

VIVIANE ANTUNES DOS SANTOS

**O EFEITO DA MELANINA EM CÉLULAS TRATADAS COM OXIGÊNIO
MOLECULAR SINGLETE**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Glaucia Regina
Martinez

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Benigna
Martinelli de Oliveira

CURITIBA

2007

Ao meu grandioso e poderoso Deus, o qual me deu graça, sabedoria e paciência para realizar este trabalho.

Ao meu amado esposo, Rogério, que me deu muita força, amor e dedicação. Eu te amo.

**Aos meus pais e meu irmão, pelo
grande amor e confiança dado a
mim.**

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por seu amor e fidelidade, que nas horas de angústia me levantou.

Ao meu grande amor, Rogério, esposo abençoado, presente de Deus. Obrigada pelas palavras de amor nas horas precisas, pelo seu tempo nos finais de semana e feriados, ajudando-me nos experimentos.

Aos meus pais e familiares que de alguma forma me conduziram até aqui. Expressando amor, carinho e admiração.

Aos Prs. Milton e Viviane pelas orações, bem como aos membros da Igreja Comunidade Alcance de Pinhais.

À Prof.^a Dr.^a Glaucia Regina Martinez, pela dedicação, confiança, pelos ensinamentos, apoio, dinamismo e disposição em toda essa jornada.

À Prof.^a Dr.^a Maria Benigna Martinelli de Oliveira, pelo exemplo profissional e orientação.

À Prof.^a Dr.^a Célia Regina C. Franco, pela amizade, alegria, conselhos e indispensável colaboração nos experimentos de morfologia celular, bem como nas análises das eletromicrografias.

Ao Prof. Dr. Edvaldo S. Trindade, pela amizade, disposição, sugestões e grande auxílio na realização e análise dos experimentos de imunofluorescência.

À Prof.^a Dr.^a Lucélia Donatti pela captura de imagens através do microscópio eletrônico de varredura.

Ao Prof. Dr. Sílvio Zanatta e seus alunos, pela disposição em ajudar nas horas precisas.

À Prof.^a Dr.^a Guilhermina Rodrigues Noletto, pela amizade, sugestões científicas e ajuda no Laboratório de Cultivo Celular.

Ao Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos Professores Paolo Di Mascio e Marisa H.G. de Medeiros do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP pelo apoio.

Ao técnico da USP do Departamento de Bioquímica, Osmar Gomes, pela ajuda com algumas amostras no HPLC e pelo socorro em momentos decisivos.

Às técnicas Elizabeth Naomi e Caroline Romera, do Laboratório de Confocal, da Universidade Federal de São Paulo, pela disposição e pela captação de imagens no microscópio a laser de varredura confocal.

Às professoras do Laboratório de Oxidações Biológicas, Dr.^a Sílvia Cadena, Dr.^a Eva Carnieri, Dr.^a Maria Eliane e Dr. André Mariano, pelo auxílio e amizade.

Aos colegas da Biologia Celular, Kátia, Gabriel, Fernando, Jenifer, Reginaldo, Olga e Nilza, pela amizade, ajuda direta e indireta na realização dos experimentos.

Aos alunos e amigos de Iniciação Científica do Laboratório de Oxidações biológicas, Camila, Tatiana, Fabiana, Paulo e Eduardo, pela amizade e auxílio.

Às amigas Juliana e Izabel, pela amizade, carinho e longas conversas. Vocês são especiais.

À amiga Amanda, pela amizade, carinho e auxílio profissional e emocional. Que bom ter você como amiga. Deus é contigo.

Às amigas, Stelia Carolina, Sílvia Romão, Tatiana Herrerias, Rosilene Rebeca e Caroline Valente, pela amizade, carinho, troca de experiências e materiais, e auxílio. Obrigada por tudo. Vocês foram uma benção em minha vida. Aos amigos Gláucio e Danilo, pela amizade e carinho. Deus os abençoe.

Aos técnicos do Centro de Microscopia Eletrônica de Varredura, da UFPR, Vera Regina, Sérgio e Rosângela, pela amizade e grande auxílio na realização das eletromicrografias.

À técnica e amiga Silvana Doin Lima Bueno, do Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular, pela amizade, conversas e suporte técnico. Deus te abençoe. Você é muito especial.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Professores, Funcionários e amigos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

À Sra. Marilza Lamour, pelo auxílio.

À Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas (UFPR), em especial às bibliotecárias da seção de periódicos, pela colaboração.

À CAPES e CNPq, pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma me ajudaram nesses dois anos, para a realização deste trabalho, em meu crescimento intelectual, espiritual e profissional. Que Deus os abençoe ricamente.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 ESTRESSE OXIDATIVO	3
2.2 DANOS RELACIONADOS AO DNA	5
2.3 MELANOMA	6
2.4 MELANINA E ROS	9
2.5 APOPTOSE E $^1\text{O}_2$	14
3. JUSTIFICATIVAS	18
4. OBJETIVOS	19
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	20
6. MATERIAIS E MÉTODOS	21
6.1 GERADOR DE OXIGÊNIO SINGLETE	21
6.1.1 Síntese do endoperóxido da <i>N,N'</i> -di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanamida (DHPNO ₂)	21
6.2 PROCEDIMENTOS DE CULTIVO CELULAR	22
6.2.1 Esterilização dos Materiais	22
6.2.2 Soluções-Tampão e Meios de Cultura	23
6.2.2.1 Solução Salina Tamponada (PBS)	23
6.2.2.2 Solução de Tripsina-EDTA	23
6.2.2.3 Solução Balanceada de Hanks (HBSS)	23
6.2.2.4 Meios de Cultura	24
6.2.3 Linhagens celulares	24
6.2.3.1 Condições de cultivo	24
6.3 AVALIAÇÃO DA MELANOGÊNESE	25
6.3.1 Otimização das concentrações de L-tirosina e α -MSH	25

6.3.2	Quantificação de melanina pela absorvância no visível	25
6.4	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	26
6.4.1	Método do Azul de Trypan.....	26
6.4.2	Método do MTT.....	27
6.5	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DANOS AO DNA.....	27
6.5.1	Tratamento das células com DHPNO ₂	27
6.5.2	Extração do DNA das células	28
6.5.3	Digestão do DNA.....	29
6.5.4	Análise da lesão 8-oxodG por HPLC.....	29
6.6	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDA PELO ¹ O ₂	30
6.6.1	Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	30
6.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
7.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
7.1	ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE	31
7.2	CONCENTRAÇÃO E PUREZA DO ENDOPERÓXIDO DHPNO ₂	36
7.3	EFEITO DO ¹ O ₂ NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS B16-F10, SK-MEL E BHK-21	37
7.3.1	Efeito do DHPNO ₂ sobre a viabilidade de células B16-F10, SK-MEL E BHK-21 pelo método de Azul de Trypan	38
7.3.2	Viabilidade pelo método do MTT.....	44
7.4	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DA LESÃO 8-OXODG.....	48
7.5	ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16-F10, SK-MEL E BHK-21	53
7.5.1	Análise ultraestrutural através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das células B16-F10, SK-MEL e BHK-21.....	53
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
9.	CONCLUSÃO	65
10.	REFERÊNCIAS	66

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTADOS ENERGÉTICOS DO OXIGÊNIO MOLECULAR.....	5
FIGURA 2 - BIOSÍNTESE DA EUMELANINA	11
FIGURA 3 - BIOSÍNTESE DA FEOMELANINA	12
FIGURA 4 – MECANISMO DA APOPTOSE.....	17
FIGURA 5 - ROTA DE SÍNTESE DO DHPNO ₂	22
FIGURA 6 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE L-TIROSINA NO ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE EM MEIO COM E SEM SORO.....	32
FIGURA 7 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE α -MSH NO ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE EM MEIO COM E SEM SORO	33
FIGURA 8 - PRODUÇÃO DE MELANINA POR CÉLULAS B16-F10 EM MEIO SEM SORO	35
FIGURA 9 - PRODUÇÃO DE MELANINA POR CÉLULAS SK-MEL EM MEIO SEM SORO	36
FIGURA 10 - EFEITO DO DHPNO ₂ SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS B16-F10 DETERMINADA PELO MÉTODO DO AZUL DE TRYPAN, COM E SEM MELANOGÊNESE ESTIMULADA POR L-TIROSINA.....	40
FIGURA 11 - EFEITO DO DHPNO ₂ SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS B16-F10 DETERMINADA PELO MÉTODO DO AZUL DE TRYPAN, COM E SEM MELANOGÊNESE ESTIMULADA POR α -MSH.	41
FIGURA 12 - EFEITO DO DHPNO ₂ SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS SK-MEL DETERMINADA PELO MÉTODO DO AZUL DE TRYPAN, COM E SEM MELANOGÊNESE ESTIMULADA POR L-TIROSINA.....	42
FIGURA 13 - EFEITO DO DHPNO ₂ SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS BHK-21 DETERMINADA PELO MÉTODO DO AZUL DE TRYPAN, COM E SEM MELANOGÊNESE ESTIMULADA POR L-TIROSINA.....	43
FIGURA 14 - EFEITO DO DHPNO ₂ SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS BHK-21 DETERMINADA PELO MÉTODO DO AZUL DE TRYPAN, COM E SEM MELANOGÊNESE ESTIMULADA POR α -MSH	44
FIGURA 15 - EFEITO DO DHPNO ₂ SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS B16-F10 DETERMINADA PELO MÉTODO DO MTT, COM E SEM MELANOGÊNESE ESTIMULADA POR L-TIROSINA.	47

FIGURA 16 - EFEITO DO DHPNO ₂ SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS BHK-21 DETERMINADA PELO MÉTODO DO MTT, COM E SEM MELANOGÊNESE ESTIMULADA POR L-TIROSINA.....	48
FIGURA 17 – CROMATOGRAMA DA DETECÇÃO UV – NUCLEOSÍDEOS DO DNA.....	50
FIGURA 18 – CROMATOGRAMA DA DETECÇÃO ELETROQUÍMICA - 8-OXODG.....	51
FIGURA 19 – NÍVEIS DA LESÃO 8-OXODG APÓS TRATAMENTO COM ¹ O ₂ NAS CÉLULAS B16-F10.....	52
FIGURA 20 – NÍVEIS DA LESÃO 8-OXODG APÓS TRATAMENTO COM ¹ O ₂ NAS CÉLULAS BHK-21	53
FIGURA 21 – EFEITO DO ¹ O ₂ NA MORFOLOGIA CELULAR DAS CÉLULAS B16-F10 SUPLEMENTADAS OU NÃO COM L-TIROSINA	58
FIGURA 22 – EFEITO DO ¹ O ₂ NA MORFOLOGIA CELULAR DAS CÉLULAS SK-MEL SUPLEMENTADAS OU NÃO COM L-TIROSINA	60
FIGURA 23 – EFEITO DO ¹ O ₂ NA MORFOLOGIA CELULAR DAS CÉLULAS BHK-21 SUPLEMENTADAS OU NÃO COM L-TIROSINA.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	- Hormônio adrenocorticotrópico
α -MSH	- Hormônio Estimulante de Melanócitos
Apaf-1	- Fator ativador da protease-1 apoptótica
AP-1	- Ativador da proteína-1
BAPTA	- 1,2-bis(o-aminofenóxi) etano- <i>N,N,N',N'</i> - ácido tetracético
Bax	- Bcl-2 associada à proteína x
dA	- 2'-desoxiadenosina
dC	- 2'-desoxicitidina
dG	- 2'-desoxiguanosina
DHI	- 5-6-dihidroindol
DHICA	- 5-6-dihidroindol-2-ácido carboxílico
DHPNO ₂	- Endoperóxido da <i>N,N'</i> -di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'(1,4-naftilideno) dipropanamida
DHPN	- <i>N,N'</i> -di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'(1,4-naftilideno)dipropanamida
DMSO	- Dimetilsulfóxido
d.p.	- Desvio Padrão
dT	- 2'-desoxitimidina
EDTA	- Ácido Etilenodiaminotetracético
FAS	- Receptor de morte membro da família de receptores TNF
Fas-L	- Ligante Fas
HBSS	- Solução Balanceada de Hanks
HEPES	- <i>N</i> -(2-hidroxietil)piperazina- <i>N'</i> -(ácido 2-etanosulfônico)
HPLC	- High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Performance)
JNK	- c-Jun N-terminal Kinase
MC1R	- Receptor-1 da Melanocortina
MEM	- Meio Essencial Mínimo de Eagle
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
MPT	- Transição da permeabilidade mitocondrial
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
¹ O ₂	- Oxigênio Singlete

PARP	- Poly(ADP-ribose) polimerase
PBS	- Solução Salina-Fosfato Tamponada
PDT	- Terapia Fotodinâmica
PUMA	- P53 up-regulated modulator of apoptosis
8-oxodG	- 8-oxo-7,8-dihidroxi-2'-desoxiguanosina
ROS	- Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	- Rosewell Park Memorial Institute
SFB	- Soro Fetal Bovino
TPP	- Techno Plastic Products
TNF	- Fator de necrose tumoral
Tyr	- L-tirosina
UV	- Radiação ultravioleta

RESUMO

A radiação ultravioleta (UV) pode causar sérios danos à pele humana. A radiação UVB (290-320 nm) causa principalmente danos ao DNA, enquanto que a radiação UVA (320-400 nm) induz estresse oxidativo. A melanina, um pigmento presente na pele, possui suposta função de fotoproteção, entretanto, estudos apontam para uma possível fototoxicidade frente a estímulos como a radiação UV e espécies reativas de oxigênio (ROS). Considerando que a luz UVA promove estresse oxidativo envolvendo a produção de ROS, incluindo o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o principal interesse desse estudo foi investigar o papel específico do $^1\text{O}_2$ em células produtoras de melanina quanto a danos ao DNA e morte celular. Foram utilizadas células de melanoma B16-F10 (camundongo) e SK-MEL (humana). As condições ótimas de estímulo da melanogênese foram estabelecidas com L-tirosina (Tyr) e hormônio estimulante de melanócitos (α -MSH). Células não produtoras de melanina BHK-21 (fibroblastos de camundongo) foram utilizadas para comparação. O $^1\text{O}_2$ foi gerado pela termólise do endoperóxido derivado do naftaleno (DHPNO₂) a 37°C. O estímulo da melanogênese utilizando Tyr para as células B16-F10 e SK-MEL mostrou um aumento no conteúdo de melanina em relação ao controle de 70 e 37%, respectivamente. Quando se utilizou α -MSH o aumento foi de 108% para as células B16-F10. O tratamento com DHPNO₂ (1,0 mmol/L) diminuiu a viabilidade celular em cerca de 66% (B16-F10) e 58% (SK-MEL), sem diferenças entre as condições de melanogênese estimulada. Entretanto, as células B16-F10 tratadas com quantidades maiores de DHPNO₂ (5,0 e 10 mmol/L) e suplementadas com Tyr mostraram uma viabilidade maior (107% e 183%, respectivamente) quando comparadas com as células sem suplementação com Tyr. A viabilidade celular dos fibroblastos BHK-21 não variou significativamente em nenhum dos tratamentos. A análise dos danos ao DNA pela medida da 8-oxodG por HPLC com detector eletroquímico mostrou que as células B16-F10 com melanogênese estimulada pela Tyr e tratadas com DHPNO₂ (1,0 mmol/L) apresentaram níveis maiores de 8-oxodG (100% em relação ao respectivo controle e 55% em relação as células não-suplementadas com Tyr). A análise por microscopia eletrônica de varredura para as células de melanoma tratadas com DHPNO₂ (1,0 e 5,0 mmol/L) mostrou células menores, perda de características microespículas e presença de vesículas de secreção. Porém, em relação às células tratadas nessas mesmas condições, mas com suplementação de Tyr, observou-se um maior número de células espalhadas, achatadas e bem aderidas ao substrato. As eletromicrografias das células BHK-21 confirmaram os resultados de viabilidade celular, sem alterações morfológicas visíveis. Estes resultados em conjunto mostram que $^1\text{O}_2$ interfere na fisiologia das células de melanoma, causando danos e podendo levar ao processo de morte celular. Além disso, um aumento na quantidade de melanina parece modificar a resposta observada nos tratamentos com maiores concentrações de $^1\text{O}_2$, oferecendo proteção em relação à morte celular. Essas observações contribuem para um melhor entendimento dos mecanismos de alteração celular com relação à exposição à radiação UV e ainda reforçam os efeitos de resistência aos tratamentos de melanoma por fototerapia.

