:

Hight melanin content in melanoma cells impairs DNA repair of 8-oxodGuo but not CDP lesions after RBAc-PDT and reduces the activity of antioxidant enzymes

Authors:

Paloma Kalegari[1]; Daniela Morais Leme[2]; Geonildo Rodrigo Disner[2]; Marta Margarete Cestari[2]; Willian Vanderlei Meira[1]; Glaucia Regina Martinez[1*]

[1]Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, SCB, UFPR.

[2]Departamento de Genética, SCB, UFPR.

3.1 ABSTRACT

Melanoma is a neoplasm with increasing incidence, considered the most aggressive among skin cancers. This type of tumor originates in melanocytes, cells that produce melanin, a pigment. Melanin is related to photoprotection against UVB radiation, however, it has been shown that in relation to UVA and visible light, it could promote damage to biomolecules, producing reactive oxygen species (ROS) when irradiated, being singlet oxygen ($^1O_2$) one of these ROS. DNA is a target molecule, being 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) the main oxidation DNA damage generated by $^1O_2$. Moreover, DNA can also be damaged directly by sunlight or by the chemiexcitation of melanin by UVA, generating the photoproduct pyrimidine cyclobutane dimers (CPD) in both cases. DNA damage can also be a result of therapies used to treat this type of cancer, like photodynamic therapy (PDT). Thus, the objective of this study was to investigate DNA damage and repair in melanoma cells with different melanin contents

submitted to photosensitization, as well as to characterize the activity of glutathione reductase and glutathione peroxidase after treatment. For this, B16-F10 melanoma cells were stimulated to produce melanin with L-tyrosine and NH_4Cl for 48 h. After incubation with the photosensitizer Rose Bengal Acetate (RBAc), the cells were irradiated with visible light (526 nm). Cell viability of stimulated cells showed a reduction of almost 60% with RBAc-PDT. DNA damages 8-oxoduo and CPD were also greater in this condition, indicating that the presence of $^1O_2$ and melanin favored their formation. However, 18 h after irradiation, 8-oxodGuo damage increased compared to the initial time, which shows that melanin may be preventing the repair of the lesion and still promoting its post-PDT formation. Differently, CPD damage decreased, probably due to cellular repair. The enzymatic activity of glutathione reductase and glutathione peroxidase decreased in stimulated cells 18h post-PDT relative to controls. Our data indicate that melanoma cells with higher amount of melanin submitted to RBAc-PDT have higher levels of the oxidative lesion 8-oxodGuo and the photoproduct CPD and the permanence of 8-oxodGuo damage indicates that melanin may contribute to tumor genomic instability and the development of resistance.

3.2 INTRODUCTION

The incidence of melanoma is increasing around the world (ERDEI, TORRES, 2010), which represents 4% of cases and 80% of deaths by skin cancer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; INCA, 2016). These tumors are derived from melanocytes, cells located in the basal layer of the epidermis and responsible for the production of the pigment melanin (SLOMINSKI et al., 2004). Melanin is synthesized from the oxidation and polymerization of tyrosine inside specialized organelles, the melanosomes (RILEY, 2003; D'ISCHIA et al., 2015).

This pigment can act as a photoprotective agent against UVB radiation, since it is able to absorb photons (YAMAGUCHI et al., 2007). Other authors have shown that melanin may act as a scavenger of reactive oxygen species (ROS) (TADA et al., 2010; DAVIDS; KLEEMANN, 2011). Interestingly, melanin can also act as photosensitizer. In particular, irradiation of melanin by UVA and visible light can lead to the generation of ROS, such as $^1O_2$ (CHIARELLI-NETO et al., 2014). Different roles of melanin have been shown as described in the review of ELOBEID et al. (2017). Besides melanin antioxidant capacity, it can interact with drugs and metal, being related to pharmacological properties. Melanin could act in the enhancement and modulation of the immune system and this pigment has anti-inflammatory and hepatoprotective effects.

For the investigation of melanin action or the process of melanogenesis in melanoma cells, many studies employ particular conditions to induce the production of

melanin. MEIRA et al., 2016 and CUNHA et al., 2012 stimulated B16-F10 melanoma cells with L-tyrosine and NH_4Cl to evaluate the influence of melanogenesis stimulation in different cellular responses, and observed decreased mitochondrial respiration, cell cycle alterations and increased ROS levels among others effects. KVAM and TYRRELL (1999) found an increase in oxidative lesions on DNA bases in melanoma cells irradiated by UVA, being twice as high in cells that had stimulated melanin synthesis with L-tyrosine. When exposed to visible light, the melanoma cells with sstimulated melanogenesis can also be damaged by melanin photosensitization and $^1O_2$ generation, which lead to DNA photooxidation and cell death (CHIARELLI-NETO et al., 2014).

DNA is a target molecule for ROS, including $^1O_2$, and the main oxidation DNA damage generated by $^1O_2$ is 8-oxo-2'-deoxyguanosine (MARTINEZ et al., 2002; CADET AND WAGNER, 2013). In studies conducted with plasmidial DNA *in vitro,* it was reported that melanin or its precursor, the 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) can induce DNA strand breaks and also can inhibit the activity of the DNA repair enzyme FPG (SUZUKAWA et al., 2012, PELLOSI et al., 2014). The genetic material can also be damaged directly by sunlight which generates the photoproduct pyrimidine cyclobutane dimers (CPD) (SCHUCH et al., 2017). UVB radiation is the most energetic component of solar radiation, being able to generates this photoproduct almost instantaneously (LAZOVICH et al., 2010). Furthermore, when melanocytes are exposed to UVA radiation, CPDs are generated in less than three hours after exposure and it is proposed that the mechanism for their formation have the active role of melanin (PREMI et al., 2015). Likewise oxidative damage, this photoproduct damage can interferes into vital cellular processes, leading to the development of some types of skin cancer (CADET et al., 2012; MECH, 2014).

Therefore, cells have several systems for keepping DNA integrity. The repair of different types of DNA lesions is considered a form of cellular protection. In eukaryotes, the enzymes N-glycosidases MutY and OGG1 are responsible for the repair of 8-oxodGuo (DAVIS et al., 2010). The recognition of CPD lesions is mainly performed by the nucleotide excision repair (NER) pathway (FOUSTERI; MULLENDERS, 2008).

Therapies used to treat cancer, usually involves drugs that promotes the formation of ROS and induces DNA damage. One of these therapies that has been targeted and evaluated for the treatment for several types of skin cancer is the photodynamic therapy (PDT). The mechanism of PDT is based on the use of a

photosensitizer and irradiation at a specific wavelength and through interaction with molecular oxygen, leads to the formation of both radicals (type I mechanism) and $^1O_2$ (type II mechanism) (DAVIDS; KLEEMANN, 2011; KUSHIBIKI et al., 2013). The reactivity of $^1O_2$ towards many different biomolecules may lead to the accumulation of oxidized products and alterations of cellular functions that result in cell death and destruction of tissues (CHOUDHARY et al., 2009).

Many compounds may act as photosensitizers, in particular the dye Rose Bengal (RB), that belongs to the class of water-soluble xanthenes, is commonly used in *in vitro* and *in vivo* studies (PANZARINI et al., 2014). RB is able to convert triplet molecular oxygen to $^1O_2$ by energy transfer from its triplet excited state with high efficience. As the structure of RB is anionic, at low concentrations it can not cross the cell membrane. Thus, the addition of acetate groups into the molecule is necessary to generate the more hydrophobic Rose bengal acetate (RBAc) that insisde cells regenerates the photosensitizer RB (PANZARINI et al., 2011).

One form of cellular protection for melanoma cells against ROS is the antioxidant system, preventing or removing oxidative damage (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). The enzymes related to glutathione, a tripeptide present in the cellular environment, are considered important for the evaluation of cellular redox status (MITTLER, 2002; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Based on early studies about the relevance of $^1O_2$ in the etiology and treatment of melanoma associated to DNA damage/repair and redox processes and the photosensitizing role of melanin, the understanding of the mechanisms of cellular adaptive responses are essential to provide new alternatives for protection and therapy. In this study, we investigated DNA damage and repair in melanoma cells with different amounts of melanin submitted to photosensitization (RBAc-PDT), as well as the enzymatic activity of glutathione peroxidase and reductase.

3.3 MATERIALS AND METHODS

3.3.1 Chemical and Reagents

B16-F10 cell line was obtained from Dr. Roger Chammas (Medicine School of São Paulo University, Brazil). RPMI 1640 medium was purchased from Cultilab

(Campinas, SP, Brazil). Fetal Bovine Serum (FBS) was from Gibco (Paisley, UK). L-Tyrosine, sodium bicarbonate, ammonium chloride (NH_4Cl), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), HEPES, 3-methyl [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), crystal violet, Bradford, bovine serum albumin (BSA), sodium hydroxide, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), reduced glutathione (GSH) , oxidized glutathione (GSSG) and DMSO were purchased from Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA). The photosensitizer Rosa Bengal Acetate (RBAc) was synthesized by Dra. Andreia Akemi Suzukawa (Federal University of Paraná). DNA glycosylase (hOGG1) and endonuclease V (T4) enzymes were purchased from New England Biolabs (Acton, MA). The agarose was from Agargen Molecular Biology (Brazil) and the PlusOne ethidium bromide solution was from GE Healthcare–Amersham Biosciences (UK).

3.3.2 Equipments

Ultrapure water was obtained using a GEHAKA System (São Paulo, Brazil).The microplate reader used was Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). The fluorescence microscope used was Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE), equipped with Metafer 4/VSlide automated capture software (Metasystems, Altlussheim, DE) and model of the Camera: CoolCube 1 – Metasystems.

3.3.3 Cell culture

Murine metastatic melanoma (B16-F10 cell line) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 7.5% (v/v) FBS and addition of 0.8 mM sodium bicarbonate, 20 mM HEPES (pH 7.4) and 40 µg/mL gentamicin at 37°C, 7.5% CO_2 in a humidified atmosphere (CUNHA et al., 2012).

3.3.4 Melanogenesis stimulus

The stimulation of melanin synthesis in culture was performed by treatment of cells with RPMI 1640 culture medium supplemented with L-tyrosine and NH_4Cl at concentrations of 400 µmol/L and 10 mmol/L, respectively, during 48 hours

(KONGSHOJ et al., 2007). The controls were treated with RPMI 1640 medium without supplementation.

According to CUNHA et al. (2012), stimulated cells have lower proliferation rates, then after 48 h, we have approximately 30% less viable cells than the control condition. Thus, once we need to sensitize cells using the same cell density, for all the experiments of the present work, cells that would be submitted to the stimulus conditions were seeded with an increment of 25% in relation to the wells or plates of the control condition. Using this protocol, both conditions (stimulated or not) have approximately the same confluence at the moment of irradiation.

3.3.5 Photosensitization (PDT)

B16-F10 cells were irradiated using visible green light, with light-emitting diode (LED) lamps at 526±20 nm (Cromatek;Cromax Eletrônica LTDA, São Paulo, Brazil) for a total dose of 1.5 J/cm^2, as described by SUZUKAWA et al. (2012). In order to generate $^1O_2$ by photosensitization, before irradiation, cells were incubated with RBAc. The acetate group acts as a quencher, thus inactivating both fluorescence and photosensitization properties of the molecule. This group is recognized by intracellular esterases, which results in restoring the native structure of photosensitizer RB inside the cells (BOTTIROLI et al., 1997). The photosensitized RB generates $^1O_2$ via Type-II photodynamic mechanism (SRIVASTAV et al., 2016).

The B16-F10 cells were seeded in the specific plates for each test and incubated for 24 hours for adhesion at 37 °C and 5% CO_2. Subsequently, the melanogenesis was stimulated as described above during 48 h. After this period, the cells were incubated with RBAc (10 µg / ml) for 2 h. Then the medium was exchanged for HBSS and the cells were irradiated for 15 minutes. To perform the analyses immediately after the end of the treatment (0h), the HBSS was removed. For assays performed 18 hours after the end of irradiation, the HBSS was replaced by appropriate culture medium (with or without L-Tyrosine+NH_4Cl) and the cells were maintained in a 37°C incubator at a moist atmosphere of 5% CO_2 in the dark. The respective controls of the photosensibitization underwent the same process; however, they were kept all the time in the dark.

Thus, for the better understanding of the control groups and the groups submitted to the treatments, all methods described below were performed for all the groups presented in the following table.