ABSTRACT

Ultraviolet (UV) radiation can lead to serious damage to human skin. UVB radiation at 290-320 nm causes mainly direct DNA damage and UVA radiation at 320-400 nm induces oxidative stress. Melanin, a skin pigment, may act in photoprotection, although, studies have pointed out a possible phototoxicity to UV radiation and reactive oxygen species (ROS). Considering that UVA radiation promotes oxidative stress, involving production of singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$), our main interest was to investigate the specific role of $^1\text{O}_2$ in DNA damage and cell death of melanin-producing cells. We used melanoma cells: B16-F10 (murine) and SK-MEL (human). The optimum conditions of melanogenesis stimulus by L-tyrosine (Tyr) and melanocyte-stimulating-hormone (α -MSH) were established. Cells that do not produce melanin (BHK-21, murine fibroblasts) were also used for comparison. The $^1\text{O}_2$ was generated by thermolysis of naphthalene endoperoxide (DHPNO₂) at 37°C. The amount of melanin in cells was increased at ~70% (B16-F10) and ~37% (SK-MEL) when treated with Tyr. When α -MSH was used, the increase was 108% for B16-F10 cells. The treatment with DHPNO₂ (1.0 mmol/L) decreased cell viability by ~66% (B16-F10) and ~58% (SK-MEL), without differences between Tyr supplemented and non-supplemented conditions. However, when B16-F10 cells were treated with higher amounts of DHPNO₂ (5.0 and 10 mmol/L), the cells supplemented with Tyr had a better viability (107% and 183%, respectively), when compared with non-supplemented cells. The cell viability for fibroblast cells BHK-21 was not decreased by any treatment. Evaluation of DNA damage, performed by measuring 8-oxodG levels by HPLC with electrochemical detection, showed that B16-F10 cells, which had melanogenesis stimulated by Tyr and were treated with DHPNO₂ (1.0 mmol/L), exhibited higher levels of 8-oxodG (100% compared to the respective control and 55% compared to non-supplemented cells). Scanning electron microscopy analysis showed morphological changes for melanin-producing cells (B16-F10 e SK-MEL) treated with DHPNO₂ (1 and 5 mmol/L). Small cells, loss of microspikes and some secretion vesicles were observed when compared to the control. However, cells supplemented with Tyr were more adherent, flattened and spread out, when compared to those not supplemented with Tyr and treated with $^1\text{O}_2$. Electron micrographies of BHK-21 were in agreement with the results of cell viability, without morphological alterations. All these results clearly show that $^1\text{O}_2$ modifies the physiology of melanoma cells, promoting DNA damage and cell death. Furthermore, the increased amount of melanin seems to change the response in the treatments with higher amounts of $^1\text{O}_2$, offering protection to cell death. We thus contributed to a better understanding of the cell mechanisms related to UV radiation exposure and to the known resistance of melanoma cells to phototherapy.

1. INTRODUÇÃO

A radiação ultravioleta é um poderoso agente etiológico da maioria dos cânceres de pele humano (ELDER, 1989; JHAPPAN *et al.*, 2003). A radiação UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm) podem causar sérios danos, agindo nas células por mecanismos de ação diferentes. A radiação UVB causa principalmente danos diretos ao DNA, tal como, dímeros pirimidínicos, os quais podem promover mutações que levam à carcinogênese (MACCUBBIN *et al.*, 1995; LARSSON *et al.*, 2005). Por sua vez, a radiação UVA induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), acarretando danos às membranas celulares, e também danos ao DNA, principalmente na forma de quebra da fita e ligação cruzada proteína-DNA (GODAR *et al.*, 1993).

Como consequência da exposição de células às radiações UVA e UVB, o processo de apoptose pode ser induzido. A indução da apoptose pela radiação UV e outros agentes danosos ao DNA desempenha um papel crítico, pois previne o acúmulo de danos genéticos contribuindo para uma menor chance de desenvolver tumores (BOHM *et al.*, 2005 e LEE & BERNSTEIN, 1995).

A melanina pode agir como agente de fotoproteção, absorvendo a radiação UV continuamente e seqüestrando ROS (KORYTOWSKI *et al.*, 1987). Além dessas, outras funções são também atribuídas à melanina como as funções de termoregulação e quelante de cátion (MORISON, 1985; GIACOMONI, 1995; HILL e HILL, 2000). A melanina é um pigmento encontrado em muitos organismos e tecidos, nos humanos pode ser sintetizada pelos melanócitos. Sua estrutura consiste de um heteropolímero formado de 5-6-dihidroindol (DHI) e 5-6-dihidroindol-2-ácido carboxílico (DHICA) em proporções variadas. Sua formação ocorre a partir do processo de oxidação do aminoácido L-tirosina (SEALY *et al.*, 1980; NOFSINGER, 2002).

Embora muitos estudos apontem para um papel protetor desse pigmento, existem evidências contrárias, como a geração de ROS após irradiação com luz UV (SARNA *et al.*, 1980; SARNA *et al.*, 1984 e SEALY *et al.*, 1984).

Levando em consideração que a radiação UVA promove estresse oxidativo, e que existem evidências de que o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) apresenta um papel importante

nesse contexto (POURZAND & TYRREL 1999; GODAR *et al.*, 1993). Esse trabalho teve como principal objetivo avaliar o efeito da melanina em células sob tratamento com $^1\text{O}_2$. Esta espécie foi gerada através da reação de termodecomposição do endoperóxido DHPNO₂. Foram utilizadas neste estudo células de melanoma murino (B16-F10) e melanoma humano (SK-MEL), que são linhagens produtoras de melanina, e células não produtoras de melanina, BHK-21, uma linhagem de fibroblastos. As linhagens produtoras de melanina são importantes ferramentas experimentais muito utilizadas para o estudo do melanoma. Para tal estudo foram empregadas técnicas de separação por HPLC, para a identificação dos danos causados ao DNA pelo $^1\text{O}_2$; quantificação da melanina pela absorbância no visível; viabilidade celular, pelo método do MTT e Azul de Trypan; além da microscopia eletrônica de varredura, a fim de analisar a morfologia celular.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTRESSE OXIDATIVO

Um organismo para se manter saudável necessita de estratégias complexas, envolvendo muitos componentes celulares que trabalham visando o equilíbrio do sistema biológico. Quando há uma produção excessiva de ROS, seja ela induzida endógena ou exogenamente, proteínas, lipídeos e DNA são oxidados, podendo comprometer o bom funcionamento fisiológico. Existem enzimas e compostos de baixa massa molecular que constituem o sistema de defesa antioxidante. Uns podem ser sintetizados pelo próprio organismo e outros podem ser adquiridos através da dieta alimentar. As defesas antioxidantes são conhecidas por diminuir a quantidade de ROS, limitando os danos causados por essas espécies no sistema fisiológico. Desta forma, o pesquisador Helmut Sies conceituou o estresse oxidativo, como sendo um desequilíbrio celular no qual as ROS superariam as defesas antioxidantes, ocasionando um potencial dano oxidativo (AUGUSTO, 2006). Essa condição promove a formação de diversos tipos de alterações em biomoléculas, relacionada com a gênese de várias doenças, como o câncer e doenças neurológicas degenerativas, assim como o processo de envelhecimento (BRIVIBA *et al.*, 1997, BUCHKO *et al.*, 1995).

As principais ROS relacionadas ao estresse oxidativo são: o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($\bullet OH$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) e óxido nítrico (NO^{\bullet}) (SLUPPHAUG *et al.*, 2003; COOKE *et al.*, 2003; SARNA *et al.*, 1984 e SEALY *et al.*, 1984).

Essas espécies representam uma significativa ameaça para a integridade celular em termos de danos a biomoléculas (SLUPPHAUG *et al.*, 2003; COOKE *et al.*, 2003). ROS também podem inativar as enzimas antioxidantes, o que contribuiria ainda mais para o aumento do estresse oxidativo (BONT & LAREBEKE, 2004).

A geração de ROS pode ocorrer de forma endógena durante o metabolismo celular, como na fosforilação oxidativa em mitocôndrias e na β -oxidação de ácidos graxos em peroxissomos (KNAPOWSKI *et al.*, 2002), ou de forma exógena (FINKEL & HOLBROOK, 2000), como por exemplo, exposição à radiação UV e poluentes.

A reação de Fenton (reação i) é uma fonte do $\cdot\text{OH}$, este considerado um radical extremamente reativo, o qual causa sérios danos ao DNA como quebra na fita e modificações em bases que levam a mutações. Pode também agir sobre outras biomoléculas, como lipídeos, iniciando a peroxidação lipídica.



Outra forma de geração do $\cdot\text{OH}$ é pela cisão homolítica do H_2O_2 promovida pela luz UVB (290-320 nm) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999) ou pela radiação ionizante (FINKEL *et al.*, 2000).

O $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode ser gerado pela redução do oxigênio molecular (O_2). Este radical não apresenta alta reatividade frente às biomoléculas, mas pode acelerar a reação de Fenton, reduzindo o Fe(III) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). É estimado que cerca de 1-2% do oxigênio consumido pela cadeia respiratória da mitocôndria sofre redução de um elétron pela NADH desidrogenase ou pela coenzima Q gerando $\text{O}_2^{\bullet-}$. (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999; BONT & LAREBEKE, 2004).

O $\text{NO}\cdot$ é um radical livre, gerado por uma classe de enzimas denominadas óxido nítrico sintases. O $\text{NO}\cdot$ é pouco reativo, porém, a interação do $\text{NO}\cdot$ com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ gera um potente oxidante, o peroxinitrito (ONOO^-). Este pode reagir por *via* iônica envolvendo a transferência de dois elétrons ou formar radicais livres a partir da homólise da ligação peroxo, formando $\cdot\text{OH}$ e $\text{NO}_2\cdot$. O óxido nítrico e o peroxinitrito são também considerados como espécies reativas de nitrogênio (RNS) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

O O_2 é um diradical, sendo considerado ao mesmo tempo essencial e potencialmente tóxico ao organismo aeróbico (SIES, 1986). Sua reatividade pode ser aumentada sob excitação para os estados singletes, $^1\Sigma_g^+$ e $^1\Delta_g$ (FIGURA 1) (BRIVIBA *et al.*, 1997). O estado excitado de alta energia, $^1\Sigma_g^+$ tem vida-média curta (aproximadamente 10^{-11} s em água), decaindo rapidamente para o estado $^1\Delta_g$ com energia de 93,6 kJ (22,5 kcal), (representado por $^1\text{O}_2$), o $^1\text{O}_2$ tem vida-média de 4 μs em água (FOOTE & CLENNAN, 1995).

FIGURA 1 - ESTADOS ENERGÉTICOS DO OXIGÊNIO MOLECULAR.

Estado	Orbitais π^*	Energia (kcal/mol)	τ (s)
$^1\Sigma_g^+$	\uparrow \downarrow	37,5	10^{-11}
$^1\Delta_g$	$\uparrow\downarrow$ —	22,5	10^{-6}
$^3\Sigma_g^-$	\uparrow \uparrow		

O 1O_2 é um poderoso oxidante gerado em diversas condições dos sistemas biológicos, incluindo reações enzimáticas de peroxidases e oxidases (KANOFISKY, 1989), peroxidação lipídica (MIYAMOTO *et al.*, 2003) e processos inflamatórios (STEINBECK *et al.*, 1992). É produto também da ação fotodinâmica de corantes na presença de luz, através da transferência de energia na forma de fótons para os cromóforos, os quais, por sua vez, transferem essa energia ao O_2 , gerando 1O_2 (LARSSON *et al.*, 2005; KOICHEVAR & REDMOND, 2000).

A energia necessária para a transferência do estado fundamental triplete para o primeiro estado singlete excitado pode também ser promovida quimicamente pela decomposição de endoperóxidos, sendo esta uma interessante fonte de 1O_2 para estudos *in vitro*, pois não gera subprodutos e é compatível com as condições de sistemas biológicos (MARTINEZ, 2003; DI MASCIO & SIES, 1989).

2.2 DANOS RELACIONADOS AO DNA

Como já mencionado, o DNA pode ser alvo de modificações funcionais e estruturais. A 8-oxodG pode ser formada também pelo $\cdot OH$, essa lesão é altamente mutagênica, pois ao parear com adenina leva a uma transversão G para T (SHIBUTANI *et al.*, 1991; CAVALCANTE *et al.*, 2002). Dessa forma, a ocorrência da 8-oxodG apresenta um significado biológico importante. Além disso, por ser formada pela ação de diferentes espécies reativas e tem sido utilizada como um

biomarcador de estresse oxidativo (KASAI *et al.*, 1986; FLOYD, 1990). Foi mostrado que essa lesão pode ser formada diretamente pela reação do $^1\text{O}_2$ com a guanina no DNA nuclear de células tratadas com o endoperóxido derivado de naftaleno marcado com oxigênio-18 (RAVANAT *et al.*, 2000). Estudos comprovam a existência de outras modificações de bases quando o DNA ou nucleotídeos isolados reagem com espécies oxidativas, entre estas, formamidopirimidina (FapydG), 2,2,4-triaminooxazolona (dZ), imidazolona (dIz) e espiroiminodihidantoina (dSp) (CADET *et al.*, 1997; MARNETT, 2000; FLOYD *et al.*, 1986; SCHNEIDER *et al.*, 1990, BOITEUX *et al.*, 1992; EPE *et al.*, 1996; WOOD *et al.*, 1990).

Além das modificações de bases, outros danos como quebras na fita do DNA e ligação cruzada proteína-DNA (GODAR *et al.*, 1993; CADET *et al.*, 1997) podem também causar sérias implicações na estabilidade do sistema biológico.

Para prevenir as conseqüências deletérias dos danos oxidativos ao DNA para a integridade do genoma, as células eucarióticas e procarióticas possuem mecanismos específicos de defesa (MICHAELS *et al.*, 1992, KROKAN *et al.*, 1997; LINDHAL *et al.*, 1999; BOITEUX *et al.*, 1990; SCHULZ *et al.*, 2000). Dentre estes, destaca-se a remoção enzimática das ROS, a sanitização do “pool” de nucleotídeos lesados e não incorporados na fita do DNA, o reparo pela excisão de bases ou nucleotídeos do DNA nuclear e mitocondrial (SLUPPHAUG *et al.*, 2003; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Em bactérias, a remoção das modificações oxidativas da guanina é iniciada pela proteína Fpg, uma endonuclease que reconhece 8-oxodG e FapydG, além de sítios abásicos e muitas outras lesões (BOITEUX *et al.*, 2000; SCHULZ *et al.*, 2000; KARAKAYA *et al.*, 1997 e TCHOU, 1994). Nas células eucarióticas, 8-oxodG e FapydG são reconhecidas pela proteína Ogg1 (VAN DER KEMP *et al.*, 1996).

2.3 MELANOMA

A radiação UV está associada ao desenvolvimento de tumores cutâneos, particularmente o carcinoma celular escamoso, o carcinoma basocelular e o melanoma

(PERLIS & HERLYN, 2004). O DNA é a biomolécula mais afetada pela radiação UV, pois o comprimento de onda fortemente absorvido por esta molécula situa-se nessa faixa. Estudos mostram que há grande probabilidade das alterações no DNA estarem envolvidas no desenvolvimento de melanoma (MARROT *et al.*, 1999).

Embora, o melanoma de pele é menos freqüente do que os outros tumores de pele (basocelulares e de células escamosas) sua letalidade é mais elevada (INCA, 2006), pois é um câncer agressivo, devido a sua alta possibilidade de formação de metástases (FOUNDATION SKIN CANCER, 2006). Ele tem sua origem nos melanócitos, quando estes se tornam malignos. Os melanócitos produzem a melanina, substância que determina a cor da pele, a qual é atribuído um papel protetor contra os efeitos nocivos da radiação UV, tendo em vista que este pigmento absorve esta radiação (MOAN *et al.*, 1999; SEATLOW *et al.*, 1993; KORYTOWISK *et al.*, 1987; NOFSINGER *et al.*, 2002; BUSTAMENTE *et al.*, 1991; PERLIS & HERLYN, 2004; INCA, 2006). Porém, outros estudos sugerem que a radiação absorvida pela melanina nos melanócitos possa gerar produtos que levem ao processo carcinogênico (MOAN *et al.*, 1999; SEATLOW *et al.*, 1993).

Células cancerosas apresentam um descontrole na proliferação celular e disfunção da regulação metabólica (PELICANO *et al.*, 2004). ROS e RNS afetam vias de transdução de sinais, podem induzir a morte celular (SIMON *et al.*, 2000) e alterar a comunicação célula-célula, além de promoverem mutações no DNA (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Podendo então, participar de maneira considerável nessa doença.

Existem quatro categorias básicas de melanoma: melanoma disseminativo superficial, melanoma lentiginoso maligno, melanoma acrolentiginoso e melanoma nodular. As três primeiras categorias de melanoma crescem em primeira instância, superficialmente ao longo do tempo, onde o poder de cura por excisão cirúrgica é grande, depois penetra com mais profundidade. A última categoria é a forma mais invasiva que sofre metástases precoces (SOBER & KHO, 1995; LOTZE *et al.*, 2001; FOUNDATION SKIN CANCER, 2006).

Os fatores e processos biológicos que levam ao desenvolvimento do melanoma são objetos de estudo importantes para a compreensão e elaboração de tratamentos eficazes contra este câncer.