TABLE 1 - TREATMENTS OF DIFFERENT GROUPS OF B16-F10 CELLS

Conditions / Groups	RPMI 1640	RPMI 1640 (L-tyrosine and NH_4Cl)	No photosensitizer	Photosensitizer (RBAc)
Control	x		x	
Control RBAc	x			x
M++		x	x	
M++ RBAc		x		x

Note: The B16-F10 cells were subjected to different conditions. The RPMI medium was used as a negative control of the cells that were stimulated with the same medium supplemented with L-tyrosine and NH_4Cl. The cells that were incubated without RBAc were used as a negative control of photosensitization.

All of these conditions were performed in the dark, called “dark condition”, and in irradiated with LED lamps, called “light condition”.

3.3.6 Quantification of melanin

The determination of melanin content was performed according to MEIRA et al. (2016). Cells were seeded at $5x10^5$ cells/plate in 60 mm plates and they were allowed to attach for 24 h. After estimulation of melanogenesis and irradiation, the medium was removed and the cells were suspended in PBS-EDTA 2 mM and sonicated at 20 Hz for 30 s. An aliquot of this suspension was used to measure protein levels by the method of Bradford (BRADFORD, 1976). The suspension was centrifuged at 100 g for 5 min at 4 °C and the pellet was suspended in sodium hydroxide (NaOH) 1 M and lysed by sonication at 20 Hz for 30 s. The samples were subjected to shaking "overnight" at 37 °C. The amount of melanin was measured at the absorbance of 470 nm and was expressed in µg melanin/mg protein.

3.3.7 Cell viability and proliferation assays

Cell viability was measured by MTT (3-methyl [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. (COLLIER; PRITSOS, 2003). The B16-F10 melanoma cells (5×10^3 cells/well) were seeded in 96-well plates and incubated for 24 h for adhesion at 37 °C and 5% CO_2. Following, cells were stimulated for melanogenesis and irradiated as previously described. After, cells were incubated with MTT solution (500 µg/mL in HBSS) for 3 h at 37 °C and 5% CO_2. Then, the unreacted MTT was removed and the formazan crystals were solubilized in DMSO followed by absorbance reading at 550 nm. The results are expressed as a percentage of the cellular viability in relation to the control (B16-F10 cells in the dark without the presence of photosensitizer).

Another method used to evaluate cell viability and proliferation was crystal violet staining, as described by CUNHA et al. (2012). This method is based on the principle of staining nucleic acids of adhered and fixed cells. Cells were seeded, stimulated and irradiated as in MTT assay. The cells were washed with PBS (100 µL per well) twice then fixed with methanol (100%) for 10 minutes. After this, the crystal violet solution 0.2% diluted in 2% ethanol was added over 3 minutes. After this time the dye was removed and successive washings with PBS were performed for removal dye excess. Then the remained dye was eluted using crystal violet destaining solution (0.05 mol/L sodium citrate solution in 50% etanol) and the absorbance was determined in a microplate reader at 540 nm. The results are expressed as a percentage of the cellular viability in relation to the control (B16-F10 cells in the dark without the presence of photosensitizer).

3.3.8 DNA damages

DNA damages were assessed using different versions of the Comet assay, as follow: alkaline version (TICE et al., 2000; LEME et al., 2014), hOGG1-modified alkaline version (manufacturer's protocol - New England Biolabs) and T4-modified alkaline version. The enzyme hOOG1 is responsible for the recognition of 8-oxodGuo (DAVIS et al., 2010). For CPDs, the enzyme endonuclease T4 recognizes the damage and inserts the 5' end of the glycosidic linkage into the pyrimidine dimers (CAFARDI; ELMETS, 2008).

B16-F10 cells (2×10^4 cells/well, 24-well plate), stimulated or not for melanogenesis and irradiated or not, were harvested and the pellet obtained was carefully resuspended in low melting point agarose (0.5%-w/v in PBS). The cell suspension was then spread on 1.5% agarose-coated slides, which, after solidification on ice, were immersed in a freshly prepared lysis solution (2.5 M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 10; 1% Triton X-100 and 10% DMSO) for 2 h. The slides were then transferred to a horizontal electrophoresis tank previously filled with electrophoresis buffer (200 mM EDTA; 10 M NaOH; pH ≥ 13) for 30 min of DNA unwinding. Electrophoresis was carried out in the same buffer for 20 min at 1 V/cm and 300 mA and 4°C. The slides were then neutralized with 4.85% Tris-HCl buffer (pH 7.5) for 20 min and dehydrated in 100% ethanol.

With respect to hOGG1- and T4-modified alkaline versions, an additional step was carried out previously to electrophoresis. After lysis, comet slides were washed (3 x 5 min) with enzyme buffer (hOGG1: 40 mM HEPES, 0.1M KCl, 0.5 Mm EDTA, 0.2 mg/mL BSA, pH 8; T4: 25 mM Na_2HPO_4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM DTT, 100 µg/mL BSA, pH 7,2) and then they were incubated with hOGG1 (0.08 U/slide) or T4 (4 U/slide) for 30 min at 37°C, in a moistened chamber. The slides were then rinsed with distilled water and placed into electrophoresis chamber for DNA unwiding and electrophoresis as above described.

As positive controls for alkaline-, hOGG1- and T4-modified versions the following conditions were employed, respectively: methyl methanesulfonate (MMS, CAS no. 66-27-3, Sigma- Aldrich) at 1 mM (3 h exposure); hydrogen peroxide (H_2O_2) at 50 µM (on the slide for 10 minutes) and cells stimulated for melanogenesis and irradiated with 0,1 J/cm^2 with a UVB (280-315 nm) lamp 40 W; Taschibra-Brasilux Ind Comercio Importação e Exportação Ltda, Indaial-SC/Brazil, for 2 minutes (MOURET et al., 2006).

The slides were stained with ethidium bromide solution (20 µg/mL, Sigma-Aldrich) and examined under a fluorescence microscope. DNA lesions were quantified as DNA tail intensity (Kumaravel et al., 2009) using the computer-based image analysis Metafer CometScan v.2.8.0® (Metasystems, Germany) on 100 randomly selected cells.

3.3.9 Antioxidant activity enzymes

For the measurement of antioxidant activity of the enzymes the B16-F10 melanoma cells were seeded at $5x10^5$ cells/plate in 60 mm plates. Thereafter the estimulation of melanogenesis and irradiation, the medium was removed and the cells were suspended in PBS and sonicated at 20 Hz for 30 s. Then they were centrifuged and the supernatant was used to carry out the following analyzes. All experiments to evaluate the activity of the antioxidant enzymes were monitored in Epoch Microplate Spectrophotometer.

3.3.9.1 Activity of Glutathione peroxidase (GPx)

The activity of GPx was mesuared according FLOHÉ; GUNZLER; 1984.In this assay GPx catalyzed the oxidation of GSH to GSSG. The oxidation rate of NADPH is proportional to the rate of production of GSSG from GSH, in the presence of hydrogen peroxide, catalyzed by GPx. The reaction system consisted of 0,1 M sodium phosphate buffer (pH 7), 2mM GSH, 0.2mM NADPH, 0.2 U Gred purified and 0.5 mM hydrogen peroxide. The reaction was started by the addition of hydrogen peroxide and monitored for 3 minute at 340 nm. The results were normalized from the amount of proteins (mg/mL), considering the molar extinction coefficient of NADPH (6220 $mol^{-1}.L.cm^{-1}$).

3.3.9.2 Activity of Glutathione reductase (GRed)

The activity of GRed was evaluated spectrophotometrically (SIES et al., 1979). This enzyme catalyzes the reduction of glutathione disulphide (GSSG) through the oxidation of NADPH. The reaction system consisted of 0,1 mM phosphate buffer (pH 7.0), 1 mM EDTA, 0.66 mM GSSG, 0.075 mM NADPH and 50 µg B16-F10 cell extract. The reaction was started by the addition of GSSG and monitored for 10 minutes at 340 nm. The results were normalized from the amount of proteins (mg/mL), considering the molar extinction coefficient of NADPH (6220 $mol^{-1}.L.cm^{-1}$).

3.3.10 Statistical analysis

The data were analyzed with the Prisma software, using ANOVA followed Dunnett test or by Tukey's test.The groups described in the table 1 were compared to

each other, using Tukey multiple comparations test. Significance levels are indicated in the legends.

3.4 RESULTS AND DISCUSSION

B16-F10 melanoma cells were stimulated to produce more melanin in order to analyze how this pigment could affect the subsequent treatment by photosensitization and what would be the consequences for treated cells.

3.4.1 Cell viability

Using MTT assay, the viability of B16-F10 melanoma cells with different amounts of melanin and subjected to photosensitization was evaluated. The results (Fig. 1A) showed that viability of the cells which were stimulated (M++) and irradiated after incubation with RBAc decreased by 55% when it was analysed immediately (0 h) after irradiation compared to cells in the dark that were not incubated with photosensitizer (control - dark condition). Cells were analyzed 18 hours post-irradiation (Fig. 1B), a time considered for the evaluation of cellular recovery or even verification of cell death, based on the study of SUZUKAWA (2012) showed that cell viability of the group M++ where cells were irradiated after incubation with RBAc was reduced by approximately 60%. The crystal violet staining showed a significant decrease of 48% and 40% in cell viability for the comparison of the same groups, at the time of 0 h and 18 h, respectively (Fig. 1C and 1D).

By comparing to the control group in the light condition for 0 h and 18 h, both methods of evaluating cell viability presented a statistically significant decrease in the cells stimulated and photosensitized with the RBAc (M++ RBAc – light condition). Additionaly, our study has shown that immediately after irradiation (0 h) when cell pigmentation is increased and incubated with RBAc and irradiated (M++ RBAc – light condition), a decrease in cell viability is verified compared to cells that were not stimulated to produce melanin (Control RBAc – light condition); this fact could be observed in Fig. 1A. These results corroborate with CHIARELLI-NETO et al. (2014) that using B16-F10 cells non-pigmented and pigmented (stimulated with 0.5 mM Tyr and 10 mM NH_4Cl), treated with visible light, observed a decrease in cell viability of cells more pigmented. It clearly demonstrates that the presence of melanin increases visible light phototoxicity.

Also, when melanin is present the cytotoxicity of RBAc in melanoma cells is pronounced (Comparison between the M ++ and M ++ RBAc groups in the light condition), possibly due to photosensitization of melanin (Fig. 1A and 1C). Similar behavior is observed after 18 hours, where Fig. 1D shows that there was a 15% reduction in the cell viability of the M++ RBAc group compared to M++ Control group in light condition.

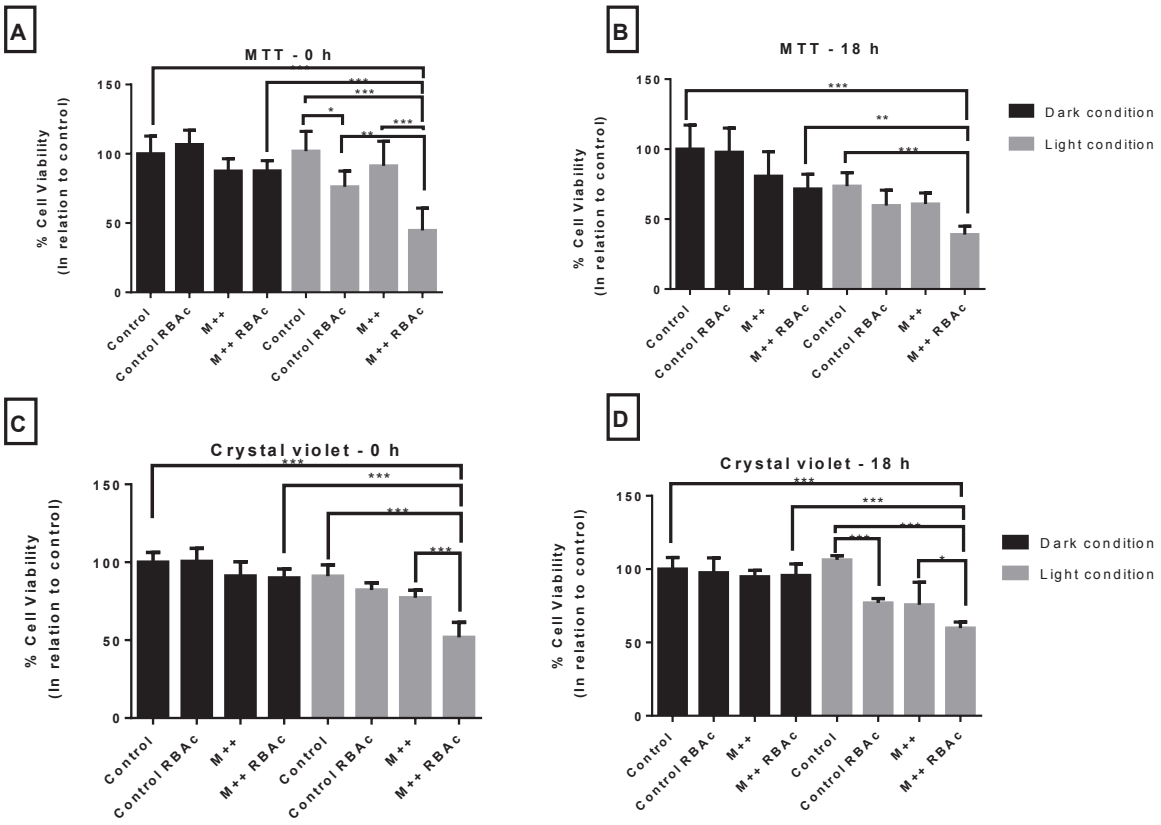


FIGURE 1 – B16-F10 CELL VIABILITY MEASURED BY MTT AND CRYSTAL VIOLET

NOTE: B16-F10 cells were plated ($5x10^3$ cells in the control condition and $6.25x10^3$ cells in the stimulus condition) and incubated for adhesion at 37°C and 2.5% CO_2 for 24 h. Subsequently, melanogenesis was stimulated for 48 h using 0.4 mM L-Tyrosine and 10 mM NH_4Cl and the photosensitization was performed as described in item 3.2.3. The cell viability was determined by MTT method at time 0 h (A) and 18 h (B) after treatment. (C) Cell viability and proliferation was determined by crystal violet staining at time 0h and 18 h (D) after treatment. Data are shown as the means±SD of three independent experiments in triplicate. Asterisk indicates significant at ***p≤0.0001, **p≤0.001 and *p≤0.05.