Além da excisão cirúrgica, existem outros tipos de tratamentos para cânceres de pele, como a terapia fotodinâmica (PDT). Esta terapia utiliza a interação de um agente fotossensibilizador, como porfirinas ou ftalocianinas, luz com comprimento de onda adequado e oxigênio molecular, levando à produção de agentes letais que inativam as células tumorais. Um desses agentes é o $^1\text{O}_2$, responsável pela atividade fotobiológica (BONNETT, 1995; KOLAROVA *et al.*, 2007). A PDT atua em carcinomas de pele e outros tipos de câncer, porém em melanoma metastático sua ação é pouco efetiva. Neste último caso a quimioterapia, bioquimioterapia, radioterapia, adjuvantes imunes, vacinas, citocinas e combinações imuno-estimulantes específicas também são usados, mas a resposta desses tratamentos ainda é insatisfatória (TARHINI & AGARWALA, 2005; KASPER *et al.*, 2007). Novas estratégias terapêuticas baseadas no âmbito molecular estão sendo desenvolvidas, utilizando drogas anti-angiogênicas e imunomoduladoras, terapia antisense Bcl-2, moduladores de proteínas de choque térmico, inibição citotóxica do linfócito T associado à proteína 4 (CTLA-4), anticorpo monoclonal, inibição da poly(ADP-ribose) polimerase (PARP) e inibidores de proteassoma (PIRO, 2004; BAMIAS & DIMOPOULOS, 2005; RIBAS *et al.*, 2005; RIVOLTINI *et al.*, 2003, TENTORI *et al.*, 2005, MARKOVIC, 2005)

São utilizados vários modelos de estudo do melanoma, entre eles estão animais como: camundongos e peixes para os tratamentos *in vivo* (MARROT *et al.*, 1999) e células cultivadas de melanoma murino como B16-F10, Cloudman S91/M3, K1735 e suas várias sublinhagens para tratamentos *in vitro* (JOHNSTON *et al.*, 1992; PETER *et al.*, 2001). Células originadas de melanomas humanos também são importantes fontes para o estudo de melanoma, como por exemplo, SK-MEL e MEWO.

2.4 MELANINA E ROS

A melanina, um pigmento encontrado em muitos organismos e tecidos, pode ser sintetizada pelos melanócitos a partir do processo de oxidação do aminoácido L-tirosina (SEALY *et al.*, 1980). Os melanócitos produzem dois tipos principais de melanina, a eumelanina, a qual se apresenta na cor preta ou marrom e a feomelanina, de cor vermelha ou amarela (HOOGDUIJN *et al.*, 2004; ITO & WAKAMATSU, 2003). A eumelanina tem sido associada com a fotoproteção, enquanto que a feomelanina parece contribuir para carcinogênese de pele, pela produção de radicais livres (NIEUWPOORT *et al.*, 2004 e RANADIVE & MENON, 1986).

Ambas, eumelanina e feomelanina derivam do precursor comum dopaquinona que é formada pela oxidação da L-tirosina sob ação da enzima tirosinase. A dopaquinona é um intermediário altamente reativo e na ausência de compostos tióis sofre ciclização intramolecular, levando eventualmente à produção de eumelanina (FIGURA 2). Entretanto, a presença de tióis, como cisteína, leva à geração de cisteinil-DOPAs, e finalmente à feomelanina (FIGURA 3). (ITO *et al.*, 2000).

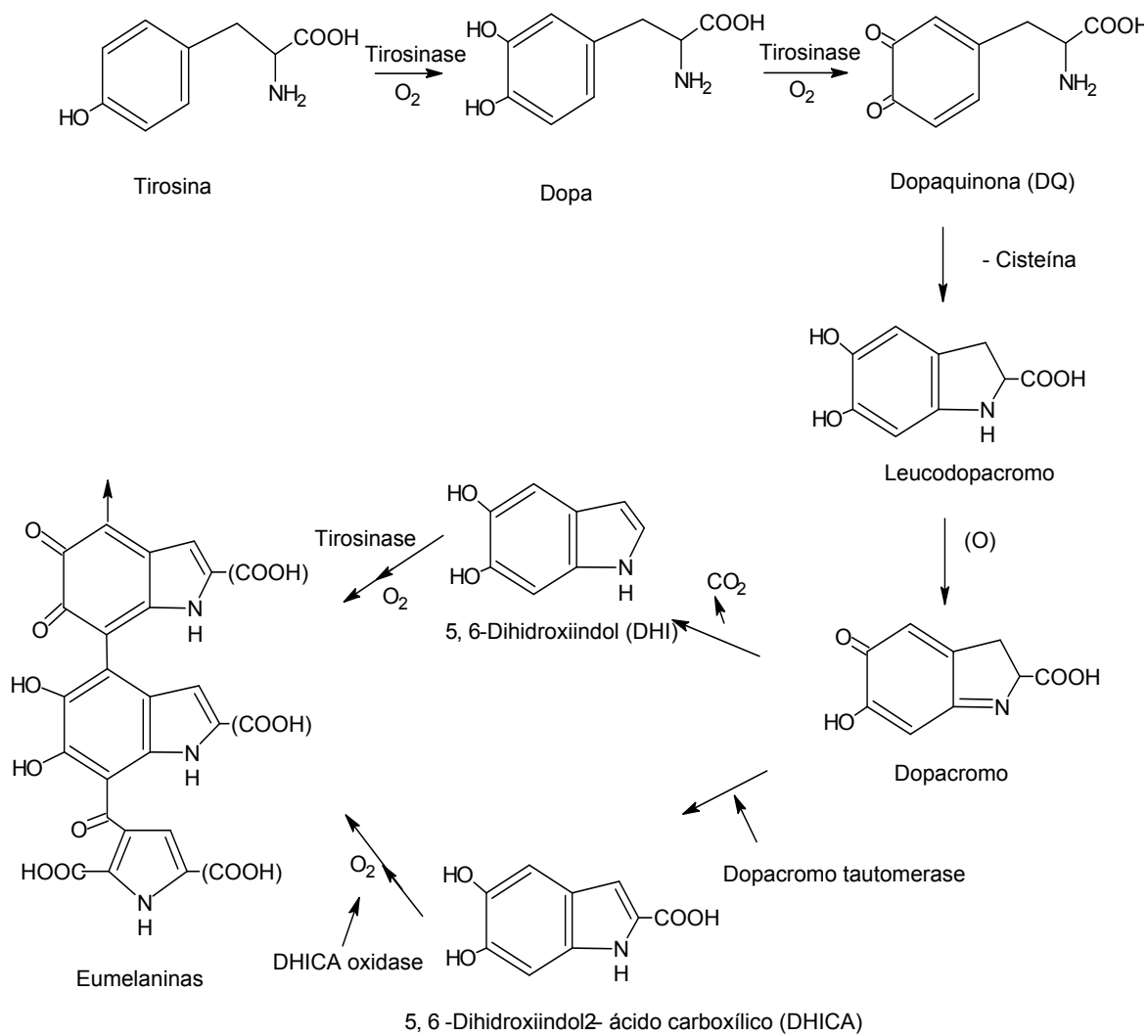
A eumelanina e feomelanina também podem ter sua síntese aumentada através do estímulo do receptor-1 da melanocortina (MC1R) pelo hormônio estimulante de melanócitos (α -MSH), via ativação da adenilato ciclase (RANADIVE & MENON, 1986).

O α -MSH controla diversas funções como a pigmentação em mamíferos, através da indução de diferenciação de melanócitos, a proliferação destes, síntese de melanina e produção de citocinas (DEXTER & BENNETT, 1987; KAMEYAMA *et al.*, 1988; ABDEL-MALEK, 1998; REES & HEALY, 1997; CATANIA & LIPTON, 1993 e WIKBERG *et al.*, 2000).

Quando a pele é submetida à radiação UV, a síntese de diversos fatores epidérmicos é estimulada, um desses fatores é o α -MSH e a produção de ACTH (hormônio adrenocorticotrópico) (ROUZAUD *et al.*, 2005). O α -MSH age como um regulador parácrino, mediando os efeitos da radiação UV, estimulando a melanogênese, proliferação e sobrevivência dos melanócitos (IMOKAWA *et al.*, 1992;

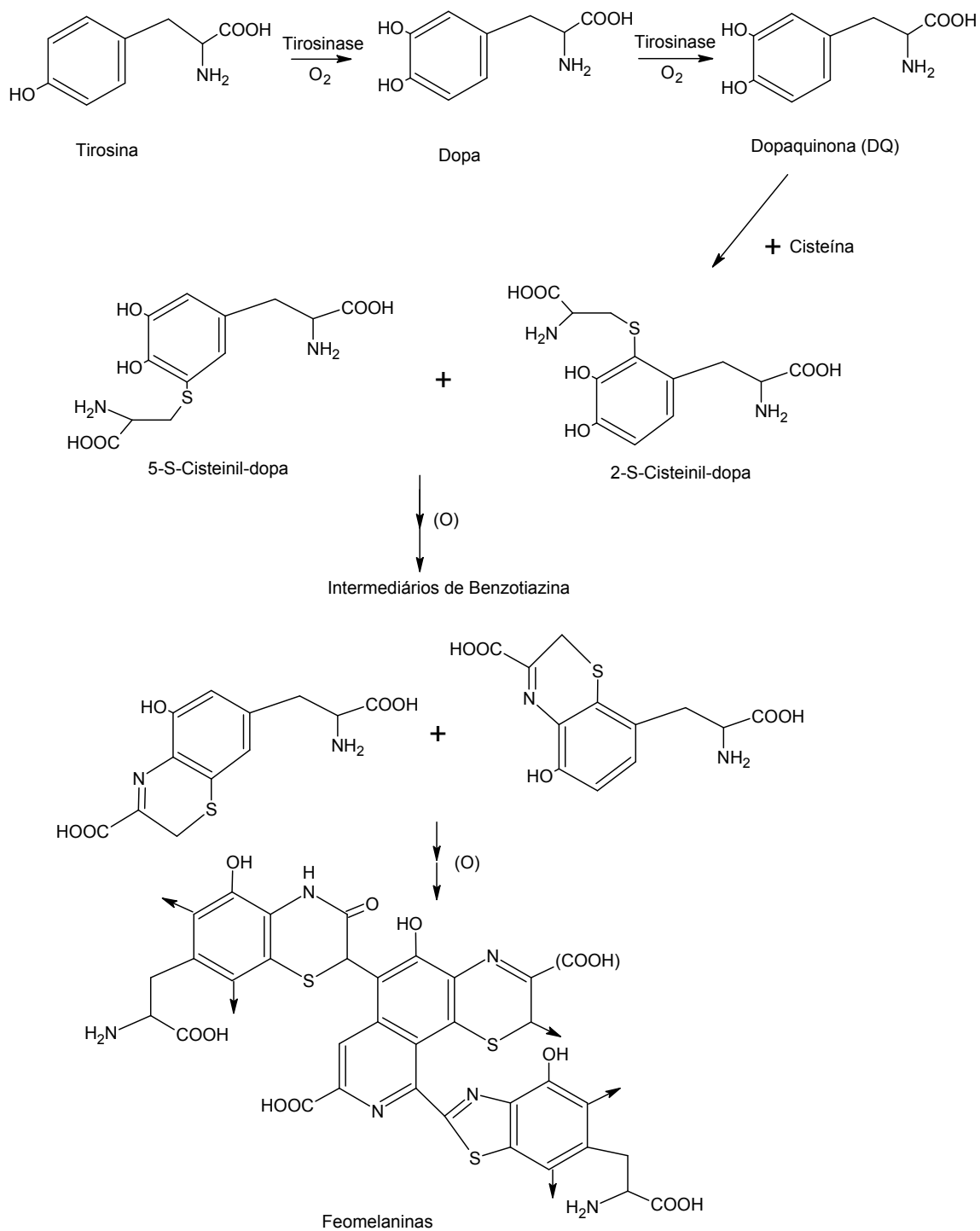
HALABAN *et al.*, 1988). Estudos mostram que o α -MSH bloqueia a apoptose induzida pela radiação UVB de melanócitos humanos normais *in vitro*, bem como acelera a remoção das lesões no DNA induzida por essa radiação (BOHM *et al.*, 2005).

FIGURA 2 - BIOSÍNTESE DA EUMELANINA



FONTE: Adaptado de ITO (1998).

FIGURA 3 - BIOSÍNTESE DA FEOMELANINA



FONTE: Adaptado de ITO (1998).

Uma das funções atribuídas à melanina é sua capacidade de fotoproteção dada pela absorção da radiação UV e remoção de radicais livres (BOULTON *et al.*, 2001; SARNA, 1992; ROZANOWSKA *et al.*, 1999 e KORYTOWSKI *et al.*, 1986). Porém, há estudos que mostraram seu papel fototóxico, devido à produção de H_2O_2 e $\cdot OH$ quando irradiada com luz UV (BOULTON *et al.*, 2001; SARNA *et al.*, 2003; ROZANOWSKA *et al.*, 2002; DAYHAW-BARKER *et al.*, 2001; KORYTOWSKI *et al.*, 1990; BOULTON *et al.*, 1990; KALYANARAMAN *et al.*, 1988 e ROZANOWSKA *et al.*, 1997).

Os anéis aromáticos do cromóforo de melanina são excitados para o estado singlete, decaindo para o triplete, transferindo um elétron para o oxigênio produzindo $O_2^{\bullet -}$ (CHEDEKEL *et al.*, 1978). Este reagindo com Fe(III) e peróxido de hidrogênio leva à formação do $\cdot OH$ (HILL, 1992). Algumas evidências indicam que a melanina transfere energia ao oxigênio molecular formando 1O_2 (TAKEUCHI *et al.*, 2004).

Além de possuir um potencial para fotoproteção (quando a melanina absorve e espalha a radiação UV e capta radicais livres) e para fototoxicidade (produção de ROS) (KOWALCZUK *et al.*, 2001), a melanina segundo HOOGDUIJN *et al.* (2003), também estaria envolvida na regulação da homeostase do Ca^{2+} nos melanócitos e na epiderme, uma vez que é considerada como um reservatório de Ca^{2+} . Há evidências que, extracelularmente, baixas concentrações desse cátion estimulariam a proliferação de melanócitos. O Ca^{2+} também possuiria efeito inibitório na produção de melanina quando sua concentração aumenta intracelularmente, modulando assim o processo melanogênico (HOOGDUIJN *et al.*, 2003).

Foi proposto que a melanina protege contra ROS através dos efeitos diretos na homeostase do Ca^{2+} , uma vez que a eumelanina possui alta capacidade de se ligar a esse cátion. Esse efeito foi demonstrado pela diminuição de danos ao DNA causado por H_2O_2 quando na presença de melanina ou de BAPTA, um conhecido quelante de Ca^{2+} (HOOGDUIJN *et al.*, 2004).

Pelo fato da melanina apresentar um caráter contraditório no papel de proteção à pele, muitos estudos estão sendo realizados com a finalidade de esclarecer melhor essa questão.

2.5 APOPTOSE E $^1\text{O}_2$

Em um organismo, as células podem se multiplicar ou morrer, dependendo da situação que elas se encontram. Quando as células não são mais necessárias ou estão em condições patológicas, os mecanismos de morte celular programada ou apoptose são acionados.

A apoptose, que é um processo imprescindível durante o desenvolvimento normal do organismo (POURZAND & TYRRELL, 1999), difere morfológica, bioquímica e molecularmente da necrose (VERMES *et al.*, 2000). A necrose provoca uma resposta inflamatória, pois quando ocorre, a célula arrebenta liberando para o meio seus componentes. Já a morte celular por apoptose acontece de maneira ordenada, onde as células vizinhas não são prejudicadas (ALBERTS *et al.*, 2000).

Os aspectos morfológicos da apoptose são: estrangulamento da membrana plasmática sem perda de integridade, condensação da cromatina e fragmentação do DNA nuclear, diminuição do volume celular e formação de vesículas com membrana (corpos apoptóticos), sem desintegração das organelas (KERR *et al.*, 1972; WYLLIE, 1980; SAVILL & FADOK, 2000).

Fatores de crescimento, hormônios, citocinas, contato célula-célula, interações célula-matriz (ROSS *et al.*, 2006) e radiação UV (WANG *et al.*, 1998) são fatores que podem influenciar a ocorrência da apoptose (VERMES *et al.*, 2000). Anormalidades nos sinalizadores que induzem a morte celular, nos receptores de membrana ou citoplasmáticos e alterações nos genes que coordenam a apoptose, estão envolvidas na patogênese de muitas doenças (THOMPSON, 1995; HAANEN & VERMES, 1996).

O mecanismo da apoptose está associado com a ativação de uma família de proteases dependentes de cisteína, as caspases (ZHUANG *et al.*, 1999; POURZAND & TYRRELL, 1999). As caspases são encontradas, nas células, como precursores

inativos, os quais são geralmente ativados cataliticamente por outras caspases (ZHUANG *et al.*, 1999) (FIGURA 4).

Há duas vias de estímulo para a apoptose: uma inicia-se fora da célula, onde a proteína ligante Fas-L se liga no receptor membro da família de receptores TNF (FAS) na superfície da célula, desencadeando a ativação, primeiramente, das caspases 8 e 10 seguida das caspases 3, 6 e 7; a outra via inicia-se dentro da célula, em que a mitocôndria seria o principal veículo para o desencadear da cascata de caspases (FIGURA 4) (ANDRAIN & MARTIN, 2001; ALBERTS *et al.*, 2000; POURZAND & TYRRELL, 1999). Esta última acontece quando as células estão em estresse, podendo ser sinalizada por proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (bid, bax e bak), por ROS e por cátions divalentes (ESTERBAUER *et al.*, 1991).

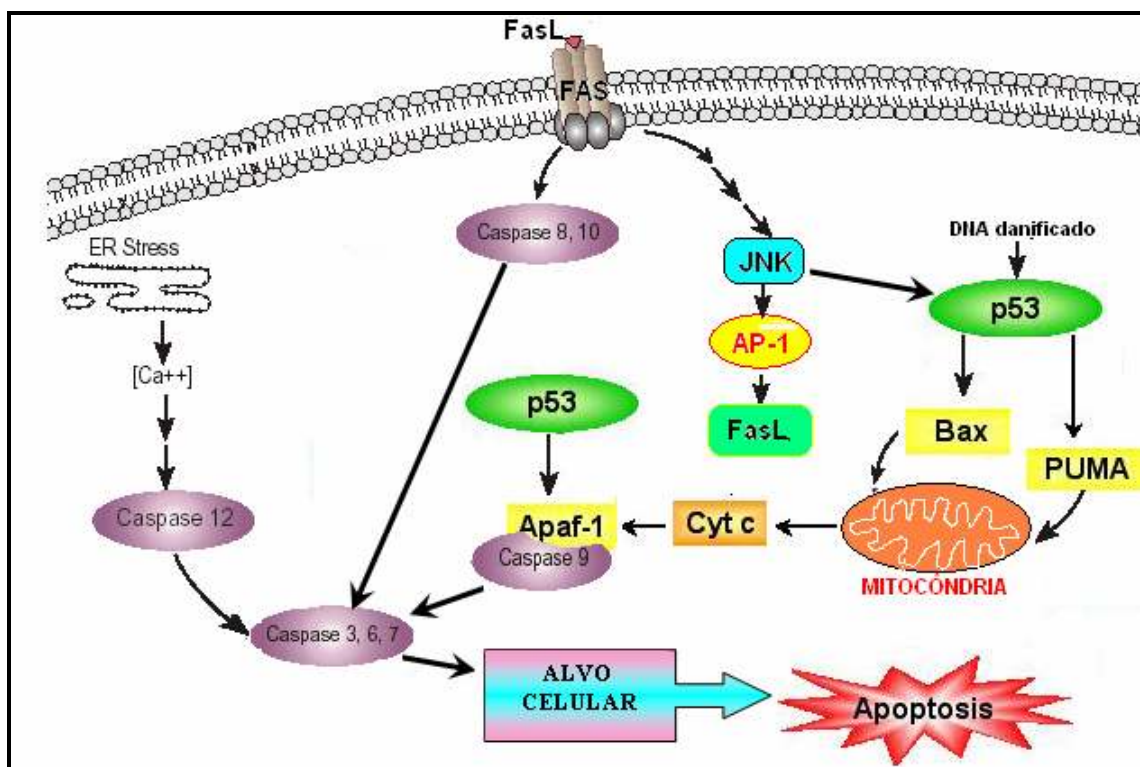
Estudos mostram que as mitocôndrias são susceptíveis a danos induzidos por ROS, como: peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e mutações no DNA mitocondrial (LENAZ, 1998). O principal efeito do estresse oxidativo causado por ROS na função mitocondrial é a ativação da transição da permeabilidade mitocondrial (MPT) um fenômeno que contribui para a liberação do citocromo *c*, o qual forma um complexo com o fator ativador da protease-1 apoptótica (Apaf-1) ativando a caspase-9, seguida das caspases 3, 6 e 7 que resultarão na resposta apoptótica (FIGURA 4) (MARCHETTI *et al.*, 1997; GREEN e REED, 1998 e HENGARTNER, 2000).

Os danos causados ao DNA podem levar a regulação de certos produtos gênicos, os quais estão envolvidos no processo de apoptose, onde o gene supressor de tumor p53 desempenha um papel importante, como por exemplo, a indução da ativação transcricional do receptor de morte FAS e das proteínas pró-apoptóticas, *p53-upregulated modulator of apoptosis* (PUMA) e Bcl-2 associada à proteína x (Bax) (LIU *et al.*, 2005 e CHRISTOPHOROU *et al.*, 2006). Quando ocorre o estresse genotóxico o sinalizante c-Jun N-terminal Kinase (JNK) é ativado, o qual regula a atividade transcricional do ativador da proteína-1 (AP-1) que aumenta a expressão de Fas-L (KASIBHATLA *et al.*, 1998). Estudos recentes demonstraram que células deficientes em p53 apresentaram morte celular por necrose, indicando que danos alquilantes ao DNA poderiam induzir a morte celular por rotas independentes de p53.

A necrose é determinada pela indução da proteína de reparo do DNA a PARP quando as células sofrem uma rápida depleção de ATP (ZONG *et al.*, 2004 e HUR *et al.*, 2006).

A apoptose induzida por ROS é bastante investigada, pois, segundo alguns autores, este fenômeno poderia auxiliar em terapias contra o câncer (BOURRÉ *et al.*, 2002; COSSO *et al.*, 2002). ZHUANG *et al.* (1999) sugerem que a apoptose induzida pelo $^1\text{O}_2$ é mediada pela ativação da cascata de caspases e liberação do citocromo *c*. Este processo seria favorecido pela MPT gerada pela oxidação de grupos tióis de proteínas de membrana pelo $^1\text{O}_2$ (DEVASAGAYAM *et al.*, 1991). Porém, estudos recentes mostram que o $^1\text{O}_2$ pode modificar oxidativamente o citocromo *c*, inibindo sua atividade pró-apoptótica, suprimindo a cascata de caspases (SUTO *et al.*, 2005). Otsu e colaboradores investigaram o efeito do $^1\text{O}_2$ intracelular gerado por endoperóxidos em células HepG2 e RBL, constatando morte celular atípica, onde o $^1\text{O}_2$ inibe as atividades das caspases 9 e 3, suprimindo a cascata de caspases. Assim, eles sugerem que o caminho apoptótico induzido pelo $^1\text{O}_2$ ocorre por outra via ainda não determinada (OTSU *et al.*, 2005).

FIGURA 4 – MECANISMO DA APOPTOSE



O mecanismo da apoptose é complexo, onde muitas espécies podem estar comprometidas, dentre elas o Fas-L (proteína ligante Fas-L), FAS (receptor membro da família de receptores TNF), JNK (c-Jun N-terminal Kinase), AP-1 (ativador da proteína-1), p53 (gene supressor de tumor proteína 53), Bax (Bcl-2 associada à proteína x), PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis), Cyt c (citocromo c), Apaf-1 (fator ativador da protease-1 apoptótica).

FONTE: Adaptado de www.bioagency.com.br

3. JUSTIFICATIVAS

A radiação UV representa um dos principais agentes envolvidos na produção de ROS, entre eles o $^1\text{O}_2$. Considerando a complexidade dos efeitos moleculares causados por ROS nos sistemas celulares, o estudo de lesões em biomoléculas utilizando sistemas mais puros, sem a formação de subprodutos, pode fornecer informações que contribuam para uma melhor compreensão dos efeitos biológicos observados. Nesse aspecto, o papel da melanina, frente à radiação UV, como fotoprotetora ainda não é bem compreendido dado à quantidade de informações contraditórias na literatura. Desta forma, um dos objetivos desse estudo foi a compreensão do mecanismo pelo qual a melanina se comporta frente a ROS, o que pode contribuir para o entendimento do seu papel no melanoma. Logo, o efeito da melanina foi avaliado tanto em células produtoras do pigmento como naquelas não produtoras, sob tratamento com $^1\text{O}_2$. Para a geração dessa espécie reativa é conveniente a utilização de sistemas limpos, como a termólise de endoperóxidos derivados de naftaleno. Essa fonte química de $^1\text{O}_2$ apresenta um caráter hidrofílico pela presença das hidroxilas nos substituintes do naftaleno, sua solubilidade independe do pH do meio e ainda se mostra permeável às membranas celulares. Estas características permitem a geração de $^1\text{O}_2$ no meio intracelular, contribuindo para a verificação de seus efeitos no sistema celular. Os parâmetros de análise incluíram a determinação dos danos causados ao DNA detectados por análises de HPLC da 8-oxodG e a correlação com a quantidade de melanina produzida em células. Além disso, foi investigada a citotoxicidade e alterações morfológicas promovidas pelo $^1\text{O}_2$ em células produtoras de melanina (B16-F10 e SK-MEL) e não produtoras de melanina (BHK-21).

Os efeitos biológicos relacionados ao acúmulo de lesões podem levar a um quadro patológico. Sendo assim, a determinação dos danos em biomoléculas e das condições de morte celular pode propiciar uma melhor compreensão desses efeitos.

4. OBJETIVOS

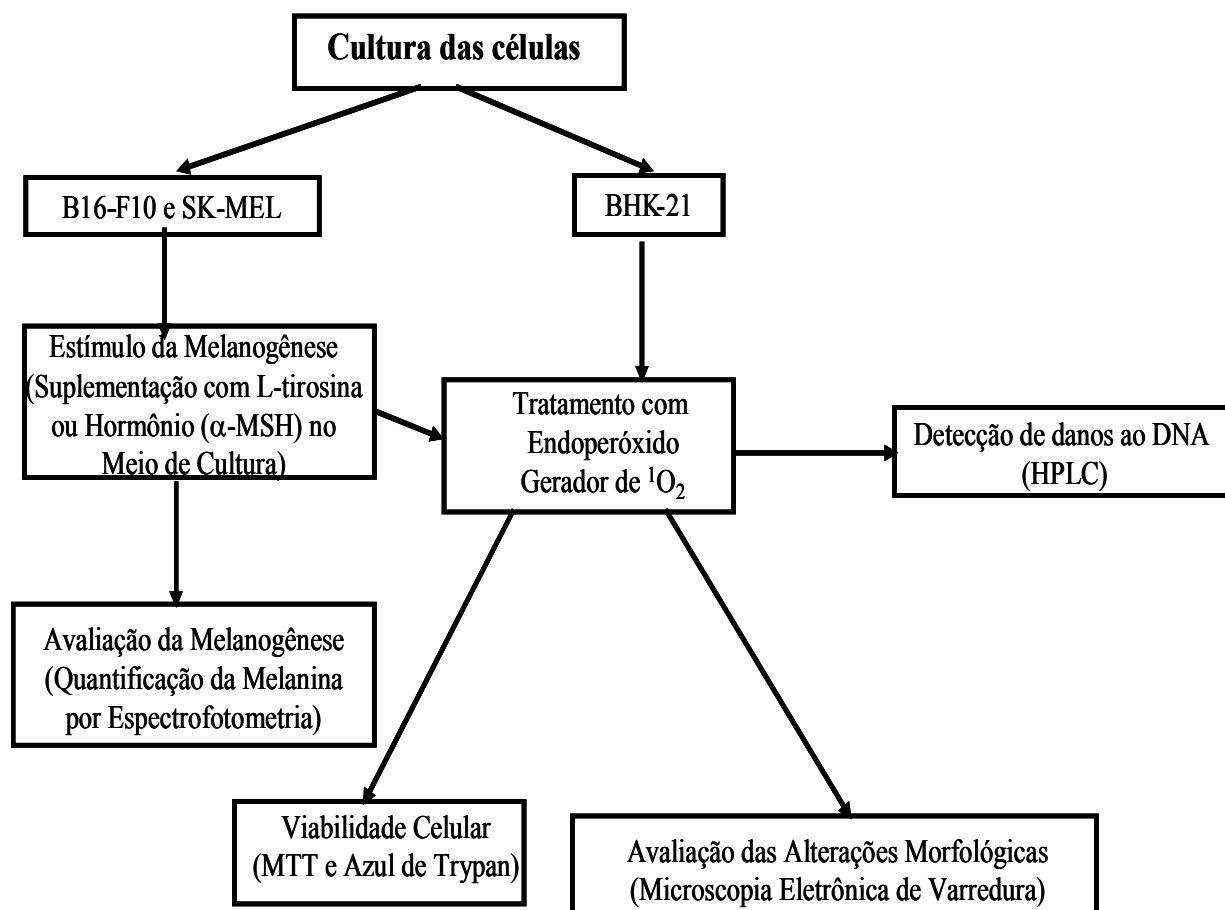
Considerando que melanócitos expostos à radiação UVA, e conseqüentemente a $^1\text{O}_2$ podem sofrer transformação maligna e, que células de melanoma apresentam alta resistência aos tratamentos de fototerapia que geram $^1\text{O}_2$, o objetivo geral desse estudo foi avaliar o efeito da melanina em células sob tratamento com $^1\text{O}_2$, buscando contribuir para um melhor entendimento da função da melanina nessa condição.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos visaram particularmente:

- Estabelecer as melhores condições de estímulo da melanogênese com a utilização de L-tirosina ou α -MSH;
- Avaliar a viabilidade celular das células produtoras de melanina tratadas com $^1\text{O}_2$ em relação à linhagem não produtora de melanina;
- Avaliar se a quantidade de melanina presente nas células produtoras de melanina poderia influenciar na viabilidade celular quando tratadas com $^1\text{O}_2$ (DHPNO₂);
- Determinar se a quantidade de melanina poderia interferir na formação dos danos ao DNA pela avaliação dos níveis da lesão 8-oxodG quando as células são tratadas com $^1\text{O}_2$ (DHPNO₂);
- Investigar alterações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura das células tratadas com $^1\text{O}_2$ e L-tirosina.

5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 GERADOR DE OXIGÊNIO SINGLETE

6.1.1 Síntese do endoperóxido da *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanamida (DHPNO₂)

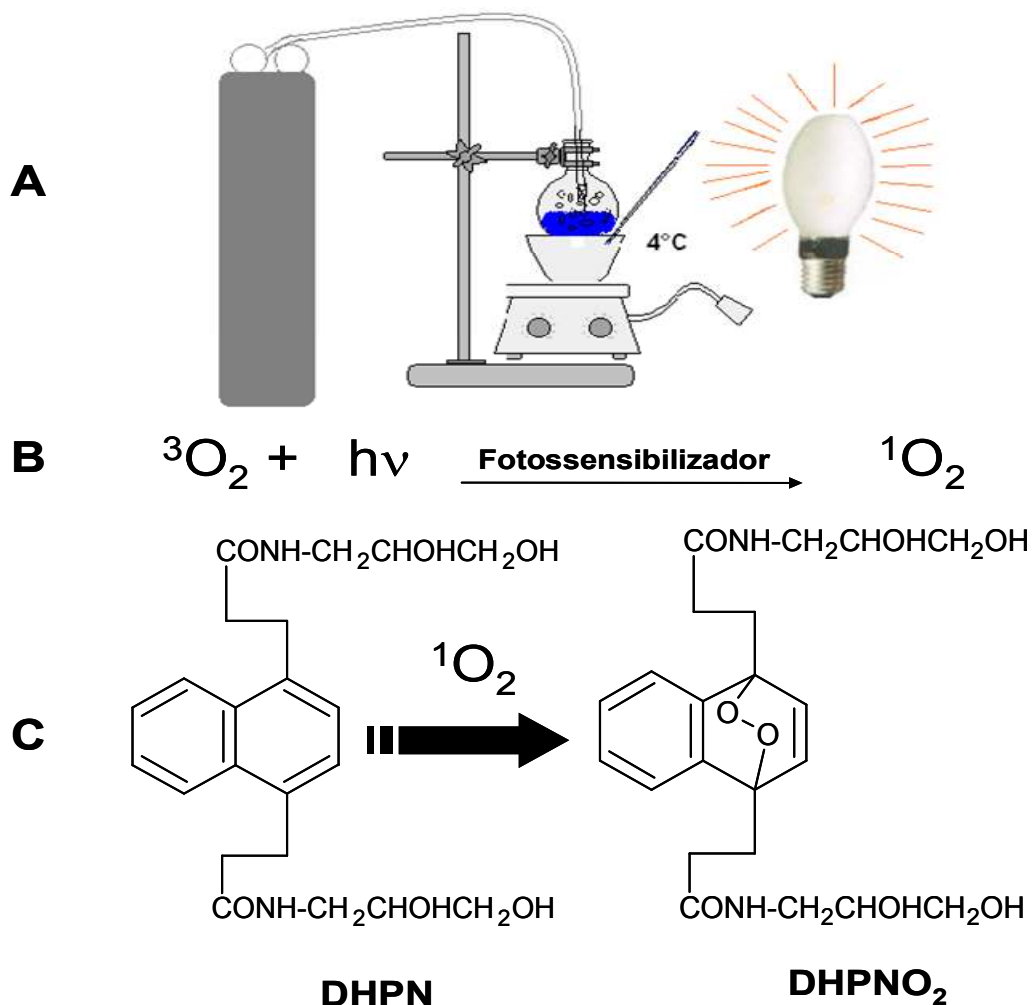
A síntese do endoperóxido gerador de ¹O₂ foi feita como descrito por MARTINEZ *et al.*, 2000c; PIERLOT *et al.*, 2000; MARTINEZ *et al.*, 2000b; DEWILDE *et al.*, 1998 e DI MASCIO e SIES, 1989.

A geração de ¹O₂ foi realizada por fotossensibilização utilizando azul de metileno sob irradiação com luz visível.

O DHPN (200 mg) foi dissolvido em 2 mL de água deuterada num frasco isolado termicamente em banho a 4°C. Foram adicionados 65 µL da solução de azul de metileno (10 mmol/L) e a solução foi irradiada com uma lâmpada de Hg (500 W) sob borbulho de oxigênio (O₂) constante por 5 h (FIGURA 5). Após esse tempo, 200 mg de resina Chelex® 100 foram acrescentados à solução, sob agitação, por 20 min a 4°C, para fixar o azul de metileno. A solução foi filtrada em membrana polimérica de acetato-nitrato de celulose com poro de 0,45 µm (Millipore ®) e foi armazenada em nitrogênio líquido.