According to PANZARINI et al. (2011), the RBAc crosses the plasma membrane and cytoplasmic estareases remove acetate groups and restore photoactive RB

molecules, producing ROS when excited by visible light. When HeLa cells were irradiated with a visible green light at 530 ± 15 nm (Total dose 1.6 J/cm^2), the celll death occured by apoptosis and autophagy in a time-related manner (PANZARINI et al., 2014). GENEZ (2015) observed to B16-F10 and Melan-a cells autophagic death post-PDT (after incubation with RBAc (0.5, 2.0, 5.0 μg.mL^{-1}) and irradiation with green LED lights with 1.5 J/cm^2 as the total light dose).

The PDT could induce cleavage of Golgi proteins, which may promote apoptotic signaling as well as the organelle fragmentation (SOLDANI et al.; 2004). BACELLAR et al. (2015) defined that the cell death mechanism by photosensitization with Rose Bengal are necrossis, apoptosis and autophagy. These different types could be associated with the amount of reactive species that are generated and possible targets of photooxidation.

From the comparison of all the groups of B16-F10 cells (Table 1), it was possible to observe that cell viability measured by the MTT method and by the crystal violet staining showed a statistically significant difference between the group M++ RBAc in the dark condition and in the light condition for the 0 h and 18 h, which demonstrate that the irradiation of cells at 526±20 nm is phototoxic for these cells. In the presence of sufficient visible light, melanin will stimulate the generation of $^1O_2$ (BELTRÁN-GARCÍA et al., 2014). Moreover, the presence of the photosensitizer favors the generation of reactive oxygen species (EROS), from the oxygen molecule (O_2). When the photosensitizer is activated by light at a specific wavelength, it absorbs energy and moves into a more excited state, called triplet state. It can transfer its electron to the organic substrate, leading to the formation of radicals that, after interaction with O_2, lead to EROS generation. However, in this same state of energy, the energy can be transferred directly to O_2 dissolved in the solution, generating $^1O_2$ (DAI et al., 2012; KUSHIBIKI et al., 2013). Furthermore, a study by ALLEN et al. (1991) compared the generation of reactive species formed at different excitation wavelengths in the UV region (313 nm) and in the visible (514 nm) region. Only when the RB dye was irradiated by light at 313 nm, the generation of other reactive species, besides $^1O_2$, was detected. And irradiation above 514 nm, leads to the exclusive generation of $^1O_2$ (Allen et al., 1991). In this way, the species formed can contribute to the loss of cellular viability. In fact, SUZUKAWA et al. (2012) observed that cells of human melanoma lines WM9, WM35 and 1205Lu showed no reduction in cell viability when treated with Rose Bengal Acetate alone at concentrations up to 50 μM in the absence of irradiation,

while under irradiation at 526 nm there was a significant reduction in cell viability of these cell lines. GENEZ, 2015 showed a 14% of reduction of viability of B16-F10 cells when were treated with RBAc 5.0 $\mu g.mL^{-1}$ immediately after irradiation. After 18 hours, loss of viability increased to 40% when compared with the cells without photosensitizer in the dark.

The photosensitizing actvity of RB in inducing melanoma cell death is oxygen dependent. According to the study of SRIVASTAV et al. (2016), this dye is also a strong photogenotoxic agent under natural sunlight exposure, mainly by the generation of $^1O_2$, which triggers DNA damages and apoptotic cell death. Thus, reduction of cell viability, as observed herein (Fig. 1), could be related to damages caused to biomolecules by $^1O_2$, which can disrupt essential mechanisms of cellular activities. In fact, $^1O_2$ is one of the most reactive and toxic forms among the ROS, being able to oxidize a several types of biomolecules, such as proteins, lipids and DNA (DI MASCIO et al.1994; RAVANAT, J. L. et al., 2001; PERES et al., 2015).

3.4.2 DNA damages

SUZUKAWA et al., 2012, by using plasmid DNA *in vitro*, showed that both types of melanin (eumelanin and pheomelanin) may lead to DNA breakage independently of irradiation. The authors also showed that the interaction of melanins with DNA can impair the access of repair enzymes to lesions, contributing to the perpetuation of DNA damage. Then, in the present work, we investigated whether the melanin content can both worse the oxidative DNA damage caused by $^1O_2$ and disturb the DNA repair systems in melanoma cells.

Comet assays (both alkaline and alkaline associated to repair enzymes) were employed in order to analyze DNA damage levels induced by the treatments that B16-F10 cells were subjected (Table 1). In the repair enzyme modified-alkaline version, in addition to evaluate the level of DNA breakage, it is also possible to estimate the occurrence of modified bases that do not generate spontaneous breaks by the use of repair enzymes. In this study, we used the treatment with the enzyme hOGG1 and the enzyme T4 (endonuclease V), which specifically recognizes 8-oxodGuo and CPD lesions, respectively.

Results of the efficiency of comet assays are presented as supplementary material (S1), where the positive controls of this type of assay are compared with the negative control group of B16-F10 cells (Control dark condition).

For the alkaline version (Fig. 2), all groups of B16-F10 cells (Table 1) in 0 h and 18 h did not show statistical differences when compared to each other. The single group that presented a statistically significant in the amount of tail intensity value was the positive control group of the comet assay (MMS).

Treatment with $^1O_2$ (Control RBAc) did not induce a significant increase of DNA strand break damages in the alkaline comet assay. Such fact was expected, since this version of the Comet assay is not able to detected oxidized bases (8-oxodGuo), which is the genotoxic lesion formed by $^1O_2$. It is possible to observe that high amounts of melanin alone (M++) and in association with $^1O_2$ (M++ RBAc) do not produce direct damage such as single-stranded DNA breaks and alkaline labile sites as can be observed in the alkaline version (Fig. 2).

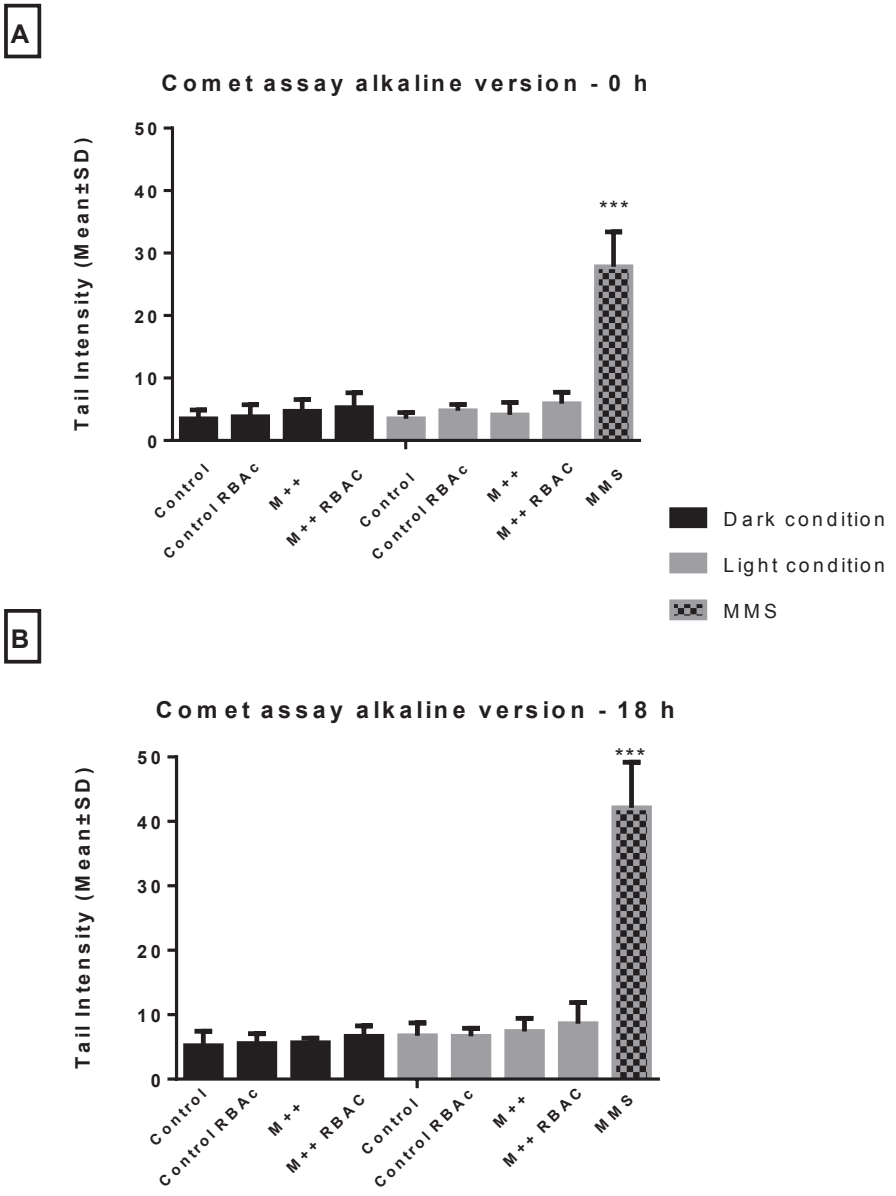


FIGURE 2- LEVELS OF DNA DAMAGES QUANTIFIED BY THE ALKALINE VERSION OF THE COMET ASSAY.

Note: The x-axis shows the condition of B16-F10 cells. The y-axis shows the mean ± SD of DNA damages measured through Tail Intensity parameter. One hundred cells per treatment were analyzed in each experiment and three independent experiment were carried out. MMS at 1 mM was used as positive control. Asterisk indicates significant at $p<0.0001$.

The analyses of hOGG1-modified alkaline version showed that the group where the cells were stimulated for melanogenesis and photosensitized (M++ RBAc light condition) presented an increase immediately after irradiation (Fig. 3A). The

comparison between M++ RBAc group in dark and light conditions shows that the tail intensity is approximately 17 units higher immediately after irradiation and 24 units higher after 18 hours (Fig.3B). After 18h of irradiation, the stimulated cells (M++) exhibited 7 units higher than the group M++ kept in the dark condition.

The results of hOGG1-modified alkaline version have shown an increase in DNA damage for the group of cells with high melanin content and photosensitized (M++RBAc light condition) for both times (0 h and 18 h) (Fig. 3). These results indicate that the $^1O_2$ generated by the photosensitization would be oxidizing the cellular DNA and generating the 8-oxodGuo lesion. The comparison between the same groups in the dark condition shows that the photosensitizer RB was being exicited when in the presence of light, since the oxidative damages in the presence of light are statistically higher than the oxidative damages generated in the dark. This result is in agreement with previous reported in the literature, since the main lesion generated by exposure of the DNA to $^1O_2$ is 8-oxodGuo (RAVANAT, J.-L. et al., 2001;SAUVAIGO et al., 2002). The mutations caused by 8-oxodGuo can be related with the decrease of cell viability observed in the same groups for both times analysed (Fig. 1). Since it is well known that DNA damage can induce genotoxicity and/or cytotoxicity in cells depending on the nature of the lesions (SILVA et al., 2012).