O esquema da geração do DHPNO₂ e a rota resumida da síntese desse composto estão mostrados na figura 5.

Após o processo de síntese, a concentração do endoperóxido foi determinada, bem como seu rendimento. Amostras diluídas 1000x das soluções do endoperóxido, tiveram suas absorbâncias determinadas em 288 nm no tempo zero (t₀), e após incubação de 1h e 30 min a 60°C (t_f). A concentração e pureza foram determinadas considerando o ϵ (DHPNO₂) = 140 M⁻¹ cm.⁻¹ e ϵ (DHPN) = 7780 M⁻¹ cm.⁻¹

FIGURA 5 - ROTA DE SÍNTESE DO DHPNO₂

(A) Esquema experimental da síntese do DHPNO₂. (B) Reação da geração do ¹O₂ por fotossensibilização com azul de metileno. (C) Reação do DHPN com ¹O₂.

6.2 PROCEDIMENTOS DE CULTIVO CELULAR

6.2.1 Esterilização dos Materiais

Todo material de vidro utilizado para os procedimentos de cultivo de células (frascos de vidro para soluções, frascos de descarte, lamínulas, equipamento para filtração sob pressão, rolhas, tampas, pipetas de vidro, microtubos e ponteiras de pipetas automáticas foram esterilizados em autoclave (Fanem) a 120°C, durante 30

min, sob pressão de 1 atm. Após a esterilização, o material foi levado para secagem em estufa Fanem (São Paulo, Brasil, Modelo Orion 505) a 50 °C.

6.2.2 Soluções-Tampão e Meios de Cultura

6.2.2.1 Solução Salina Tamponada (PBS)

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

6.2.2.2 Solução de Tripsina-EDTA

A solução de tripsina-EDTA era constituída de 137 mmol/L de NaCl, 5,4 mmol/L de KCl, 5 mmol/L de glucose, 0,42 mmol/L de Na₂HPO₄, 0,44 mmol/L de KH₂PO₄, 2,3 mmol/L de NaHCO₃, 0,53 mmol/L de EDTA, 50 mg% de tripsina (1:250), sendo o pH ajustado para 7,4. A solução foi esterilizada por filtração a vácuo em câmara de fluxo laminar vertical (VECO) e armazenada a -20°C.

6.2.2.3 Solução Balanceada de Hanks (HBSS)

A solução balanceada de Hanks (HBSS) era constituída da mistura das soluções A e B, as quais foram preparadas como soluções estoque (concentradas 20x) e armazenadas a 4°C. A solução A era constituída 2,73 mol/L de NaCl, 107 mmol/L de KCl, 25 mmol/L de CaCl₂ e 27 mmol/L de MgSO₄.7H₂O. A solução B era constituída por 8,5 mmol/L de Na₂HPO₄ e 111 mmol/L de glucose. As duas soluções foram preparadas em água deionizada em volume de 50 mL e armazenadas a 4°C. Para o uso, as soluções A e B foram misturadas (1:1), diluídas com água deionizada e o pH foi ajustado para 7,4. A solução de Hanks foi esterilizada por filtração em membrana estéril com poro de 0,22 µm (Millipore®) em câmara de fluxo laminar vertical.

6.2.2.4 Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados neste trabalho foram meio essencial mínimo de Eagle (MEM, Cultilab, Campinas, Brasil) e RPMI 1640 (Cultilab), reconstituídos em água deionizada e esterilizados por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poro de 0,22 μm (Millipore®) sob pressão em aparelho Sartorius. Após o procedimento de filtração, alíquotas dos meios foram deixadas em estufa a 37°C, para acompanhamento do aparecimento de eventuais contaminantes. Os meios foram mantidos congelados ou em geladeira a 4°C. Para os experimentos, os meios foram suplementados com quantidade adequada de soro fetal bovino estéril (SFB, Cultilab), previamente inativado a 56°C em banho-maria por 30 min. O pH do meio foi ajustado com quantidades adequadas de solução de NaHCO₃ esterilizado em autoclave a 120°C e 1 atm por 30 min, e para o tamponamento do meio em pH 7,4 foi utilizado HEPES (pH 7,0) esterilizado por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 μm (Millipore®).

6.2.3 Linhagens celulares

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens B16-F10 de melanoma murino e SK-MEL de melanoma humano, cedidas pelo Prof. Dr. Ricardo R. Brentani do Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer - São Paulo. A linhagem BHK-21 de fibroblastos de camundongo foi adquirida do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

6.2.3.1 Condições de cultivo

In vitro, as células B16-F10, SK-MEL e BHK-21 se desenvolvem em monocamadas e são cultivadas em garrafas estéreis Techno Plastic Products (TPP) com meio de cultura, acrescido de SFB, 20 mmol/L de HEPES e 8 mmol/L NaHCO₃ para ajustar o pH em 7,4. As linhagens B16-F10 e BHK-21 foram cultivadas em MEM contendo 7,5% SFB e 0,125% do antibiótico gentamicina. A linhagem SK-MEL foi cultivada em RPMI 1640 contendo 15% SFB, sem a adição de antibióticos. As culturas foram mantidas em estufa (Sanyo) sob atmosfera contendo 5% de CO₂ a

temperatura constante de 37°C. Os repiques foram realizados semanalmente seguindo a rotina do laboratório, utilizando para descolar as células, solução de tripsina-EDTA para as linhagens B16-F10 e BHK-21 e para a linhagem SK-MEL apenas a solução de EDTA (2 mmol/L) em PBS. Para armazenamento das linhagens, as células (10^7 /mL) foram suspensas em meio de cultura, acrescido de soro fetal bovino 40% (v/v) e DMSO 10% (v/v), e congeladas inicialmente a -70°C, e a seguir em nitrogênio líquido.

6.3 AVALIAÇÃO DA MELANOGÊNESE

6.3.1 Otimização das concentrações de L-tirosina e α -MSH

Células produtoras de melanina (1×10^5 células) das linhagens B16-F10 e SK-MEL foram plaqueadas em placas de 6 poços (35 mm de diâmetro) e incubadas por 24 h em estufa sob atmosfera a 5% de CO₂ a 37°C e posteriormente tratadas com L-tirosina e/ou α -MSH nas seguintes concentrações: L-tirosina – (B16-F10) 0,25 (concentração basal do meio MEM, em triplicatas), 0,5 e 1 mmol/L ; (SK-MEL) 0,11 (concentração basal do meio RPMI, em quadriplicatas), 0,22 e 0,44 mmol/L. α -MSH: (B16-F10, em triplicatas) 10, 20 e 30 nmol/L. Após a adição dos estimulantes da melanogênese em meio com 7,5% de soro ou sem soro, as células foram incubadas por 48 h, nas mesmas condições descritas anteriormente. Após esse período, o meio foi retirado e as células foram ressuspensas em solução de EDTA (2 mmol/L) em PBS e a suspensão transferida para microtubo. As células foram contadas em câmara de Neubauer e centrifugadas a 400g por 15 min (centrífuga da Sanyo Micro Centaur, modelo MSE BS 4402), descartando-se o sobrenadante. A fração de células foi utilizada para a determinação da quantidade de melanina.

6.3.2 Quantificação de melanina pela absorbância no visível

Este método foi modificado de ABDEL-NASER *et al.* (2003). Após o ensaio para o estímulo da melanogênese (item 6.3.1), ao *pellet* resultante foram adicionados 800 μ L de NaOH (1 mol/L) incubando-se a 100°C por 1h. Após esse tempo, a

quantidade de melanina foi avaliada espectrofotometricamente a 470 nm, em espectrofotômetro Hitachi, modelo U – 2001UV/VIS.

6.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

6.4.1 Método do Azul de Trypan

Este método utiliza como princípio a exclusão do corante vital Azul de Trypan (PHILLIPS, 1973). Após crescimento celular de 24 h em placas de 6 poços (1×10^5 células) em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂, as células produtoras de melanina (B16-F10 e SK-MEL) e não produtoras de melanina (BHK-21) tiveram seus meios substituídos por outro com ou sem estimulante da melanogênese (L-tirosina e/ou α -MSH) sem a adição de SFB por um período de 48 h mantidas na estufa. A seguir, o meio foi trocado por um meio novo (controle) e adicionou-se DHPN (1,0 mmol/L) ou DHPNO₂ (0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 mmol/L), incubando por 2 h a 37°C em estufa com 5% CO₂. As células foram descoladas das placas com 500µL de solução de EDTA em PBS (2 mmol/L) e foram lavadas duas vezes com PBS, a fim de que todas as células fossem coletadas. As células soltas juntamente com o PBS das lavagens foram submetidas à centrifugação (400g por 3 min - centrífuga Sanyo). Os *pellets* de células foram reunidos, ressuspensos em PBS e mantidos em banho de gelo até o momento da determinação da viabilidade celular. O corante Azul de Trypan, foi preparado na concentração de 0,4% p/v em PBS, sendo utilizado na proporção de 1:10 (corante: amostra) e as células contadas em câmara de Neubauer em microscópio ótico (OLYMPUS, mod.KW1). O percentual de viabilidade foi calculado conforme a equação: $CV (\%) = 100 \times (NC/NC + C)$.

Onde: CV, células viáveis; NC, células não coradas e C, células coradas pelo Azul de Trypan. A viabilidade dos controles, sempre que necessário, foi normalizada para 100%.

6.4.2 Método do MTT

A determinação da viabilidade celular pelo método do MTT (brometo de 3-metil [4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5difeniltetrazólio) foi realizada de acordo com o descrito por REILLY *et al.* (1998). Segundo o princípio do método, as células viáveis e metabolicamente ativas reduzem o sal de tetrazólio formando cristais de formazan solúveis em DMSO.

Células de melanoma murino B16-F10 e de fibroblastos murino BHK-21 foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 células por poço em placas de 96 poços (6 mm de diâmetro) em meio de crescimento e incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% CO₂ durante 24 h para total aderência. Após o período de aderência, as células foram tratadas com ou sem suplementação de L-tirosina por 48 h e mantidas na estufa, depois foram incubadas por mais 2 h na ausência (grupo controle) ou presença de diferentes concentrações de DHPNO₂: 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 mmol/L, ressaltando que os compostos DHPN (produto da decomposição do DHPNO₂) e D₂O, também foram utilizados como controle. Este último foi usado pelo fato de que os derivados de naftaleno estarem solubilizados nele. Após 2 h, o sobrenadante foi descartado e aos poços foram acrescentados 180 µL de HBSS mais 20 µL de solução de MTT de modo a obter-se uma concentração final em MTT de 500 µg/mL, incubando-se por 3 h a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Após a incubação o excesso de MTT foi removido e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em DMSO. A leitura da absorbância em 550 nm foi realizada em leitor de microplacas BIO-RAD modelo Benchmark, utilizando-se o solvente DMSO como branco (REILLY *et al.*, 1998).

6.5 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DANOS AO DNA

6.5.1 Tratamento das células com DHPNO₂

Para realização desse ensaio as células (B16-F10 e BHK-21), estimuladas ou não com L-tirosina por 48 h em meio sem soro, foram cultivadas em garrafas estéreis (TPP) em estufa sob atmosfera a 5% de CO₂ a 37°C. Após a confluência de 10^6 - 10^7

células, foram tratadas por 2 h, a 37°C, com endoperóxido DHPNO₂, na concentração final de 1 mmol/L no volume final de 9 mL em meio sem soro. Também foram feitas incubações com o respectivo endoperóxido previamente aquecido (DHPN) na mesma concentração final.

6.5.2 Extração do DNA das células

O método utilizado na extração de DNA foi o descrito por WANG *et al.* (1994) com algumas modificações. Após o tempo de incubação, o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS e raspadas das garrafas. O conteúdo das garrafas foi ressuspensão em 4 mL de PBS, homogeneizado e centrifugado a 1500g por 10 min. O *pellet* foi ressuspensão em 2 mL de tampão A (Sacarose 320 mmol/L, MgCl₂ 5 mmol/L, Tris HCl 10 mmol/L, desferroxamina 0,1 mmol/L, Triton X 100 1%, pH 7,5), homogeneizado e centrifugado a 1500g x 10 min. Ao *pellet* coletado foram adicionados 600 µL do tampão B (Tris HCl 10 mmol/L, EDTA-Na₂ 5 mmol/L, Desferroxamina 0,15 mmol/L, pH 8,0), 35 µL de SDS 10%, 30 µL de RNase A (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) {1mg/mL em tampão C (Tris HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, desferroxamina 2,5 mmol/L, pH 7,4)} e 8 µL de RNase T1 (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) (1 U/µL em tampão C). A mistura foi incubada a 37°C por 1 h para digestão do RNA.

Posteriormente, foram adicionados 40 µL de proteinase K (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) (20 mg/mL em água) e as amostras foram incubadas a 37°C por 2 h para hidrólise das proteínas. As amostras foram então centrifugadas a 5000g por 15 min e ao sobrenadante coletado adicionou-se 1,2 mL de solução de NaI (NaI 7,6 mmol/L, Tris HCl 40 mmol/L, EDTA-Na₂ 20 mmol/L, desferroxamina 0,3 mmol/L, pH 8,0) e 2 mL de isopropanol 100% para a precipitação do DNA. Em seguida, o DNA foi submetido a lavagens sucessivas com 1 mL de isopropanol 60% e 1 mL de etanol 70% para retirada do excesso de NaI, centrifugando-se a 5000g por 15 min em cada lavagem. Ao final, o DNA foi dissolvido em desferroxamina 0,1 mmol/L.

A medida da concentração e pureza do DNA foi feita por espectrofotometria UV utilizando o espectrofotômetro Hitachi, modelo U – 2001UV/VIS. Sendo a pureza calculada pela razão entre as absorvâncias nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm ($A_{260}/A_{280} > 1,8$) e a concentração calculada pela relação de 1 OD (densidade ótica) em 260 nm equivale a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

6.5.3 Digestão do DNA

A digestão do DNA coletado foi realizada adicionando-se ao DNA, tampão acetato de sódio 1 mol/L pH 4,8 para concentração final de 20 mmol/L e Nuclease P1 (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) (2U/100 μg de DNA). O DNA foi incubado por 3 h a 37°C. Foram adicionados 100 μL de Tris HCl 1 mol/L pH 7,4 para cada 1 mL de amostra e 1 U de fosfatase para cada 200 μg de DNA e a mistura foi incubada novamente por 1 h a 37°C (modificado de FIALA e col., 1989).

6.5.4 Análise da lesão 8-oxodG por HPLC

A detecção e quantificação da 8-oxodGuo, lesão de base do DNA causada pelo $^1\text{O}_2$, foram realizadas por HPLC com detecção eletroquímica como descrito por SHIGENAGA *et al.*, 1990 e EBLIN *et al.*, 2006.

Amostras de aproximadamente 100 μg de DNA hidrolisado e filtrado em filtros de nitrocelulose 0,22 μm foram injetadas no HPLC da Shimadzu com detecção UV (254 nm, Shimadzu SPD-M20A) para análise da 2'-desoxiguanosina (dG) e detecção eletroquímica (130 e 380 mV; ESA Coulochem III, modelo 5011A/5020) para análise da 8-oxodG, utilizando uma coluna analítica de fase reversa C-18 (Metachem Technologies Inc., Califórnia) sob fluxo de 0,8 mL/min, fase móvel contendo ácido cítrico 4 mmol/L, acetato de amônio 8 mmol/L, 7,5% de metanol e EDTA 20 mg/L, pH 4,0 (EBLIN *et al.*, 2006). O sistema foi calibrado com soluções padrões de 8-oxodG (0,5 -3,0 pmol) e dG (2 – 100 nmol).

6.6 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDA PELO $^1\text{O}_2$

6.6.1 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Células B16-F10, SK-MEL e BHK-21 (5×10^3) foram cultivadas sobre lamínulas circulares (Glass Técnica – Brasil) de 13 mm de diâmetro em placas de 24 poços por 72 h em estufa sob atmosfera a 5% de CO_2 a 37°C . Após este período, o meio foi trocado por outro sem soro com ou sem a suplementação de L-tirosina e mantidas na estufa por 48 h. Posteriormente, as células foram tratadas com o endoperóxido DHPNO₂ (1,0 e 5,0 mmol/L) e seu produto de decomposição, DHPN (1,0 e 5,0 mmol/L), diluídos em meio de cultura sem soro, permanecendo por 2 h na estufa. Decorrido este tempo, o meio foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com tampão cacodilato 0,15 mmol/L, pH 7,4 e fixadas com glutaraldeído 2,5% (EMS, Electron Microscopy Sciences, USA) por 1 h a temperatura ambiente, sendo então, lavadas 3 vezes com tampão cacodilato 0,15 mmol/L. As células foram desidratadas com banhos subseqüentes de 10 min com etanol 30, 50, 70, 90 e 100%. As lamínulas contendo as células foram transferidas para um recipiente apropriado, separadas uma da outra por meio de uma película e submetidas a total desidratação (ponto crítico) (Crytical point dryer BAL-TEC, CPD030). As lamínulas foram montadas sobre suportes específicos por meio de um adesivo de cobre e após, metalizadas com banho de ouro em equipamento Blazers Union (FL9496, SCD030) e posteriormente analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), marca Philips (modelo SEM-505) (SILVEIRA *et al.*, 2002) no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR (CME).