However, when the levels of tail intensity of the group M++RBAc in the light condition are compared immediately after irradiation and at 18 hours (Fig. 3A and 3B), it is observed that the tail intensity after 18 hours of irradiation is 10 units higher. These results supports the ideia that because there is more melanin, the hOOG1 repair enzymes might not be acting efficiently. In fact, SUZUKAWA et al. (2012) by using synthetic melanin and plasmid DNA found that melanins bind to the minor grooves of the DNA, guaranteeing close proximity to DNA and potentially causing the observed high levels of strand breaks. Moreover, in this study was also verified that that the interaction of melanins with DNA can impair the access of repair enzymes to lesions, which could contributed to the perpetuation of DNA damage. The data in the Figure 3 also show that at 18 hours, B16-F10 cells that were not treated with RBAc but were stimulated for melanogenesis are statistically different when they are in dark condition and in the light condition. This result could also be explained by the higher amount of melanin, which may be preventing the action of the repair enzyme. The deficiency of repair may be related to increased genomic instability, which contributes to the resistance of cancer therapies, such as photodiamic therapy (PDT).

Relating the phototoxicity of melanin when irradiated with visible light with the generation of $^1O_2$, our results are in accordance to CHIARELLI-NETO et al., 2014, in this study, they quantified the amount of $^1O_2$ generated in the cells B16-F10 by measuring the near infrared emission spectrum after excitation with visible light. The pigmented cells corresponded to the highest generation of this species. Also, they reported an increase in the level of DNA strand breaks in B16-F10 cells stimulated for melanogenesis and irradiated with 6 J/cm^2 of visible light, which were absent in the controls. These results show that melanin photosensitization by visible irradiation induces direct oxidative damage to nuclear DNA.

In our assays, the use of RBAc induces a higher generation of $^1O_2$ compared to the photosensisilization of melanin, which resulted in higher levels of lesions oxidative. Using other two different types of photosensitizer (porphyrins), BALDEA et al., 2016b investigated several mechanisms underlining the PDT anti-melanoma effects on a lightly pigmented melanoma cell line (WM35). Both porphyrins were effective photosensitizers for PDT, capable of inducing persistent DNA oxidative damage in the melanoma cells. The porphyrin was also used as a photosensitizer by WOODS et al., 2004.The study evalueted its effects on DNA strand breaks and base oxidation in HaCaT keratinocytes. The cells were treated with different doses of irradiation (the maximum dose was 25 J/cm^2) and then evaluated by comet assay with FPG the tail intensity. It was observed that the higher the irradiation dose in the cells, the higher was the DNA damage.

In this way, we can suggest that high amounts of melanin alone can lead to induction of oxidative damage in DNA, due to the generation of ROS associated with deficiencies as demonstrated in the repair of oxidative DNA damage (Fig. 3B). The genotoxic action of melanin is potentiated by interaction with $^1O_2$ (after photosensitized). The damage were higher under the conditions in which melanogenesis was stimulated, showing also that there is more severe interference in the repair systems. DNA damage and lack of efficiency in its repairs are related to genomic instability, a characteristic that may contribute to the resistance of melanoma cells in different therapies.

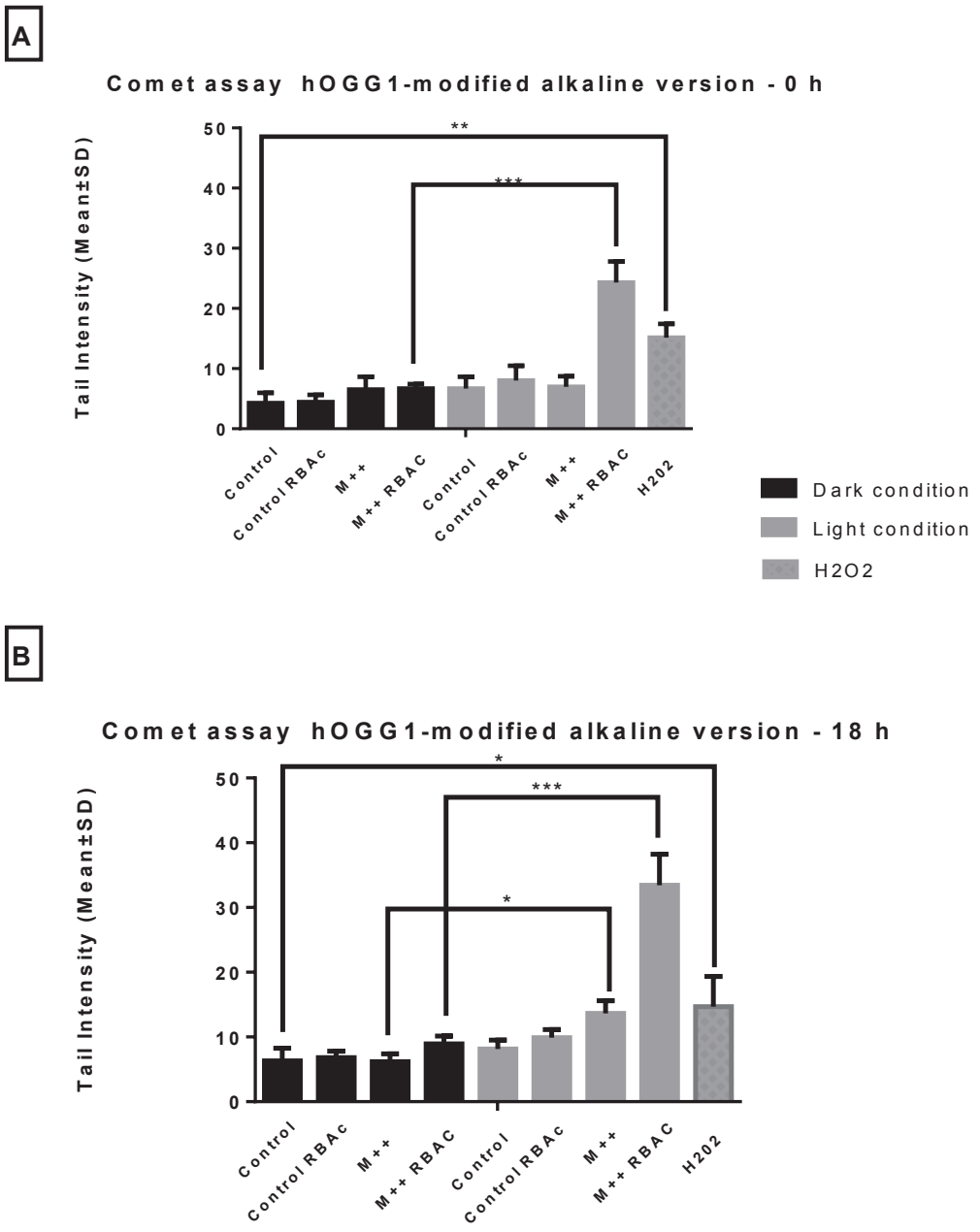


FIGURE 3 - LEVELS OF DNA DAMAGES QUANTIFIED BY THE HOGG1-MODIFIED ALKALINE VERSION OF THE COMET ASSAY

Note: The x-axis shows the condition of B16-F10 cells. The y-axis shows the mean ± SD of DNA damages measured through Tail Intensity parameter. One hundred cells per treatment were analyzed in each experiment and three independent experiment were carried out. H_2O_2 at 50 μM was used as positive control. Asterisk indicates significant at $p<0.05$ (*) or $p<0.0001$ (***).

Considering that PREMI et al. (2015) showed CPD formation after irradiation of melanocytes, in our study, we proposed to evaluate the formation of CPDs in the pigmented or non-pigmented B16-F10 melanoma cells submitted to photosensitization with RBAc and irradiation in visible light. As a positive control of this assay, the cells B16-F10 was irradiated with a dose of 0,1 J/cm^2 UVB light, as used by MOURET et al. (2006). In this study, they showed that the formation of cyclobutane pyrimidine dimers, a typical UVB induced DNA damage, was linear with respect to the UVB dose applied.

The T4-modified alkaline version of comet assay showed that for the analyses performed at 0 h (Fig. 4A), the group of melanoma cells M++ irradiated has the tail intensity 10 units highter when compared to both groups Control and Control RBAc in the light condition. Furthermore, immediately after irradiation, the group M++ RBAc exhibited 13 units higher than the group M++. After 18 hours, this group continued to present the highest values of tail intensity in relation to the other groups, being about 13 units higher than the groups: M++ RBAc (dark condition), Control (light condition) and Control RBAc (light condition). The comparison between the cells that were stimulated and photosensitized (M++ RBAc light condition) at 0 h and 18 h show a decrease in tail intensity in approximately 15 units, but are still above the levels of control.

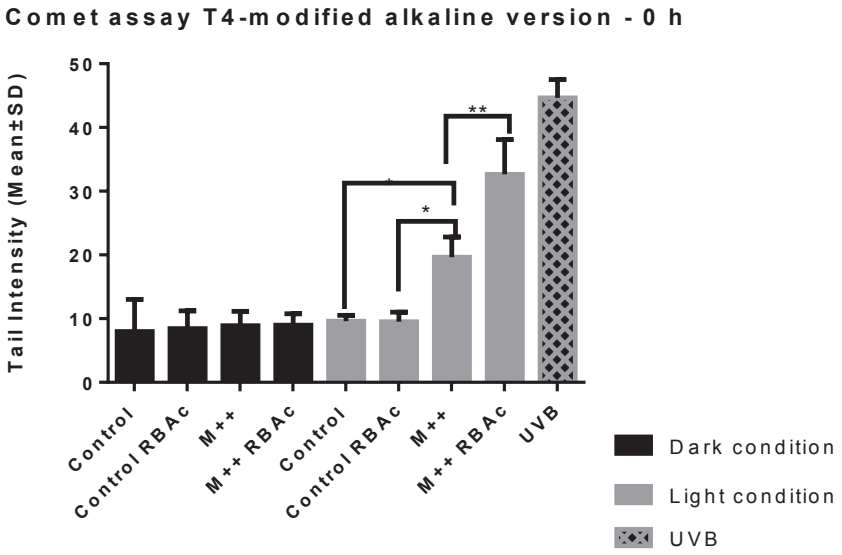
The results of T4-modified alkaline version showed that the non-irradiated cells did not induce significant levels of DNA damage. This fact suggests that the higher melanin content of the groups M++ and M++RBAc did not interfere in the amount of CPD-type damage at the dark condition, instead of irradiated cells, which were able to induce CPD at significant manner. The cells stimulated for melanogenesis showed values of Tail Intensity 10% higher than the control groups. These results corroborate with PREMI et al. (2015) that using murine melanocytes and albino melanocytes, showed that CPD are able to generate this lesions for at least 3 hours after UVA exposure in the cells with melanin, what did not happen in the cells without the pigment (albino melanocytes). Moreover, the cells stimulated and treated with RBAc at the light condition (M++RBAc) showed a 13% increase in levels of DNA damages compared to the non-photosensitized group. Thus, we could suggest that $^1O_2$ or excited Rose Bengal would contribute to the excitation of melanin, which would continue to be active in the formation of pyrimidine dimer type damage. Melanin and its precursors are examples of chromophores with strong absorption in the UVA and blue visible region (SCHUCH et al., 2017). Thus, the photoexcited state intermediate, most often the

triplet state of the sensitizer, can directly interact with substrate molecules, in this case melanin.

For the 18 hours after irradiation-groups, we observed that the levels of DNA damage decreased for all groups when compared with the levels immediately after irradiation. These results show that the repair of CPD was not impared by melanin. However, for the group of cells with the highest amount of melanin submitted to photosensitization, higher tail intensity persists, around 12 units higher when compared with the group under the same conditions but in the dark condition. Maybe, analysis in a longer period of time would show a complet restauration of the levels of damage.

Melanoma cells exhibited a different behavior in relation to the two types of DNA damage evaluated in this study. For analyzes immediately after irradiation, both damages were greater in cells stimulated for melanogenesis and photosensitized (M++RBAc light condition), indicating that the presence of singlet oxygen and melanin favored both the formation of oxidative damage and the formation of dimers. However, after 18 hours, the repair of 8-oxodGuo was not efficient, as the levels of damage increased. Melanin could be contributing to this, since it can prevent access of the enzyme. The inefficacy of this repair may contribute to genomic instability, a factor related to cancer resistance to different types of therapies. The repair of CPD lesions after 18 hours was evidenced, not occurring until the basal levels of damages, perhaps due to the considered evaluation time. Hence, this type of DNA damage may be contributing less to genomic instability.

A



B

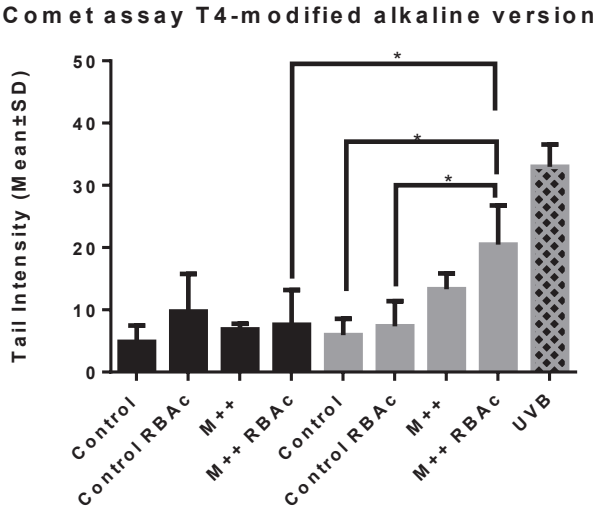


FIGURE 4 - LEVELS OF DNA DAMAGES QUANTIFIED BY THE T4-MODIFIED ALKALINE VERSION OF THE COMET ASSAY.

Note: The x-axis shows the condition of B16-F10 cells. The y-axis shows the mean ± SD of DNA damages measured through Tail Intensity parameter. One hundred cells per treatment were analyzed in each experiment and three independent experiment were carried out. Cells exposed to UVB at 0.1 J/cm^2 were used as positive control. Asterisk indicates significant at $p<0.05$ (*) or $p<0.0001$ (***).

3.4.3 Melanin dosage

Considering that our focus is related to the amount of melanin inside the cells, it became important to check if photosensitization could alter this parameter. Some studies have shown that when B16 –F10 cells are treated with culture medium supplemented with L- tyrosine and NH_4Cl there is a significant increase in melanin content over control cells (CUNHA et al., 2012). MEIRA et al. (2016) observed that B16-F10 melanoma cells when incubated with 0.4 mM L-Tyrosine and 10 mM NH_4Cl, after 24 h and 48 h showed a significant increase of the melanin content. Once the stimulus of melanogenisis leads to an increase of melanin synthesis, our study investigated if this great content of melanin undergoes alteration when the cells are irradiated.

To verify the amounts of melanin in the B16-F10 melanoma cells, the melanin dosage test was performed (Fig. 5). Melanin levels for the groups in which the cells were stimulated for melanogenesis have values between 1500 and 2000 µg of melanin/mg protein. For the group of cells evaluated immediately after irradiation, it is possible to observe that the amount of melanin of M ++ group and M ++ group RBAc did not present statistical differences, in both dark and light conditions. The same can be observed for the groups of cells evaluated 18 hours after irradiation. In this way it is possible to verify that the photosensitization of cells stimulated for melanogenesis did not affect the amount of melanin present in both times (0 h and 18 h). This fact may suggest that melanin would not be considerably degraded with the presence of singlet oxygen generated by PDT-RBAc.

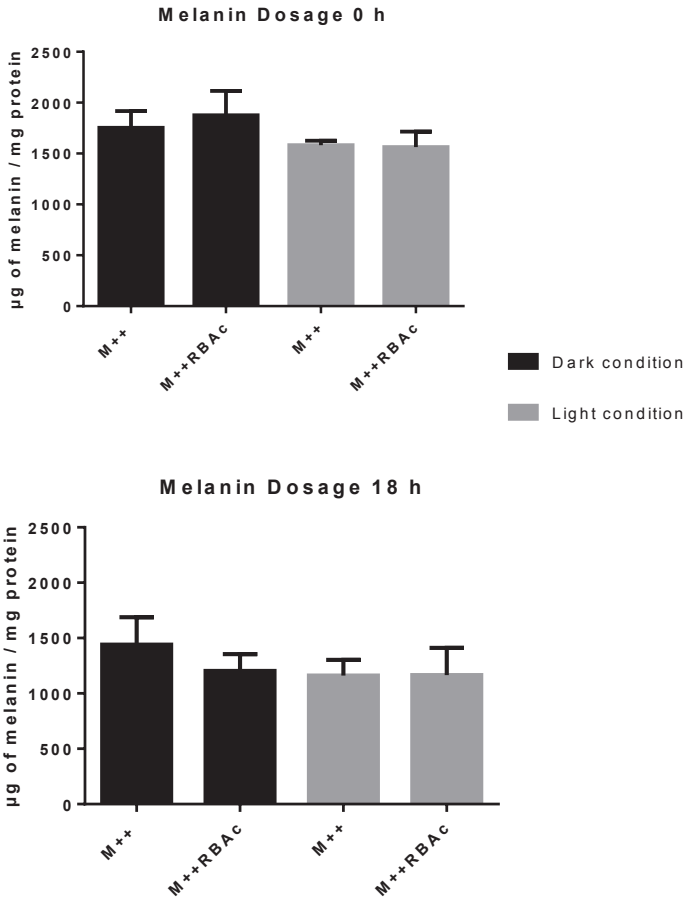


FIGURE 5 - MELANIN DOSAGE OF B16-F10 CELLS STIMULATED FOR MELANOGENESIS

NOTE: B16-F10 cells were plated ($1x10^4$ cells and $1.25x10^4$ cells for Control and M++, respectively) and incubated for adhesion at 37°C and 2.5% CO_2 for 24 h. Subsequently, melanogenesis was stimulated for 48 h using 0.4 mM L-Tyrosine and 10 mM NH_4Cl and the cells were subjected to photosensitization with Rose Bengal and visible light. The amount of melanin is expressed in µg melanin/mg protein. The values represent the mean±SD of three independent experiments in triplicate.

The treatment of B16-F10 melanoma cells with 0.4 mM L-tyrosine and 10 mM NH_4Cl creates an optimal environment to the activity of enzyme tyrosinase. The L-tyrosine is added as a substrate for melanin synthesis and the ammonium chloride (NH_4Cl) is used to increases melanossomal pH and promotes melanosomal maturation which neutralizes the melanossomes, an intracellular acidic organelle (KONGSHOJ et al., 2007).

Differently to UV light, which is known to cause damage in melanin, the effect of visible irradiation has not been carefully investigated. Melanin is a chromophore that absorbs electromagnetic radiation in UV and visible light (D'ISCHIA et al., 2015). This

pigment is considered protector because of this characteristic, as well as its ability to scanvenge radicals. However, the synthesis of this pigment involves production of some ROS, due the redox-cycling of the ortho-dihydroxy compounds (SMIT et al., 2008). Besides that, melanin can act as photosensitizer under UV radiation or exposed to visible light, therefore generating ROS (ZAIDI et al., 2008). Due these characteristics of this pigment, our study evaluated if its overproduction combined with PDT-RBAc could change the amount of melanin in the cells. In addition, we verified that the groups M++ and M++ RBAc are more susceptible to photosensitization when irradiated with visible light, which was discussed earlier in this study.

3.4.4 Antioxidant enzymes

DNA repair mechanisms used by the cells to repair damage such as those discussed above are considered as a form of cellular protection. Nevertheless, the cells have others types of defense, like antioxidants mechanisms, which are barriers against ROS and other harmful species. Antioxidant enzymes, such as catalase (CAT), glutathione peroxidase, (GPx), glutathione reductase (Gred), superoxide dismutase (SOD) aid to control the intracellular concentrations of ROS. GPx catalyzes the reduction of hydroperoxides via the oxidation of reduced glutathione (GSH) to form glutathione oxidated (GSSG). Glutathione is an important molecule in the cellular antioxidant system because it serves as a cosubstrate for enzymes and can react with some ROS. Gred converts GSSG into GSH at the expense of NADPH (HERMES-LIMA, 2005; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007 ;TOPPO et al., 2009).

There are no specific enzymes that act directly on the $^1O_2$. Thereby, there are some cellular soluble antioxidants that can act as *quenchers* of $^1O_2$ and a few enzymes that can act on the decomposition or repair of reaction products from this species (SUZUKAWA et al., 2012). Then, it would be interesting to understand how the redox state of the cells when submitted to the different treatments presented in table 1 could influence cellular antioxidant mechanisms. In this work, we investigated the enzyme activity of the antioxidant enzymes glutathione reductase and glutathione peroxidase. During photosensitized irradiation, changes in the activities of antioxidant enzymes may occur and may play an important role in modulation of cell viability (DAICOVICIU et al., 2011). Thus, the enzymatic activity analyzes were performed after 18 hours of irradiation, in order to verify the oxidative state of this cell after certain time.

As discussed earlier, the increased $^1O_2$ formation was demonstrated by CHIARELLI-NETO et al. (2014) in more pigmented B16-F10 cells. SUZUKAWA et al., 2012 performed the quantification of $^1O_2$ after the irradiation of 2 $\mu g.mL^{-1}$ photosensitizer RBAc, a smaller concentration that was used in this study. However, it was demonstrated that irradiation in the absence of rose bengal did not lead to the formation of this reactive oxygen species, whereas when the same process was carried out in the presence of the photosensitizer RB, singlet oxygen formation was verified in a time-dependent manner.

The results for glutathione reductase after 18 hours of irradiation (Fig. 6A) showed a statistically significant decrease between the groups M++RBAc in the dark condition and M++RBAc in the light condition, besides, 18% less activity for M++RBAc in relation to between the group M++ when irradiated. In relation to the activity of glutathione peroxidase (Fig. 6B), it is observed that the enzymatic activity of the group M++RBAc in the light condition had a decrease of approximately 37%, when compared to the same group in the dark condition.

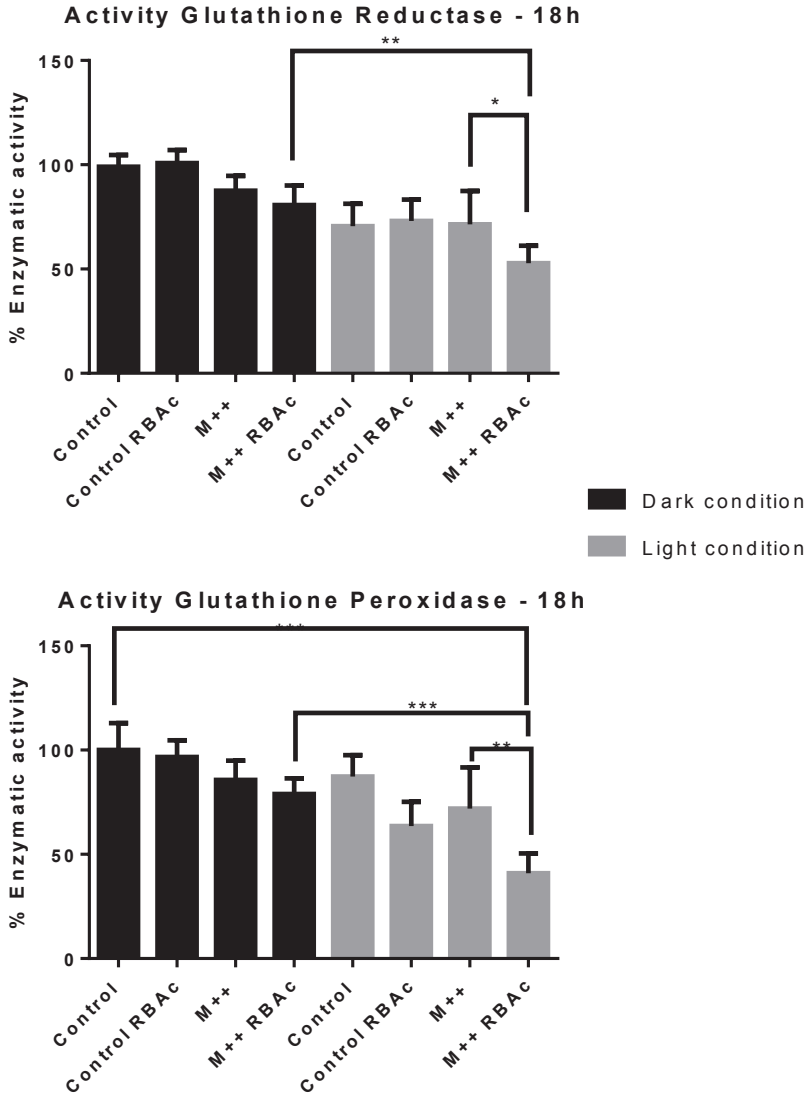


FIGURE 6 - ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY – GLUTATHIONE REDUCTASE AND GLUTATIONE PEROXIDASE

Note: B16F10 cells were plated ($5x10^5$ cells in the control condition and $6.25x10^5$ cells in the stimulus condition) and left for adhesion at 37 ° C and 2.5% CO2 for 24 h. Subsequently, melanogenesis was stimulated for 48 hours using 0.4 mM L-Tyrosine and 10 mM NH_4Cl and the photosensitization was performed as described in item 3.2.3. The activity of antioxidant enzymes was performed as described in item 3.2.8. (A) For glutathione reductase activity after 18 hours, the 100% control corresponds to 0.0054 µmol of NADPH consumed per minute per µg of protein. (B) For glutathione peroxidase activity after 18 hours, the 100% control corresponds to 0.00607 µmol of NADPH consumed per minute per µg of protein. Data are shown as the means±SD of three independent experiments in triplicate, n = 9. Asterisk indicates significant at ***p≤0.0001, **p≤0.001 and *p≤0.05.