6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram submetidos à análise estatística, sendo as repetições e os tratamentos avaliados pela análise de variância (ANOVA- “one-way”) e para avaliar as diferenças entre os tratamentos e controle foi utilizado o teste de Tukey, o qual permite estabelecer a diferença mínima significativa entre duas médias. A significância foi definida como $p < 0,05$.

7. RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE

A melanogênese *in vivo e in vitro* pode ser estimulada pela radiação UV, onde o α -MSH e o ACTH estão envolvidos (ROUZAUD *et al.*, 2005), ou pela presença de precursores da melanogênese como a L-tirosina.

Dados da literatura sugerem que a melanogênese pode ser modulada *in vitro* com a utilização de concentrações apropriadas de L-tirosina e α -MSH. De acordo com HADDAD e colaboradores (1999), células tratadas com altas concentrações de L-tirosina e α -MSH, além de terem a síntese de melanina estimulada, também tiveram inibição da proliferação, levando as células à senescência prematura. Por sua vez, níveis baixos desses compostos limitaram a síntese de melanina, principalmente em função da quantidade de L-tirosina (HANLEY *et al.*, 2000).

Com a finalidade de avaliar o efeito da concentração de L-tirosina, células das linhagens B16-F10 e SK-MEL foram tratadas com este modulador nas seguintes concentrações: B16-F10: 0,25; 0,5 e 1,0 mmol/L; SK-MEL: 0,11; 0,22 e 0,44 mmol/L. Para a linhagem B16-F10 também foi avaliado a melanogênese induzida pelo α -MSH, nestas concentrações: 10, 20 e 30 nmol/L. Os experimentos foram desenvolvidos em meio com e sem soro.

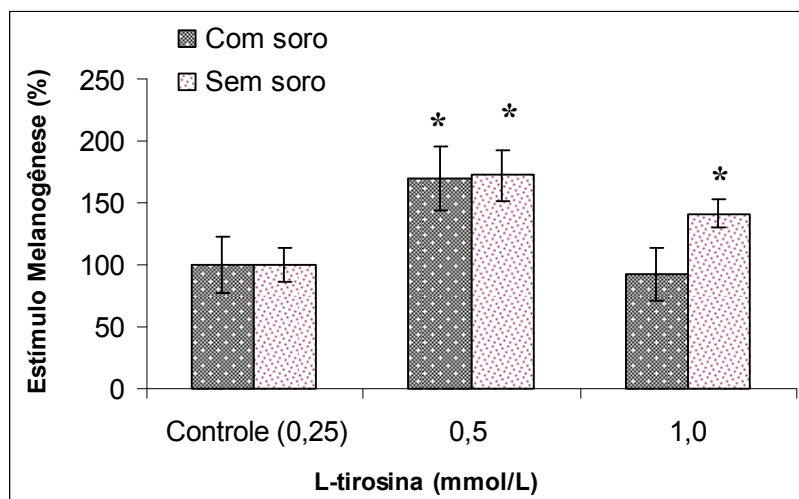
Os valores de absorbância foram transformados em μg de melanina/ 10^6 células por meio de uma curva padrão de melanina sintética, onde a concentração variou de 2,4 a 96 $\mu\text{g/mL}$, obtendo-se a equação da reta: $y = 0,005034 x - 0,004459$.

Na FIGURA 6 observa-se que, em meio com ou sem soro, o estímulo da melanogênese em função da concentração de L-tirosina foram similares, apesar de RIEBER e RIEBER (1993) afirmarem que, em meio sem soro e tratado com L-tirosina, haveria um aumento significativo da melanogênese.

Com relação à produção de melanina em função das concentrações de L-tirosina, verificou-se que o tratamento com 0,5 mmol/L de L-tirosina promoveu o

maior estímulo na produção de melanina para ambas as situações (meio com ou sem soro), de cerca de 70% (72 e 60 $\mu\text{g}/10^6$ cel, respectivamente) em relação ao controle (42 e 35 $\mu\text{g}/10^6$ cel, respectivamente) (FIGURA 6). Dessa forma, a concentração de 0,5 mmol/L de L-tirosina foi considerada a mais adequada para a realização dos experimentos posteriores.

FIGURA 6 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE L-TIROSINA NO ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE EM MEIO COM E SEM SORO PARA A LINHAGEM B16-F10

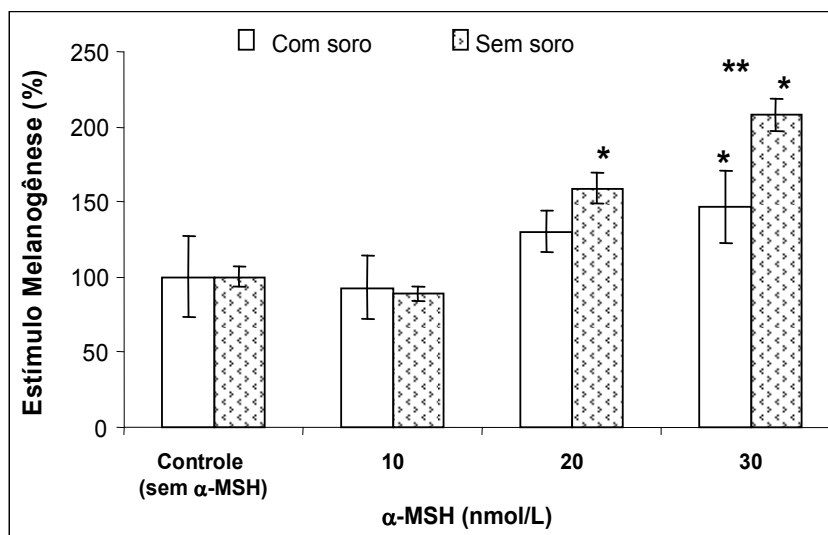


As células B16-F10 (1×10^5 células) foram tratadas em meio com e sem soro por 48 h com L-tirosina nas concentrações: 0,25; 0,5 e 1,0 mmol/L, em triplicatas. Absorbância lida em 470 nm após lise celular com NaOH (1 mol/L) e aquecimento a 100°C por 1h. O controle corresponde ao meio com 0,25 mmol/L de L-tirosina. Os valores representam a média \pm d.p. (n= 3). *, diferente do controle, $p < 0,05$.

Foram realizados também ensaios para as células B16-F10 com suplementação de α -MSH, em meio com e sem soro contendo L-tirosina 0,25 mmol/L. De acordo com a FIGURA 7, as concentrações que apresentaram um aumento significativo, em relação ao controle, na produção de melanina foram 20 e 30 nmol/L.

Sendo o estímulo para meio sem soro de 60 e 108%, respectivamente. Portanto, o efeito deste tratamento foi dose dependente.

FIGURA 7 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE α -MSH NO ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE EM MEIO COM E SEM SORO PARA CÉLULAS B16-F10

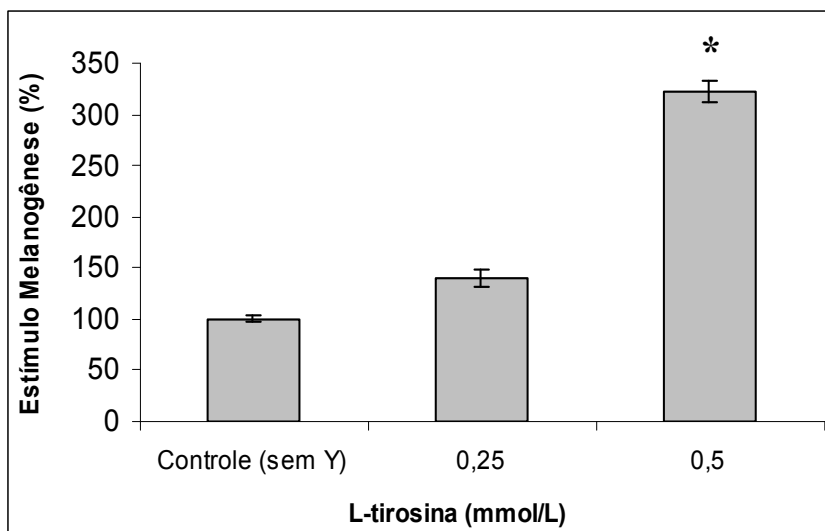


Linhagem B16-F10 (1×10^5) tratadas com α -MSH nas concentrações: 10, 20 e 30 nmol/L em meio com 7,5% de soro e meio sem soro, contendo 0,25 mmol/L de L-tirosina, em triplicatas. Os valores representam a média \pm d.p. (n= 2). *, diferente do controle, e **, diferentes entre si; $p < 0,05$.

A privação de soro para o tratamento das células com L-tirosina demonstrou um comportamento semelhante àquelas tratadas em meio com soro (FIGURA 6), não havendo então, para esse estimulante, diferenças no estímulo da melanogênese quando o soro é retirado. Porém, para o estímulo realizado com o α -MSH em meio sem soro houve um aumento considerável na melanogênese (em torno de 42% para a concentração de 30 nmol/L) em relação ao meio com soro (FIGURA 7). Sugere-se que esta diferença entre os estimulantes é devida à diferença de vias de sinalização, sendo estas possivelmente afetadas pelos componentes do soro, diminuindo assim o estímulo da melanogênese pelo α -MSH.

Para verificar se havia aumento considerável na melanogênese entre um meio com ou sem L-tirosina, adquiriu-se MEM totalmente sem L-tirosina e realizou-se um tratamento das células B16-F10, o qual está mostrado na FIGURA 8. As células do controle foram incubadas em meio sem soro e sem L-tirosina. Comparando-se a melanogênese do controle com a do meio contendo L-tirosina 0,25 mmol/L, o resultado não apresentou diferença significativa. Isso se deve provavelmente ao fato deste aminoácido ser produzido endogenamente.

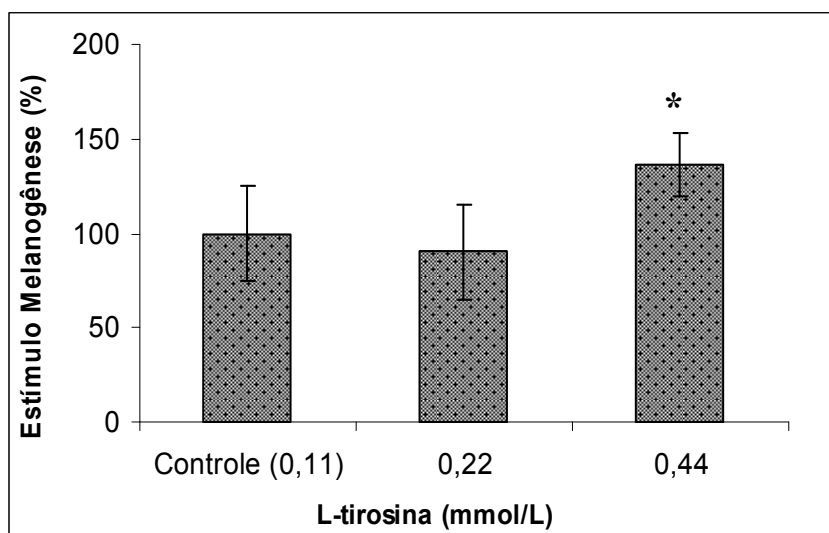
FIGURA 8 - PRODUÇÃO DE MELANINA POR CÉLULAS B16-F10 EM MEIO SEM SORO.



Linagem B16-F10 tratadas com L-tirosina (Y) 0,25 e 0,5 mmol/L, em triplicatas. O controle é composto pelas células em meio sem soro na ausência de L-tirosina. Os valores representam a média \pm d.p. (n= 3). *, diferente do controle, $p < 0,05$.

A FIGURA 9 mostra a quantidade de melanina produzida através do tratamento das células SK-MEL, em quadruplicatas, com L-tirosina (0,11; 0,22 e 0,44 mmol/L) onde uma maior diferença na quantidade de melanina foi da concentração de 0,44 mmol/L de L-tirosina em relação ao controle (0,11 mmol/L de L-tirosina), obtendo um aumento no estímulo da melanogênese de 37%.

FIGURA 9 - PRODUÇÃO DE MELANINA POR CÉLULAS SK-MEL EM MEIO SEM SORO



A Linhagem utilizada foi a SK-MEL tratada apenas com L-tirosina nas concentrações de 0,11 mmol/L (controle), 0,22 e 0,44 mmol/L, em quadruplicatas. Os valores representam a média \pm d.p. (n= 3). *, diferente do controle, $p < 0,05$.

7.2 CONCENTRAÇÃO E PUREZA DO ENDOPERÓXIDO DHPNO₂

A síntese do endoperóxido DHPNO₂ representa uma etapa importante, pois este composto é utilizado como fonte limpa de ¹O₂ nos experimentos. A concentração foi determinada para cada uma das alíquotas obtidas após a filtração final. Obtiveram-se soluções de concentração entre 130 a 200 mmol/L com pureza em torno de 80%. Ressalta-se que este valor de pureza se refere a quantidade de DHPNO₂ obtido em relação ao total (DHPNO₂+DHPN). Esses valores são adequados para utilização conforme anteriormente descrito MARTINEZ *et al.* (2000c); PIERLOT *et al.* (2000); MARTINEZ *et al.* (2000b) e DEWILDE *et al.* (1998).

7.3 EFEITO DO $^1\text{O}_2$ NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS B16-F10, SK-MEL E BHK-21

O endoperóxido é considerado uma importante fonte de $^1\text{O}_2$ *in vitro*, devido à sua termólise ser compatível com as condições do sistema biológico (MARTINEZ *et al.*, 2000). Além disso, sua decomposição gera o derivado de naftaleno correspondente (DHPN) e 60% do oxigênio liberado no estado singlete (PIERLOT *et al.*, 2000) Dessa forma, o DHPNO₂ foi utilizado para promover a geração do $^1\text{O}_2$, cujo efeito citotóxico sobre as células estimuladas ou não com L-tirosina (0,5 mmol/L) é objeto de estudo neste trabalho.

A função de fotoproteção atribuída à melanina é controversa. MOAN *et al.*, (1999) sugeriram que a melanina na camada superior da pele agiria como fotoprotetora, enquanto que nos melanócitos seria carcinogênica. A melanina poderia agir como um fotossensibilizador (KOWALCZUK *et al.*, 2001) ao receber energia da radiação UV e formar $^1\text{O}_2$ (GODAR *et al.*, 1993 e LARSSON *et al.*, 2005). Estudos realizados com células de melanoma humano mostraram que a fotoproteção ou a fotossensibilização, dependem de diversos fatores, dentre eles: o tipo celular, o estado redox da célula, a solubilidade e o tipo de melanina, bem como seus precursores e sua localização dentro da célula (KOWALCZUK *et al.*, 2001). Dessa forma, pesquisas detalhadas devem ser desenvolvidas utilizando diversos tipos celulares, para que se possam encontrar evidências elucidativas para a compreensão do mecanismo dos cânceres de pele, onde a presença da melanina está fortemente associada.

A citotoxicidade das células B16-F10, SK-MEL e BHK-21 foram analisadas por meio de dois métodos: Azul de Trypan e MTT. A escolha de utilizar estes dois métodos diferentes, para a viabilidade celular, foi fundamentada na hipótese de se obter respostas adicionais, em relação ao mecanismo de morte celular, uma vez que, o método de azul de trypan indica que a célula apresenta sua membrana permeável, ou seja, lipídios e proteínas podem estar danificados, deixando este corante entrar no meio intracelular. Já, o MTT mostra a inviabilidade celular quando desidrogenases não conseguem reduzir o sal de tetrazólio, desta forma, esse método é baseado no metabolismo celular.

7.3.1 Efeito do DHPNO₂ sobre a viabilidade de células B16-F10, SK-MEL E BHK-21 pelo método de Azul de Trypan

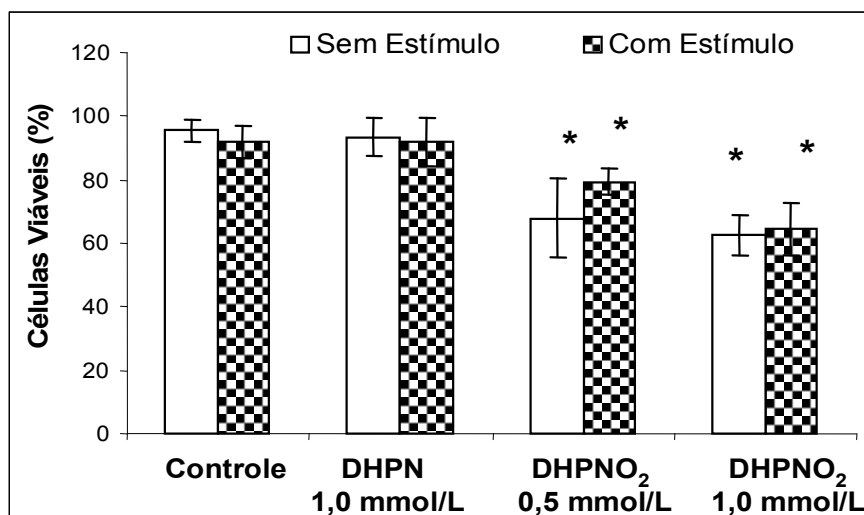
As células B16-F10, SK-MEL E BHK-21, com ou sem estímulo da melanogênese por tratamento com L-tirosina ou α -MSH foram incubadas com DHPNO₂ por 2 h em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% CO₂, depois desta incubação as células foram submetidas à avaliação da viabilidade celular pelo método do Azul de trypan.