These results may suggest that after this time of photosensitization, singlet oxygen have changed the activity of the enzyme glutathione reductase. This cellular defense may be weakened by the presence of this reactive species and its possible products, not being able to play its protective role which could also lead to higher levels of oxidative damage and loss of cellular viability as previously demonstrated. In addition, the protein may have been degraded by the proteasome system or by autophagy, mechanisms that are related to the response to oxidative stress (KLAUNIG et al., 2010).

The decrease in the activity of glutathione peroxidase, observed in the the group M++RBAc (light condition) could be showing that the irradiation and photosensitization of the B16-F10 cells is interfering in the activity of this enzyme. The photosensitized cells showed 30% less glutathione peroxidase activity. This decrease could be explained by the inactivation of glutathione peroxidase by singlet oxygen, as proposed by SURYO RAHMANTO et al. (2012). They exposured GPx either as purified proteins or in cell lysates to Rose Bengal and visible light, which resulted in a significant reduction in enzyme activity. Thus, they proposed that GPx could easily be inactivated by photoxidation reactions and $^1O_2$ may be a critical intermediate in the loss of activity.

In the data showed in Figure 6, it is also possible to note that pigmented B16-F10 cells, when irradiated, present a decrease in the activity of glutathione peroxidase, suggesting that the photosensitization of melanin can also interferes with the activity of this enzyme, for example with the generation of more reactive species that could overload the defense mechanisms.

4 CONCLUSION

From the investigation of DNA damage and repair of melanoma cells with different amount of melanin submitted to RBAc-PDT, this study showed that both types of DNA damage, 8-oxodGuo and CPD increased when the cells were evaluated immediately after the treatment with RBAc and irradiation with visible light, which induces a generation of $^1O_2$. However, after 18 h, 8-oxodGuo damage increased compared to the initial time, which shows that melanin may be preventing DNA repair and enhancing the formation of the damage. On the other hand, CPD-type damage decreased due to the repair. Therefore, the distinct behavior between these types of damage may contribute to the understanding of mutagenesis and genomic instability,

mechanisms that are related to the development and resistance of cancer, respectively. In addition, the activity of glutathione reductase of photosensitized cells increased immediately after irradiation, which may be a rapid response to the stress. Under the same conditions, glutathione peroxidase activity decreased, as well as after 18 hours. Our results support the involvement of melanin in the generation of DNA damage when photosensitized and in alterations of defense mechanisms associated to oxidate stress.

5 ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Multiuser Center for Conventional and Confocal Fluorescence Microscopy of the Biological Sciences Sector - UFPR, for the use of the equipment acquired with Pro-Equipment (CAPES) and Pro-Infra (FINEP), Professor Daniela de Almeida Cabrini from Pharmacology Department of UFPR for the loan of the UVB lamp. The authors acknowledge the Research Funding Institutions, CNPq (Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico - proc. 311629/2013-0), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), INCT de Processos Redox em Biomedicina – Redoxoma (proc. 573530/2008-4).

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nos experimentos realizados em células de melanoma murino B16-F10 sob estímulo da melanogênese induzida por tratamento com L-tirosina e cloreto de amônio e posterior irradiação com luz visível a partir da utilização de lâmpadas de LED de comprimento de onda 526±20 nm (dose total de 1.5 J/cm^2) com a utilização do fotossensibilizador RBAc, podemos concluir:

- O conteúdo de melanina não foi afetado pela irradiação, uma vez que as células B16-F10 estimuldas continuaram apresentando altas concentrações de melanina após submetidas à PDT-RBAc;

- A viabilidade celular dimuniu tanto imediatamente após a irradiação assim como 18 horas após o tratamento;
- Os danos ao DNA do 8-oxodGuo aumentaram nas células estimuladas para a melanogênese e fotossensibilizadas. Tal resultado demostra que a melanina, quando fotossensibilizada, pode estar atuando ativamente em gerar danos ao material genético. No entanto, após 18 horas, o dano do tipo 8-oxodGuo aumentou em relação ao tempo inicial, o que demostra que a melanina pode estar impedindo a atuação da enzima de reparo;
- Os danos CPD aumentaram nas células estimuladas para a melanogênese e fotossensibilizadas. Após 18 horas, este dano diminuiu em relação ao tempo inicial, o que demostra que possivelmente num tempo maior de avaliação de reparo, poderiam voltar ao seu nível basal;
- Após 18 h, a atividade de ambas as enzimas (glutationa redutase e glutationa peroxidase) diminuiu em relação aos controles.

7 REFERÊNCIAS

AGAR, N. S.; HALLIDAY, G. M.; BARNETSON, R. S.; et al. The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 14, p. 4954–4959, 2004.

ALLEN, M. T.; LYNCH, M.; LAGOS, A.; REDMOND, R. W.; KOCHEVAR, I. E. A wavelength dependent mechanism for rose bengal-sensitized photoinhibition of red cell acetylcholinesterase. **BBA - General Subjects**, v. 1075, n. 1, p. 42–49, 1991.

ALLISON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 27–42, 2004.

ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. **Clinical Endoscopy**, v. 46, n. 1, p. 24–29, 2013.

ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 2, p. 61–75, 2010. Elsevier B.V.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2015. Avaiable: https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf. Acesso: Fevereiro, 2017.

ANCANS, J.; TOBIN, D. J.; HOOGDUIJN, M. J.; et al. Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. **Experimental cell research**, v. 268, n. 1, p. 26–35, 2001.

ARMSTRONG, B. K.; KRICKER, A. The epidemiology of UV induced skin cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 63, n. 1-3, p. 8–18, 2001.

BABILAS, P.; SCHREML, S.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R. Photodynamic therapy in dermatology : state-of-the-art. , , n. 5, p. 118–132, 2010.

BACELLAR, I. O. L.; TSUBONE, T. M.; PAVANI, C.; BAPTISTA, M. S. Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20523–20559, 2015.

BALCH, C. M.; GERSHENWALD, J. E.; SOONG, S.; et al. J OURNAL OF C LINICAL O NCOLOGY Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. , v. 27, n. 36, 2015.

BALDEA, I.; OLTEANU, D. E.; BOLFA, P.; et al. Melanogenesis and DNA damage following photodynamic therapy in melanoma with two meso-substituted porphyrins. 78

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 161, p. 402–410, 2016a.

BALDEA, I.; OLTEANU, D. E.; BOLFA, P.; et al. Melanogenesis and DNA damage following photodynamic therapy in melanoma with two meso-substituted porphyrins. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161, p. 402–410, 2016b.

BARBI DE MOURA, M.; VINCENT, G.; FAYEWICZ, S. L.; et al. Mitochondrial respiration - an important therapeutic target in melanoma. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–13, 2012.

BELTRÁN-GARCÍA, M. J.; PRADO, F. M.; OLIVEIRA, M. S.; et al. Singlet molecular oxygen generation by light-activated DHN-melanin of the fungal pathogen Mycosphaerella fijiensis in black sigatoka disease of bananas. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

BERG, K.; WEYERGANG, A.; PRASMICKAITE, L.; et al. Photodynamic Therapy. **Methods in Molecular Biology**, v. 635, n. 12, p. 133–145, 2010.

BINIEK, K.; LEVI, K.; DAUSKARDT, R. H. Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 42, p. 17111–6, 2012.

BOTTIROLI, G.; CROCE, A C.; BALZARINI, P.; et al. Enzyme-assisted cell photosensitization: a proposal for an efficient approach to tumor therapy and diagnosis. The rose bengal fluorogenic substrate. **Photochemistry and photobiology**, v. 66, n. 3, p. 374–83, 1997.

BUYTAERT, E., DEWAELE, M., AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochim Biophys Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1776, n. 1, p. 86-107, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRASH, D. E. UV Signature Mutations. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 1, p. 15–26, 2015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/php.12377>.

CADET, J.; DOUKI, T. Oxidatively generated damage to DNA by UVA radiation in cells and human skin. **The Journal of investigative dermatology**, v. 131, n. 5, p. 1005–1007, 2011. Elsevier Masson SAS.

CADET, J.; MOURET, S.; RAVANAT, J. L.; DOUKI, T. Photoinduced damage to cellular DNA: Direct and photosensitized reactions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 5, p. 1048–1065, 2012. 79

CADET, J.; WAGNER, J. R. DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species,Oxidizing Agents, and UV Radiation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, p. 1–16, 2013.

CAFARDI, J. A; ELMETS, C. A. Expert Opinion on Biological Therapy T4 endonuclease V: review and application to dermatology. **Expert Opin. Biol. Ther**, v. 8, n. 6, p. 829–838, 2008.

CARLSON, J. A.; ROSS, J. S.; SLOMINSKI, A. J. New techniques in dermatopathology that help to diagnose and prognosticate melanoma. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 1, p. 75–102, 2009.

CARLSON, J. A.; ROSS, J. S.; SLOMINSKI, A. J. New techniques in dermatopathology that help to diagnose and prognosticate melanoma. **Clinics in dermatology**, v. 27, n. 1, p. 75–102, 2009.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279–293, 2004.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 2, p. 91–106, 2005.

CECCOLI, J.; ROSALES, N.; TSIMIS, J.; YAROSH, D. B. Encapsulation of the UV-DNA repair enzyme T4 endonuclease V in liposomes and delivery to human cells. **Journal of Investigative Dermatology**, 1989.

CHEN, Y.; ZHENG, W.; LI, Y.; et al. Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. **Cancer Science**, v. 99, n. 10, p. 2019–2027, 2008.

CHIARELLI-NETO, O.; FERREIRA, A. S.; MARTINS, W. K.; et al. Melanin Photosensitization and the Effect of Visible Light on Epithelial Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113266, 2014.

CHIARELLI-NETO, O.; PAVANI, C.; S. FERREIRA, A.; et al. Generation and suppression of singlet oxygen in hair by photosensitization of melanin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 6, p. 1195–1202, 2011.

CICHOREK, M.; WACHULSKA, M.; STASIEWICZ, A.; TYMIŃSKA, A. Skin melanocytes: Biology and development. **Postepy Dermatologii i Alergologii**, v. 30, n. 1, p. 30–41, 2013.

COLLIER, A. C.; PRITSOS, C. A. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 2, p. 281–287, 2003.

CUNHA, E. S.; KAWAHARA, R.; KADOWAKI, M. K.; et al. Melanogenesis stimulation in B16-F10 melanoma cells induces cell cycle alterations, increased ROS levels and a differential expression of proteins as revealed by proteomic analysis. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 15, p. 1913–1925, 2012.

COOKE, M. S.; EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 17, n. 10, p. 1195–1214, 2003.

D'ISCHIA, M.; WAKAMATSU, K.; CICOIRA, F.; et al. Melanins and Melanogenesis: From Pigment Cells to Human Health and Technological Applications. **Pigment Cell & Melanoma Research**, p. n/a–n/a, 2015.

D'ISCHIA, M.; WAKAMATSU, K.; NAPOLITANO, A.; et al. Melanins and melanogenesis: methods, standards, protocols. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 26, n. 5, p. 616–633, 2013.

DAI, T.; FUCHS, B. B.; COLEMAN, J. J.; et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. APR, p. 1–16, 2012.

DAICOVICIU, D.; FILIP, A. G.; ION, R. M.; et al. Oxidative photodamage induced by photodynamic therapy with methoxyphenyl porphyrin derivatives in tumour-bearing rats. **Folia Biologica**, v. 57, n. 1, p. 12–19, 2011.

DAVID, S. S.; SHEA, V. L. O.; KUNDU, S. Base Excision Repair of Oxidative DNA Damage Sheila. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 941–950, 2010.

DAVIDS, L. M.; KLEEMANN, B. Combating melanoma: The use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool. **Cancer Treatment Reviews**, v. 37, n. 6, p. 465–475, 2011.