Para os ensaios utilizando o α -MSH (FIGURA 10), os resultados não mostraram diferenças na viabilidade em função do estímulo da melanogênese quando as células foram tratadas com DHPNO₂ (0,5 e 1,0 mmol/L) Na FIGURA 11 estão apresentados os percentuais das células viáveis da linhagem B16-F10 com e sem o estímulo da melanogênese. A viabilidade das células foi reduzida a 76% quando a concentração do endoperóxido DHPNO₂ era de 0,5 mmol/L, e na concentração de 1,0 mmol/L a redução da viabilidade celular foi de 66%, tanto para as células suplementadas com L-tirosina ou não. Estes resultados foram semelhantes aos das células tratadas com α -MSH. Porém, para as concentrações de 5,0 e 10,0 mmol/L houve um aumento significativo na viabilidade celular (107 e 183%, respectivamente, em relação às células não suplementadas) quando as células foram suplementadas com L-tirosina 0,5 mmol/L, sugerindo que a quantidade de melanina influenciou na diminuição da citotoxicidade do ¹O₂, apresentando um efeito protetor. Para as células SK-MEL (FIGURA 12) a redução da viabilidade celular foi mais significativa para o tratamento com DHPNO₂ 1,0 mmol/L sendo de 58%. Esses resultados sugerem que as células de melanoma humano seriam mais susceptíveis ao efeito citotóxico causado pelo ¹O₂ do que as células de melanoma murino. Já para a linhagem BHK-21 (FIGURAS 13 e 14), o ¹O₂ não apresentou citotoxicidade, pois os percentuais de células viáveis tratadas ficaram próximos ao controle, 96% para DHPNO₂ 0,5 mmol/L e 97% DHPNO₂ 1,0 mmol/L. Os resultados também mostram que o DHPN não tem

efeito sobre a viabilidade celular, uma vez que o percentual de células viáveis, das linhagens usadas para esse ensaio, é da mesma grandeza que o controle.

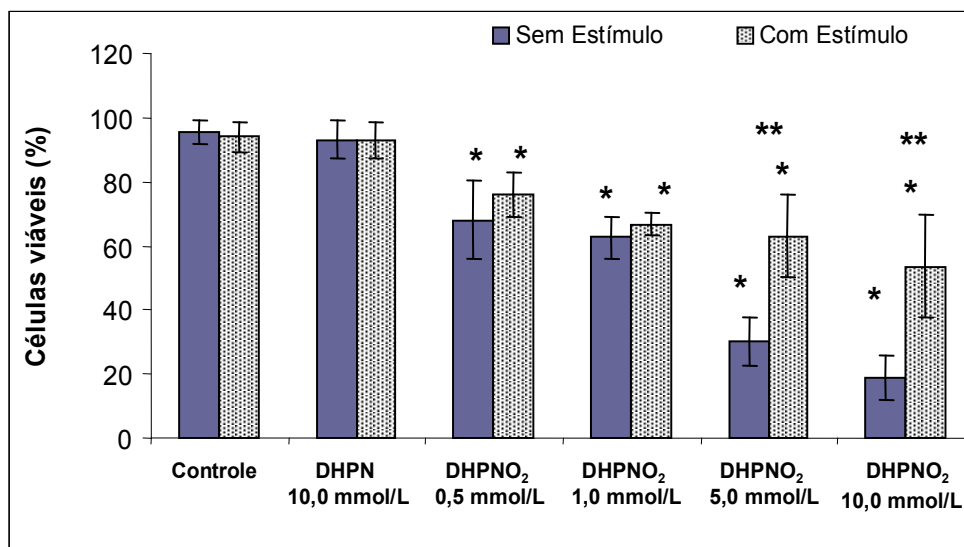
A viabilidade celular apresentada pelas três linhagens frente ao tratamento com o $^1\text{O}_2$ e suplementação com L-tirosina são de grande importância para a compreensão do papel da melanina. Talvez a modulação da melanogênese seja um ponto chave para a terapia contra o câncer de pele, onde a melanina poderá ser impedida de atuar como protetora da morte celular de células carcinogênicas. A inibição da síntese de melanina através das enzimas que atuam no processo da melanogênese já tem sido desenvolvida por vários pesquisadores, porém os resultados ainda não são satisfatórios (KASRAEE *et al.*, 2004 e SHWAHN *et al.*, 2001).

FIGURA 10 - EFEITO DO DHPNO₂ SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS B16-F10 DETERMINADA PELO MÉTODO DO AZUL DE TRYPAN, COM E SEM MELANOGÊNESE ESTIMULADA POR α -MSH.



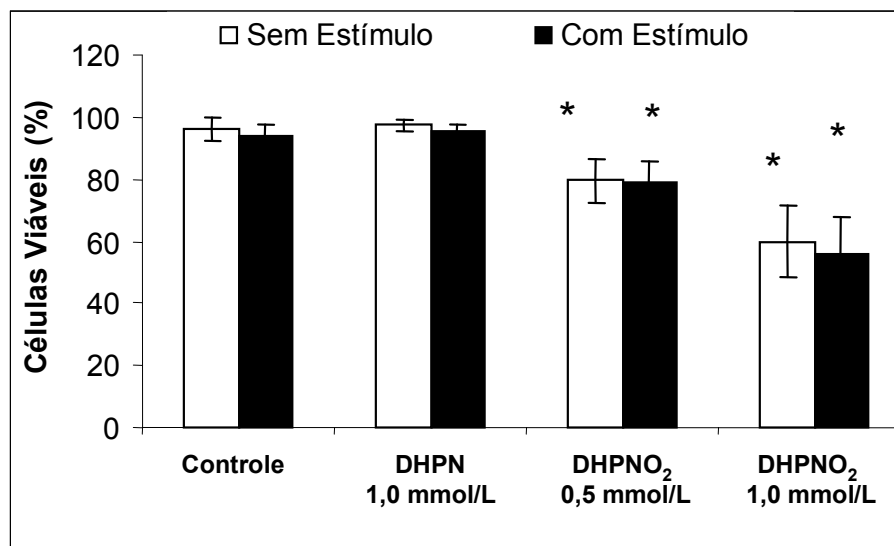
Os controles consistem de células não tratadas com os endoperóxidos em meio MEM com L-tirosina 0,25 mmol/L (sem estímulo) e com α -MSH 30 nmol/L (com estímulo). A viabilidade celular foi determinada pelo método do Azul de Trypan como descrito em Materiais e Métodos (item 6.4.1), em triplicata. O DHPN é produto da decomposição térmica do DHPNO₂ na concentração de 1,0 mmol/L. Os valores representam a média ($n = 3$) \pm d.p. *, diferente do controle, $p < 0,05$.

FIGURA 11 - EFEITO DO DHPNO₂ SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS B16-F10 DETERMINADA PELO MÉTODO DO AZUL DE TRYPAN, COM E SEM MELANOGÊNESE ESTIMULADA POR L-TIROSINA.



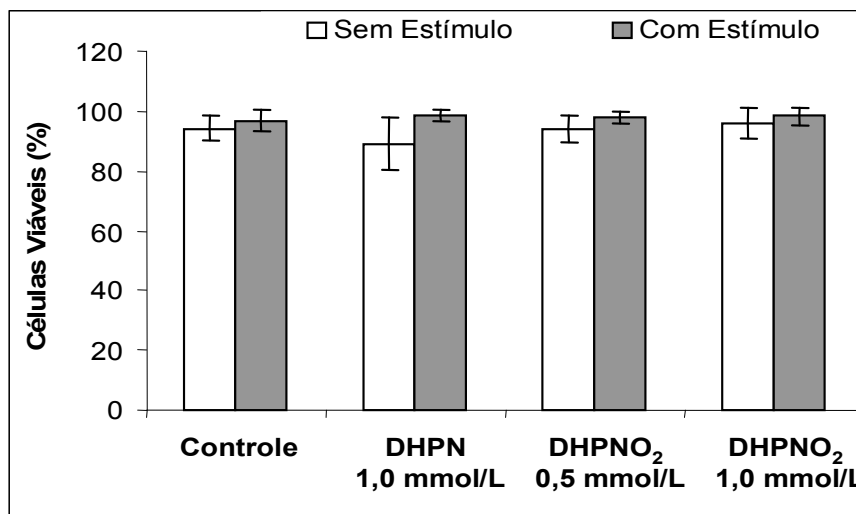
Os controles consistem de células não tratadas com os endoperóxidos em meio MEM com L-tirosina 0,25 mmol/L (sem estímulo) e 0,5 mmol/L (com estímulo). A viabilidade celular foi determinada pelo método do Azul de Trypan como descrito em Materiais e Métodos (item 6.4.1), em triplicata. O DHPN é produto da decomposição térmica do DHPNO₂ na concentração de 10,0 mmol/L. Os valores representam a média (n = 3) ± d.p. *, diferente do controle e **, diferentes entre si, p < 0,05.

FIGURA 12 - EFEITO DO DHPNO₂ SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS SK-MEL DETERMINADA PELO MÉTODO DO AZUL DE TRYPAN, COM E SEM MELANOGÊNESE ESTIMULADA POR L-TIROSINA



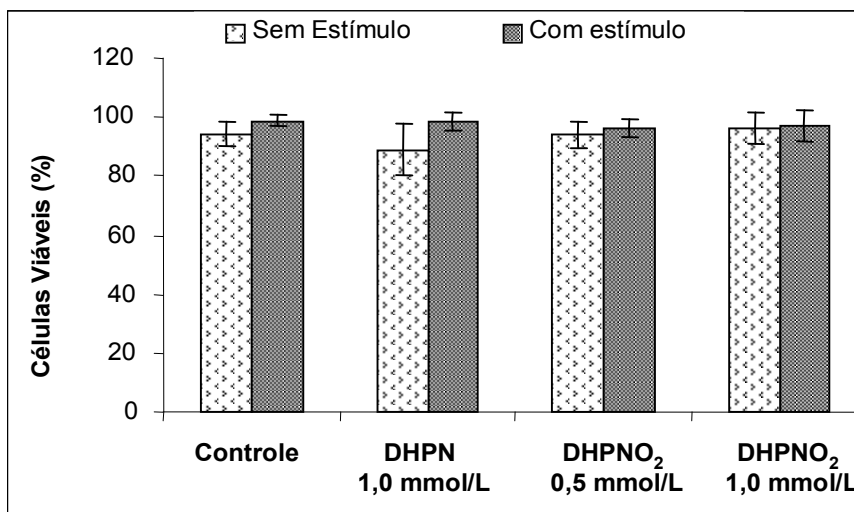
Os controles consistem de células não tratadas com os endoperóxidos em meio RPMI 1640 com L-tirosina 0,11 mmol/L (sem estímulo) e 0,44 mmol/L (com estímulo). A viabilidade celular foi determinada pelo método do Azul de Trypan como descrito em Materiais e Métodos (item 6.4.1), em triplicata. O DHPN é produto da decomposição térmica do DHPNO₂ na concentração de 1,0 mmol/L. Os valores representam a média (n = 3) ± d.p. *, diferente do controle, p < 0,05.

FIGURA 13 - EFEITO DO DHPNO₂ SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS BHK-21 DETERMINADA PELO MÉTODO DO AZUL DE TRYPAN, COM E SEM MELANOGÊNESE ESTIMULADA POR L-TIROSINA



Os controles consistem de células não tratadas com os endoperóxidos em meio MEM com L-tirosina 0,25 mmol/L (sem estímulo) e 0,5 mmol/L (com estímulo). A viabilidade celular foi determinada pelo método do Azul de Trypan como descrito em Materiais e Métodos (item 6.4.1), em triplicata. O DHPN é produto da decomposição térmica do DHPNO₂ na concentração de 1,0 mmol/L. Os valores representam a média ($n = 3$) \pm d.p.

FIGURA 14 - EFEITO DO DHPNO₂ SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS BHK-21 DETERMINADA PELO MÉTODO DO AZUL DE TRYPAN, COM E SEM MELANOGÊNESE ESTIMULADA POR α -MSH



Os controles consistem de células não tratadas com os endoperóxidos em meio MEM com L-tirosina 0,25 mmol/L (sem estímulo) e com α -MSH 30 nmol/L (com estímulo). A viabilidade celular foi determinada pelo método do Azul de Trypan como descrito em Materiais e Métodos (item 6.4.1), em triplicata. O DHPN é produto da decomposição térmica do DHPNO₂ na concentração de 1,0 mmol/L. Os valores representam a média (n = 3) \pm d.p.

7.3.2 Viabilidade pelo método do MTT

As linhagens BHK-21 e B16-F10 foram utilizadas neste experimento a fim de novamente comparar a viabilidade celular entre elas e confirmar a citotoxicidade do ¹O₂ nas células de melanoma utilizando uma outra técnica, cujo princípio de análise é diferente ao da técnica do Azul de Trypan.

De acordo com a FIGURA 15, o tratamento das células B16-F10 com DHPNO₂, nas concentrações de 0,5 e 1,0 mmol/L, não apresentou diferença significativa com relação à suplementação com L-tirosina, sendo que em ambas as condições (com e sem estímulo da melanogênese), a viabilidade celular ficou em torno de 35%. Entretanto, para as células estimuladas com L-tirosina 0,5 mmol/L e tratadas com o endoperóxido em concentrações maiores (5,0 e 10,0 mmol/L) há um aumento

de 77% e 53%, respectivamente, na viabilidade celular em relação às células tratadas com a mesma concentração, porém sem o estímulo da melanogênese.

Para a linhagem BHK-21 não foi observado efeito citotóxico do $^1\text{O}_2$, pois a viabilidade celular permaneceu em torno de 95% (FIGURA 16). Dessa forma as células da linhagem B16-F10 (melanoma murino) se mostram mais susceptíveis à citotoxicidade pelo $^1\text{O}_2$ do que as células BHK-21, assim como já tinha sido mostrado quando a avaliação da viabilidade foi feita pelo método do Azul de Trypan.

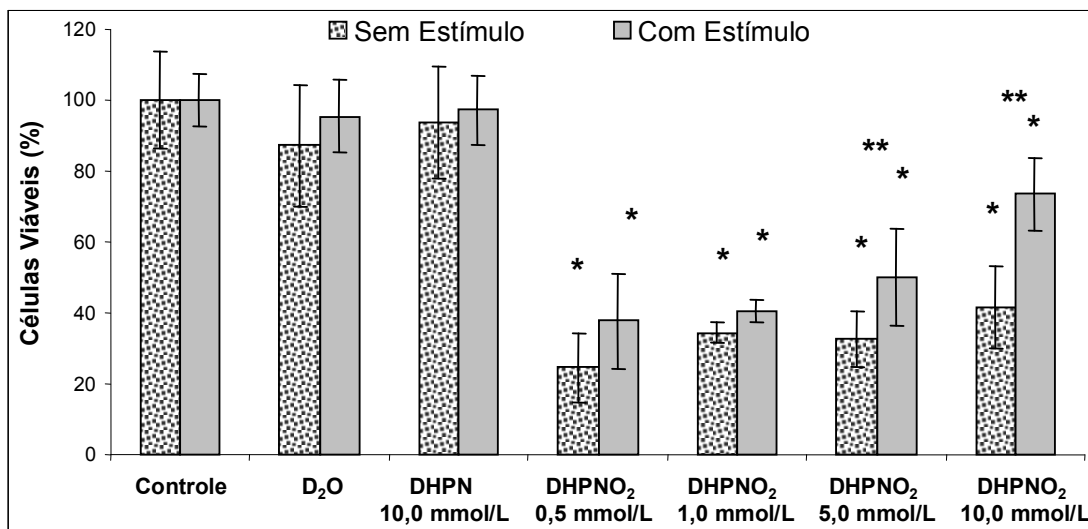
Comparando-se os resultados obtidos através do método de Azul de trypan e MTT, constatou-se semelhança nos resultados, confirmando a atuação da melanina de proteção das células de melanoma B16-F10, quando a concentração de $^1\text{O}_2$ é aumentada. Estes resultados indicam que há uma relação entre a quantidade da espécie reativa, $^1\text{O}_2$, no meio e a proteção da melanina. Estudos mostram que as ROS induzem o aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, prejudicando sua homeostase intracelular (GEN *et al.*, 2001). Porém, estudos também revelam que a melanina possui capacidade de se ligar ao Ca^{2+} , estabilizando a homeostase intracelular de Ca^{2+} e assim, protegeria a célula dos efeitos causados por ROS (HOOGDUIJN *et al.*, 2004). Logo, sugere-se que, o tratamento das células de melanoma murino, B16-F10, com concentrações maiores de DHPNO_2 (5,0 e 10,0 mmol/L) em meio suplementado com L-tirosina (0,5 mmol/L), teria sofrido um aumento significativo de Ca^{2+} no meio, porém pela presença de uma maior quantidade de melanina, esta estaria atuando como protetora, ligando-se a este cátion, diminuindo o índice de morte celular. Para verificar esta hipótese seria necessário realizar um estudo mais aprofundado, medindo a quantidade de Ca^{2+} no meio das células estimuladas com L-tirosina e tratadas com diferentes concentrações de $^1\text{O}_2$.