DETTY, M. R.; GIBSON, S. L.; WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 16, p. 3897–3915, 2004.

DI MASCIO, P; BECHARA, E. J. H.; Medeiros, M. H. G.; Briviba, K.; Sies, H.; **FEBS Lett.** 1994, 355, 287.

DOUKI, T.; REYNAUD-ANGELIN, A.; CADET, J.; SAGE, E. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. **Biochemistry**, v. 42, n. 30, p. 9221–9226, 2003. 81

DUDLEY, M. E.; YANG, J. C.; SHERRY, R.; et al. Adoptive Cell Therapy for Patients With Metastatic Melanoma: Evaluation of Intensive Myeloablative Chemoradiation Preparative Regimens. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 32, p. 5233–5239, 2008.

ELOBEID, A. S.; KAMAL-ELDIN, A.; ABDELHALIM, M. A. K.; HASEEB, A. M. Pharmacological Properties of Melanin and its Function in Health. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 2017.

EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; COOKE, M. S. **Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance**. 2004.

FELSHER, D. W. Cancer revoked: oncogenes as therapeutic targets. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. May, p. 375–380, 2003.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114-120, 1984.

FOOTE, C. S. DEFINITION OF TYPE I and TYPE II PHOTOSENSITIZED OXIDATION. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, n. 5, p. 659, 1991.

FOUSTERI, M.; MULLENDERS, L. H. F. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. **Cell research**, v. 18, n. 1, p. 73–84, 2008.

GENEZ, L. A. L. Relação da vimentina e autofagia com a morte de células Melan-A e B16-F10 tratadas com RBAc-PDT. 2015. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.2015.

GILCHREST, B. A; ELLER, M. S. DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses. **The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research**, v. 4, n. 1, p. 35–40, 1999.

GRUIJL, F. R. DE; KRANEN, H. J. VAN; MULLENDERS, L. H. F. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 63, n. 1-3, p. 19–27, 2001.

HALLIDAY, G.; AGAR, N.; BARNETSON, R.; ANANTHASWAMY, H.; JONES, A. UV-A Fingerprint Mutations in Human Skin Cancer. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, n. 1, p. 3–8, 2007.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007.

HEARING, V. J.; JIMÉNEZ, M. Mammalian tyrosinase-The critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. **International Journal of Biochemistry**, v. 19, n. 12, p. 1141–1147, 1987. 82

HEGDE, M. L.; HAZRA, T. K.; MITRA, S. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. **Cell research**, v. 18, n. 1, p. 27–47, 2008.
HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K. B. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. New Jersey:Wiley-Liss, p. 319-368,2004.

HILL, V. K.; GARTNER, J. J.; SAMUELS, Y.; GOLDSTEIN, A. M. GG14CH12-Samuels The Genetics of Melanoma: Recent Advances *. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet**, v. 14, p. 257–79, 2013.

HOOGDUIJN, M. J.; CEMELI, E.; ROSS, K.; et al. Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H 2 O 2 -induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca 2 +. **Experimental cell research**, v. 294, n. 1, p. 60–67, 2004.

HRBAC, J.; KOHEN, R. Biological redox activity: Its importance, methods for its quantification and implication for health and disease. **Drug Development Research**, v. 50, n. 3-4, p. 516–527, 2000.

HUANG, C. H.; LI, H. J.; WU, N. L.; et al. Photoprotective effects of cycloheterophyllin against UVA-induced damage and oxidative stress in human dermal fibroblasts. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–14, 2016.

HUANG, Y.; VECCHIO, D.; AVCI, P.; et al. Melanoma resistance to photodynamic therapy : new insights. , v. 394, n. 2, p. 239–250, 2014.

INCA- Instituto Nacional do Cancêr, Estimativa 2014 – incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014. Avaible http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf Access: February, 2016.

ITO, S.; WAKAMATSU, K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. **Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society**, v. 16, n. 5, p. 523–531, 2003.

ITO, S.; WAKAMATSU, K. Diversity of human hair pigmentation as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin. , p. 1369–1380, 2011.

KAMILERI, I.; KARAKASILIOTI, I.; GARINIS, G. A. Nucleotide excision repair: New tricks with old bricks. **Trends in Genetics**, v. 28, n. 11, p. 566–573, 2012.

KEMP, P. VAN DER; THOMAS, D.; BARBEY, R.; OLIVEIRA, R. DE; BOITEUX, S. Cloning and expression in Escherichia coli of the OGG1 gene of Saccharomyces cerevisiae, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. May, p. 5197–5202, 1996. 83

KIM, M. J.; LEE, S. C.; KANG, S. H.; CHOO, J.; SONG, J. M. Quantification of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers using an oligonucleotide chip assay. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 6, p. 2271–2277, 2010.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M.; HOCEVAR, B. A. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. **Toxicologic pathology**, v. 38, n. 1, p. 96–109, 2010.
KOCHEVAR, I. E.; REDMOND, R. W. Photosensitized production of single oxygen. **Methods in Enzymology**, v. 319, p. 20–28, 2000.

KOEVARY, S. B. Selective toxicity of rose bengal to ovarian cancer cells in vitro. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 4, n. 2, p. 99–107, 2012.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Toxicologic Pathology. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 6, p. 620–650, 2002.

KONGSHOJ, B.; DAM MIKKELSEN, N.; KOBAYASI, T.; LERCHE, C. M.; WULF, H. C. Ammonium chloride and l-tyrosine enhance melanogenesis in vitro but not in vivo even in combination with ultraviolet radiation. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 23, n. 5, p. 197–202, 2007.

KRESTYN, E.; KOLAROVA, H.; BAJGAR, R.; TOMANKOVA, K. Photodynamic properties of ZnTPPS4, ClAlPcS2 and ALA in human melanoma G361 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 1, p. 286–291, 2010.

KRYSTON, T. B.; GEORGIEV, A. B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A. G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 711, n. 1-2, p. 193–201, 2011.

KUSHIBIKI, T.; HIRASAWA, T.; OKAWA, S.; ISHIHARA, M. Responses of cancer cells induced by photodynamic therapy. **J Healthc Eng**, v. 4, n. 1, p. 87–108, 2013.

LAZOVICH, D.; VOGEL, R. I.; BERWICK, M.; et al. Indoor Tanning and Risk of Melanoma: A Case-Control Study in a Highly Exposed Population. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 19, n. 6, p. 1557–1568, 2010.

LEME, D. M.; OLIVEIRA, G. A. R. DE; MEIRELES, G.; et al. Genotoxicological assessment of two reactive dyes extracted from cotton fibres using artificial sweat. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 1, p. 31–38, 2014.

LEPHART, E. D. Skin Aging and Oxidative Stress: Equol's Anti-Aging Effects via Biochemical and Molecular Mechanisms. **Ageing Research Reviews**, v. 31, p. 1–19, 2016.

LINDAHL, T. Regulation and deficiencies in DNA repair *. , 1987. 84

LO, J. A; FISHER, D. E.; HOSPITAL, M. G. in Therapeutics. , v. 346, n. 6212, p. 945–949, 2016.
MADISON, K. C. Barrier Function of the Skin: “"La Raison d”Etre" of the Epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 2, p. 231–241, 2003.

MAMOON, A. M.; GAMAL-ELDEEN, A. M.; RUPPEL, M. E.; et al. In vitro efficiency and mechanistic role of indocyanine green as photodynamic therapy agent for human melanoma. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 2, p. 105–116, 2009.

MANG, T. S. Lasers and light sources for PDT: Past, present and future. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 43–48, 2004.

MARTINEZ, G. R., MEDEIROS, M. H. G., RAVANAT, J. L., CADET, J. e MASCIO, P. D. [18O]-Labeled Singlet Oxygen as a Tool for Mechanistic Studies of 8-Oxo-7,8-Dihydroguanine Oxidative Damage: Detection of Spiroiminodihydantoin, Imidazolone and Oxazolone Derivatives. **Biological Chemistry***,* v. 383, n.3-4, p. 607-617, 2002.

MCMASTER, M. L.; KRISTINSSON, S. Y.; TURESSON, I.; BJORKHOLM, M.; LANDGREN, O. NIH Public Access. **Clinical Lymphoma**, v. 9, n. 1, p. 19–22, 2010.
MECH, L. D. A Gray Wolf (Canis lupus) Delivers Live Prey to a Pup. **Canadian Field-Naturalist**, v. 128, n. 2, p. 189–190, 2014.

MEIRA, W. V.; HEINRICH, T. A.; CADENA, S. M. S. C.; MARTINEZ, G. R. Melanogenesis inhibits respiration in B16-F10 melanoma cells whereas enhances mitochondrial cell content. **Experimental Cell Research**, v. 350, n. 1, p. 62–72, 2016.

MELONI, M.; NICOLAY, J. F. Dynamic monitoring of glutathione redox status in UV-B irradiated reconstituted epidermis: Effect of antioxidant activity on skin homeostasis. **Toxicology in Vitro**, v. 17, n. 5-6, p. 609–613, 2003.

MILLER, A. J.; MIHM, M. C. review article. , p. 51–65, 2006.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405–410, 2002.

MOOI, W. J.; PEEPER, D. S. Oncogene-Induced Cell Senescence — Halting on the Road to Cancer. , p. 1037–1046, 2006.

MORIWAKI, S. Human DNA repair disorders in dermatology: A historical perspective, current concepts and new insight. **Journal of Dermatological Science**, v. 81, n. 2, p. 77–84, 2016. Japanese Society for Investigative Dermatology.

MOURET, S.; BAUDOUIN, C.; CHARVERON, M.; et al. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 37, p. 13765–70, 2006. 85

MOUSAVI, S.H. ; ZHANG X.D.; GILLESPIE S; WACHTER, E.,HERSEY P.,Rose Bengal induces dual modes of cell death in melanoma cells and has clinical activity against melanoma**.Melanoma Res**.,p. 23, 2006.

MROZ, P.; YAROSLAVSKY, A.; KHARKWAL, G. B.; HAMBLIN, M. R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. **Cancers**, v. 3, n. 2, p. 2516–2539, 2011.

MUNOZ-MUNOZ, J. L.; GARCIA-MOLINA, F.; GARCIA-MOLINA, M.; et al. Kinetic characterization of the oxidation of carbidopa and benserazide by tyrosinase and peroxidase. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 73, n. 6, p. 1308–1313, 2009.

OBIN, M.; SHANG, F.; GONG, X.; et al. Redox regulation of ubiquitin-conjugating enzymes: mechanistic insights using the thiol-specific oxidant diamide. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 12, n. 7, p. 561–569, 1998.

ONISZCZUK, A.; WOJTUNIK-KULESZA, K. A.; ONISZCZUK, T.; KASPRZAK, K. The potential of photodynamic therapy (PDT)???Experimental investigations and clinical use. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 83, p. 912–929, 2016.

OTSU, K.; SATO, K.; IKEDA, Y.; et al. An abortive apoptotic pathway induced by singlet oxygen is due to the suppression of caspase activation. **The Biochemical journal**, v. 389, n. Pt 1, p. 197–206, 2005.

PAGLIOSA, C. M.; SIMAS, K. N. DE; AMBONI, R. D. M. C.; et al. Characterization of the bark from residues from mate tree harvesting (Ilex paraguariensis St. Hil.). **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 428–433, 2010.

PANICH, U.; ONKOKSOONG, T.; LIMSAENGURAI, S.; AKARASEREENONT, P.; WONGKAJORNSILP, A. UVA-induced melanogenesis and modulation of glutathione redox system in different melanoma cell lines: The protective effect of gallic acid. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 108, p. 16–22, 2012.

PANZARINI, E.; INGUSCIO, V.; DINI, L. Overview of cell death mechanisms induced by rose bengal acetate-photodynamic therapy. **International Journal of Photoenergy**, v. 2011, 2011.

PANZARINI, E.; INGUSCIO, V.; FIMIA, G. M.; DINI, L. Rose Bengal Acetate PhotoDynamic Therapy (RBAc-PDT) induces exposure and release of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in human HeLa cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 20–22, 2014.

PARK, H. Y.; KOSMADAKI, M.; YAAR, M.; GILCHREST, B. A. Review Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. , v. 66, p. 1493–1506, 2009.

PELLOSI, M. C.; SUZUKAWA, A. A.; SCALFO, A. C.; et al. Effects of the melanin precursor 5,6-dihydroxy-indole-2-carboxylic acid (DHICA) on DNA damage and repair in the presence of reactive oxygen species. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 557, p. 55–64, 2014. 86

PEREIRA, N. A M.; LARANJO, M.; PINEIRO, M.; et al. Novel 4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyridine fused chlorins as very active photodynamic agents for melanoma cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 103, p. 374–380, 2015.

PEREIRA ROSA, L.; SILVA, F. C. DA. Antimicrobial Photodynamic Therapy: A New Therapeutic Option to Combat Infections. **Journal of Medical Microbiology & Diagnosis**, v. 3, n. 4, p. 1– 7, 2014.

PERES, P. S.; VALERIO, A.; CADENA, S. M. S. C.; et al. Glutathione modifies the oxidation products of 2???-deoxyguanosine by singlet molecular oxygen. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 586, p. 33–44, 2015.

PERUSSI, J. R. Inativação Fotodinânica de microrganismos. **Quimica Nova**, v. 30, n. 4, p. 988–994, 2007.

PETERSON, C. L.; CÔTÉ, J. Cellular machineries for chromosomal DNA repair Cellular machineries for chromosomal DNA repair. , , n. 508, p. 602–616, 2004.

PFEIFER, G. P.; YOU, Y.-H.; BESARATINIA, A. Mutations induced by ultraviolet light. **Mutation research**, v. 571, n. 1-2, p. 19–31, 2005.

PIERLOT C.; AUBRY, J.-M; BRIVIBA; K., SIES; H., DI MASCIO, P.; H.S. LESTER. **Methods in Enzymology**, p.319,2000.

PILLAIYAR, T.; MANICKAM, M.; SH, J. Downregulation of melanogenesis : drug discovery and therapeutic options. **Drug Discov Today**, v. Sep, n. 00, 2016.

PREMI, S.; BRASH, D. E. Chemical excitation of electrons: A dark path to melanoma. **DNA Repair**, p. 1–9, 2016.

PREMI, S.; WALLISCH, S.; MANO, C. M.; et al. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. **Science**, v. 347, n. 6224, p. 842–847, 2015.

RAHMANTO, A. S.; MORGAN, P. E.; HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Cellular effects of photogenerated oxidants and long-lived, reactive, hydroperoxide photoproducts. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 10, p. 1505–1515, 2010. Elsevier Inc.

RAVANAT, J. L.; MASCIO, P. D.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; CADET, J. Singlet Oxygen Induces Oxidation of Cellular DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 8, p. 40601–40604, 2001.

RAVANAT, J.-L.; DOUKI, T.; CADET, J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 63, n. 1-3, p. 88–102, 2001. 87

RILEY, P. A. Melanogenesis and melanoma. **Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society**, v. 16, n. 5, p. 548–552, 2003.

RIZZI, M.; TONELLO, S.; ESTEVÃO, B. M.; et al. Verteporfin based silica nanoparticle for in vitro selective inhibition of human highly invasive melanoma cell proliferation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 167, p. 1–6, 2017.

RONSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; MASCIO, P. DI; MARTINEZ, G. R. Oxidaçãoo de proteínas por oxigênio singlete: Mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Quimica Nova**, v. 29, n. 3, p. 563–568, 2006.

SAUVAIGO, S.; PETEC-CALIN, C.; CAILLAT, S.; ODIN, F.; CADET, J. Comet assay coupled to repair enzymes for the detection of oxidative damage to DNA induced by low doses of gamma-radiation: use of YOYO-1, low-background slides, and optimized electrophoresis conditions. **Analytical biochemistry**, v. 303, n. 1, p. 107–9, 2002.

SCHÄFER, M.; SCHMITZ, C.; FACIUS, R.; et al. Systematic study of parameters influencing the action of Rose Bengal with visible light on bacterial cells: comparison between the biological effect and singlet-oxygen production. **Photochemistry and photobiology**, v. 71, n. 5, p. 514–523, 2000.

SCHUCH, A. P.; MORENO, N. C.; SCHUCH, N. J.; MENCK, C. F. M.; GARCIA, C. C. M. Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. **Free Radical Biology and Medicine**, , n. January, p. 1–15, 2017.

SHEETS, W. C.; MUGNIER, E.; BARNABE, A.; MARKS, T. J.; POEPPELMEIER, K. R. Re V iews. , v. 19, n. 4, p. 7–20, 2006.

SILVA, E.; HELENA, A.; OLIVEIRA, S.; et al. Mutation Research / Reviews in Mutation Research DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. , v. 751, p. 15–28, 2012.

SLOMINSKI, A.; TOBIN, D. J.; SHIBAHARA, S.; WORTSMAN, J. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. , p. 1155–1228, 2004.

SMIT, N. P. M.; NIEUWPOORT, F. A. VAN; MARROT, L.; et al. Increased melanogenesis is a risk factor for oxidative DNA damage - Study on cultured melanocytes and atypical nevus cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 3, p. 550–555, 2008.

SOLDANI, C.; BOTTONE, M. G.; CROCE, A. C.; et al. The Golgi apparatus is a primary site of intracellular damage after photosensitization with Rose Bengal acetate. **European journal of histochemistry : EJH**, v. 48, n. 4, p. 443–448, 2004. 88

SOMMER, L. Generation of melanocytes from neural crest cells. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 24, n. 3, p. 411–421, 2011.

SRIVASTAV, A. K.; MUJTABA, S. F.; DWIVEDI, A.; et al. Photosensitized rose Bengal-induced phototoxicity on human melanoma cell line under natural sunlight exposure. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 156, p. 87–99, 2016.

STEENKEN, S.; JOVANOVIC, S. V. How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 3, p. 617–618, 1997.

SULEM, P.; GUDBJARTSSON, D. F.; STACEY, S. N.; et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. **Nature Genetics**, v. 39, n. 12, p. 1443–1452, 2007.

SURYO RAHMANTO, A.; PATTISON, D. I.; DAVIES, M. J. Photo-oxidation-induced inactivation of the selenium-containing protective enzymes thioredoxin reductase and glutathione peroxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 6, p. 1308–1316, 2012. Elsevier.

SUZUKAWA, A. A. Papel da feomelanina na formação de lesões oxidativas pelo oxigênio molecular singlete em DNA e em células de melanoma humano. 2012. 194f. **Tese** (Doutorado em Ciências-Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2012.

SUZUKAWA, A. A.; VIEIRA, A.; WINNISCHOFER, S. M. B.; et al. Novel properties of melanins include promotion of DNA strand breaks, impairment of repair, and reduced ability to damage DNA after quenching of singlet oxygen. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1945–1953, 2012.

TADA, M.; KOHNO, M.; NIWANO, Y. Scavenging or quenching effect of melanin on superoxide anion and singlet oxygen. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 46, n. 3, p. 224–228, 2010.

TCHOU, J.; BODEPUDI, V.; SHIBUTANI, S.; et al. Substrate Specificity of Fpg Protein: Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 21, p. 15318–15324, 1994.

TEW, K.; DUTTA, S.; SCHULTZ, M. Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents. **Advanced drug delivery reviews**, v. 26, n. 2-3, p. 91–104, 1997.

THAYER, M. M.; AHERN, H.; XING, D.; CUNNINGHAM, R. P.; TAINER, J. A. Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. **The EMBO journal**, v. 14, n. 16, p. 4108–20, 1995.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–221, 2000. 89

TOPPO, S.; FLOHÉ, L.; URSINI, F.; VANIN, S.; MAIORINO, M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1790, n. 11, p. 1486–1500, 2009.

TUONG, W.; CHENG, L. S.; ARMSTRONG, A. W. Melanoma: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Outcomes. **Dermatologic Clinics**, v. 30, n. 1, p. 113–124, 2012.

VASSALLE, C.; MASINI, S.; CARPEGGIANI, C.; et al. In vivo total antioxidant capacity: comparison of two different analytical methods. **Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC**, v. 42, n. 1, p. 84–89, 2004.

WANG, A.; MARINO, A. R.; GASYNA, Z.; GASYNA, E.; JR, J. N. Photoprotection by Porcine Eumelanin Against Singlet Oxygen Production †. , p. 679–682, 2008.

WOOD, S.; METCALF, D.; DEVINE, D.; ROBINSON, C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 680–684, 2006.

WOODS, J. A; TRAYNOR, N. J.; BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. The Effect of Photofrin on DNA Strand Breaks and Base Oxidation in HaCaT Keratinocytes: A Comet Assay Study. **Photochemistry and photobiology**, v. 79, p. 105–113, 2004.

YAMAGUCHI, Y.; BRENNER, M.; HEARING, V. J. The regulation of skin pigmentation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 38, p. 27557–27561, 2007.

YU, Y.; CUI, Y.; NIEDERNHOFER, L. J.; WANG, Y. Occurrence, Biological Consequences, and Human Health Relevance of Oxidative Stress-Induced DNA Damage. **Chemical Research in Toxicology**, p. acs.chemrestox.6b00265, 2016.

ZADLO, A.; SZEWCZYK, G.; SARNA, M.; et al. Photoaging of retinal pigment epithelial melanosomes: The effect of photobleaching on morphology and reactivity of the pigment granules. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 97, p. 320–329, 2016.

ZAIDI, M. R.; DAY, C.-P.; MERLINO, G. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. **The Journal of investigative dermatology**, v. 128, n. 10, p. 2381–2391, 2008.

SUPPLEMENTARY MATERIAL 1

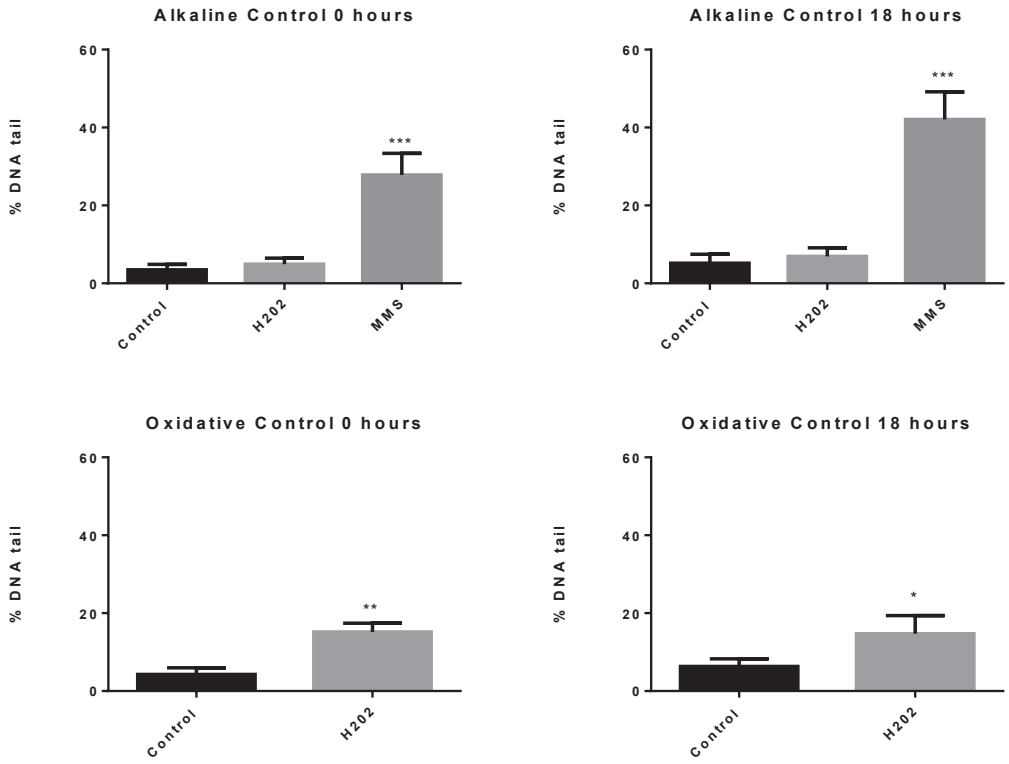


FIGURE 7 – CONTROLS OF COMET ASSAY

Note: For control of the technique, B16-F10 cells were exposed to 1 mM MMS and subjected to the alkaline comet assay (without addition of the hOGG1 enzyme). For the control of oxidative comet assay (with the addition of the hOGG1 enzyme), the cells, already on the slides, were exposure to H2O2 (50μM) for 5 minutes. 100 cells per treatment were analyzed in each experiment. The values represent the mean±SEM of three different experiments, n=3. (***p≤0.0001, **p≤0.001, *p≤0.05).

It was expected that for the alkaline essay the only group that presents statistical difference when compared with cells in the dark without melanogenic stimulus (negative control) and cells treated with H_2O_2 would be the MMS control group, where the B16-F10 cells were treated with the alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS) 1 mM to induce formation of breaks in the DNA strands, acting as a positive control of the assay. The damage caused by the H_2O_2 could be verified in the oxidative assay, where it is evidenced by the presence of a repair enzyme hOGG1.