Para a linhagem BHK-21 não houve interferência na viabilidade celular, tanto do $^1\text{O}_2$, como dos estimulantes da melanogênese.

Células de melanoma malignos geralmente produzem altas quantidades de melanina e precursores de melanina (BUSTAMANTE *et al.*, 1991), dessa forma a melanina impede a morte celular, interferindo em terapias contra o melanoma (SARNA *et al.*, 1986). Nossos resultados também comprovaram esta evidência, onde a

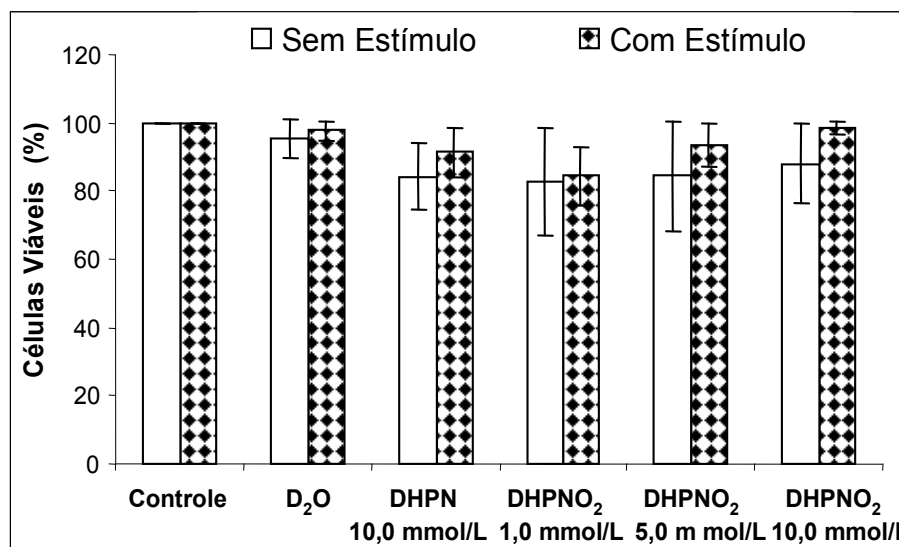
concentração maior de L-tirosina utilizada nos experimentos de viabilidade celular para as células de melanoma, tratadas com $^1\text{O}_2$, apresentaram um alto índice de células viáveis em relação àquelas com menor concentração de L-tirosina.

FIGURA 15 - EFEITO DO DHPNO₂ SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS B16-F10 DETERMINADA PELO MÉTODO DO MTT, COM E SEM MELANOGÊNESE ESTIMULADA POR L-TIROSINA.



Os controles consistem de células não tratadas com os endoperóxidos em meio MEM sem soro com L-tirosina nas concentrações de 0,25 mmol/L (sem estímulo) e 0,5 mmol/L (com estímulo). A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT como descrito em Materiais e Métodos (item 6.4.2), em quadriplicatas. Ambos o DHPN e DHPNO₂ estão em água deuterada (D₂O), dessa forma, foi feito um controle acrescentando-se D₂O ao meio. Os valores representam média ± d.p., (n = 3). *, diferente do controle e **, diferentes entre si, p < 0,05.

FIGURA 16 - EFEITO DO DHPNO₂ SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS BHK-21 DETERMINADA PELO MÉTODO DO MTT, COM E SEM MELANOGÊNESE ESTIMULADA POR L-TIROSINA.



Os controles consistem de células não tratadas com os endoperóxidos em meio MEM sem soro com L-tirosina nas concentrações de 0,25 mmol/L (sem estímulo) e 0,5 mmol/L (com estímulo). A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT como descrito em Materiais e Métodos (item 6.4.2), em quadruplicatas. Ambos o DHPN e DHPNO₂ estão em água deuterada (D₂O), dessa forma, foi feito um controle acrescentando-se D₂O ao meio. Os valores representam média ± d.p., (n = 3).

7.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DA LESÃO 8-OXODG

A absorção das radiações UVA e UVB pelo DNA resultam em alterações estruturais e funcionais (AGAR & YOUNG, 2005). Se essas alterações não forem reparadas podem levar a sérias conseqüências, como mudanças nos cromossomos, mutações genéticas e transformação maligna (ROOS & KAINA, 2006). As alterações podem ser induzidas pelas ROS, dentre elas o ¹O₂, que pode causar a lesão 8-oxodG (MARTINEZ *et al.*, 2005) considerada altamente mutagênica (SHIBUTANI *et al.*, 1991; CAVALCANTE *et al.*, 2002). Muitos trabalhos vêm utilizando o ¹O₂ (RAVANAT *et al.*, 2000 e 2001; COSSO *et al.*, 2002) em vários modelos de estudo, principalmente em células (KOCHEVAR *et al.*, 2000, OTSU *et al.*, 2005).

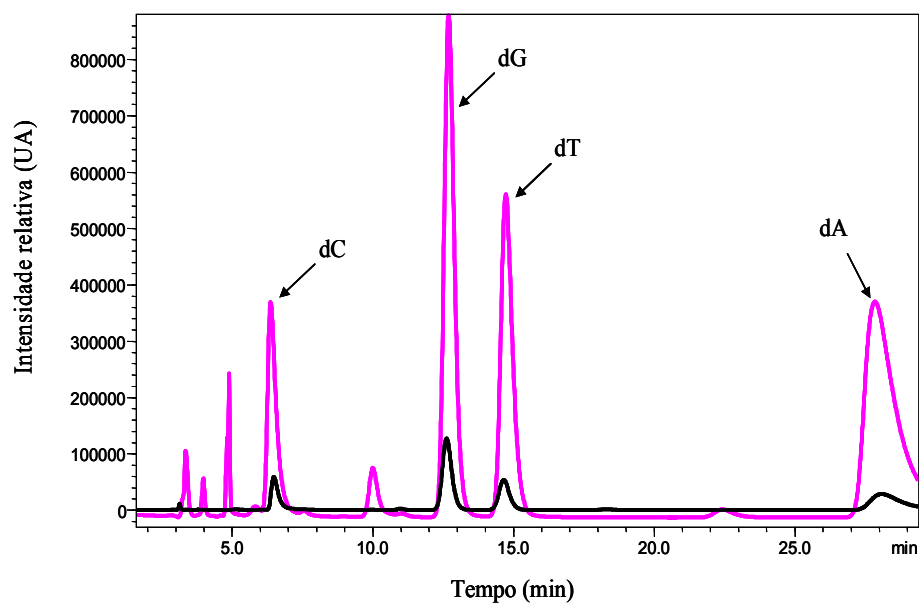
Estudos sugerem que a formação de fotoprodutos do DNA, gerados pela radiação UV, pode induzir a melanogênese (ELLER *et al.*, 1996 e 2000). MARROT e colaboradores (1999) utilizaram melanócitos humanos normais para investigar os efeitos genotóxicos do estresse foto-oxidativo relacionado com a síntese de melanina. Eles estimularam a melanogênese com o aminoácido L-tirosina, obtendo resultados que evidenciaram uma possibilidade da melanina, ou algum intermediário químico que participa do processo da melanogênese, contribuírem significativamente para a formação de danos ao DNA de melanócitos.

KVAM & TYRRELL (1999) demonstraram fortes evidências que o estímulo da síntese de melanina seguida por irradiação com UVA, aumenta a susceptibilidade de células de melanoma humano para a indução de danos oxidativos pré-mutagênicos a bases do DNA, em especial a 8-oxodG. Entretanto, KOWALCZUK *et al.* (2001), ao estudarem o efeito da melanina em células de melanoma humano (G361), não obtiveram resultados que confirmassem o envolvimento da melanina na fotossensibilização ou fotoproteção.

Para avaliar o efeito da melanina em conjunto ao $^1\text{O}_2$ sobre o DNA das células produtoras (B16-F10) e não produtoras de melanina (BHK-21) foi realizado primeiramente o estímulo da melanogênese por 48 h e posterior tratamento com o endoperóxido DHPNO₂ (1 mmol/L) por 2 h. Decorrido este tempo, as linhagens foram submetidas à extração do DNA e subsequente hidrólise, e então, realizadas análises para a detecção da 8-oxodG por HPLC.

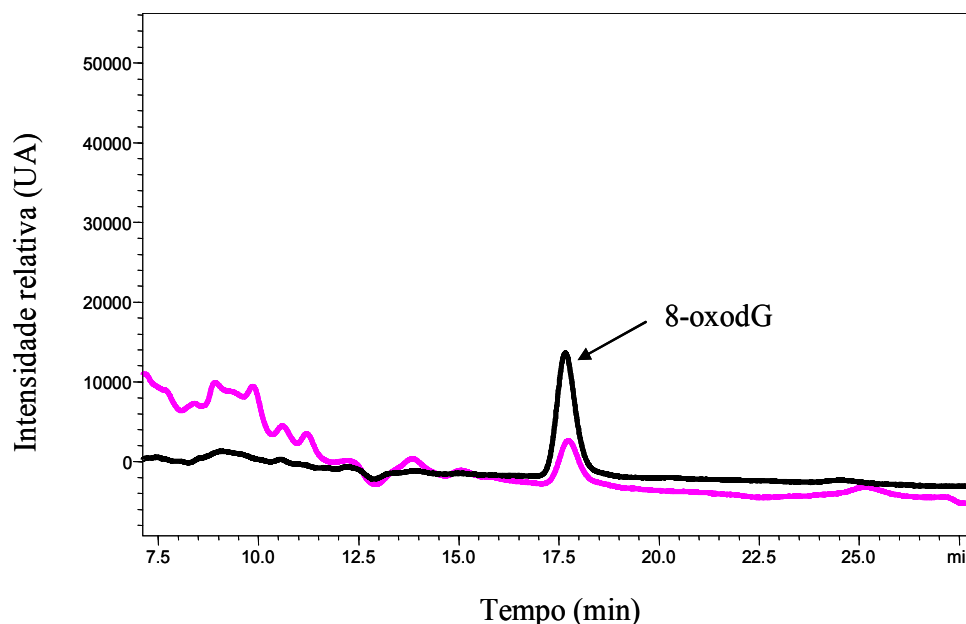
As figuras 17 e 18 mostram os cromatogramas referentes ao tratamento das células B16-F10 com DHPNO₂. A FIGURA 17 apresenta em preto, um cromatograma típico do padrão de nucleosídeos do DNA (2'-desoxicitidina - dC, 2'-desoxiguanosina - dG, 2'-desoxitimidina - dT e 2'-desoxiadenosina - dA) na concentração de 0,1 mmol/L, e na cor rosa os nucleosídeos obtidos pela hidrólise do DNA extraído das células B16-F10. Na FIGURA 18 tem-se na cor preta o cromatograma típico, referente ao padrão comercial da 8-oxodG (1,0 pmol) e em rosa, o produto da oxidação da dG do DNA das células tratadas, a lesão 8-oxodG.

FIGURA 17 – CROMATOGRAMA DA DETECÇÃO UV – NUCLEOSÍDEOS DO DNA



Cromatograma representativo da detecção UV em 254 nm dos nucleosídeos do DNA. O cromatograma de cor rosa está apresentando os nucleosídeos do DNA das células B16-F10. O cromatograma de cor preta mostra o padrão dos nucleosídeos do DNA com concentração de 0,1 mmol/L (dC, dG, dT e dA).

FIGURA 18 – CROMATOGRAMA DA DETECÇÃO ELETROQUÍMICA - 8-OXODG



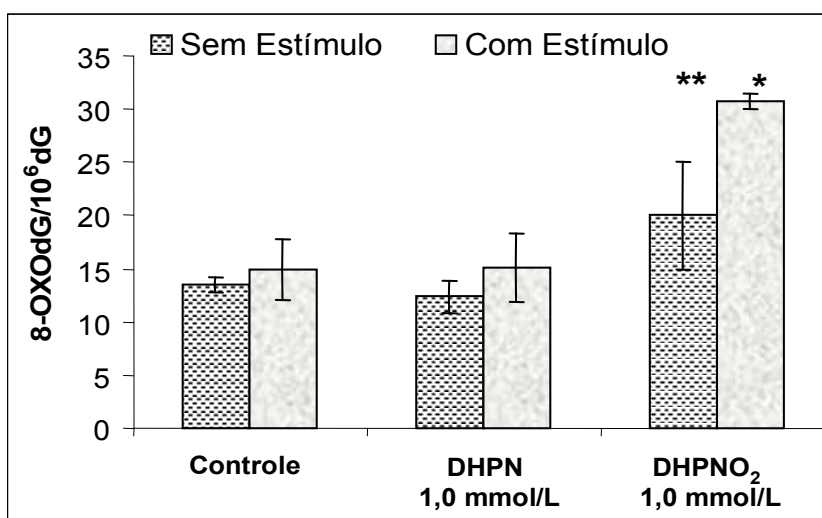
Cromatograma representativo da detecção eletroquímica por HPLC do produto de oxidação da dG, a lesão 8-oxodG [380 V; razão do fluxo de 0,8 mL/min; fase móvel contendo 7,5% metanol, 4,0 mmol/L de ácido cítrico, 8,0 mmol/L de acetato de amônio e 20 mg/L de EDTA (pH 4,0) e coluna com fase reversa C-18]. Em preto mostra o padrão da 8-oxodG (1,0 pmol) e na cor rosa a lesão 8-oxodG causada pelo tratamento com $^1\text{O}_2$ nas células B16-F10.

Os resultados da FIGURA 19 mostram um aumento significativo (100% em relação ao respectivo controle e 55% em relação às células não suplementadas com L-tirosina) dos níveis da 8-oxodG do DNA das células B16-F10 que foram submetidas ao estímulo da melanogênese e posterior tratamento com $^1\text{O}_2$. As células não estimuladas tiveram um aumento dos níveis de 8-oxodG mais discretos (cerca de 50% em relação ao respectivo controle).

Os resultados evidenciam que a melanina potencializou a ação prejudicial do $^1\text{O}_2$ no DNA das células que tiveram a melanogênese estimulada, resultando na formação de níveis mais altos de 8-oxodG. Estes resultados estão de acordo com o mostrado por KVAM & TYRREL (1999), onde as células, com a melanogênese estimulada e irradiadas com luz UVA, acumularam duas vezes mais a lesão 8-oxodG que as células não submetidas ao estímulo melanogênico. WENCZL e colaboradores

(1998) mostraram que em células pigmentadas submetidas à radiação UVA, a melanina endógena poderia induzir a quebras no DNA e que o estímulo da melanogênese acentuaria o processo da fotossensibilização. Em nossos estudos também constatou-se que a melanina contribuiu para a formação de lesões no DNA, sugerindo que essa espécie poderia agir no processo de fotossensibilização, uma vez que o $^1\text{O}_2$ é um dos produtos da radiação UV.

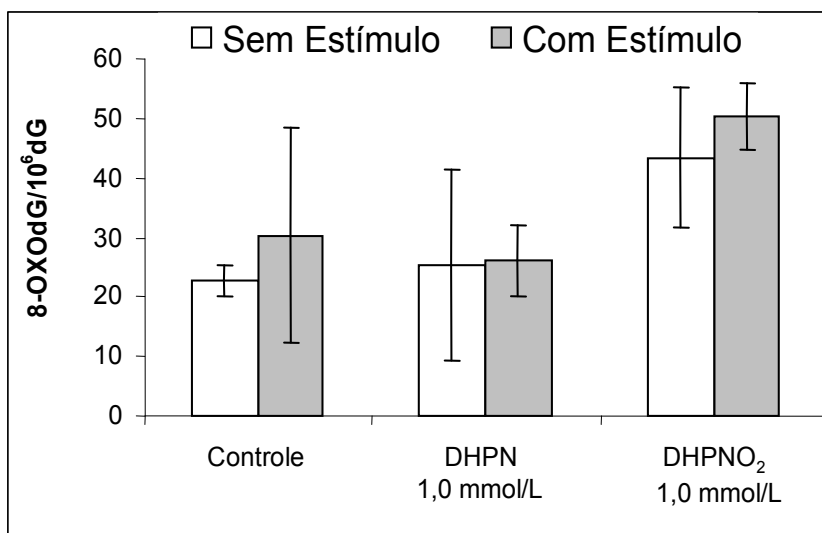
FIGURA 19 – NÍVEIS DA LESÃO 8-OXODG APÓS TRATAMENTO COM $^1\text{O}_2$ NAS CÉLULAS B16-F10



Quantidades de 8-oxodG do DNA extraído das células de melanoma murino (B16-F10) detectadas por HPLC com detecção eletroquímica, em triplicata. Os valores representam média \pm dp, (n = 2). *, diferente do controle e **, diferentes entre si, p < 0,05.

Para as células BHK-21 (FIGURA 20), observa-se uma tendência de aumento dos níveis da lesão 8-oxodG no tratamento com $^1\text{O}_2$, mas nesse caso a diferença não chegou a ser estatisticamente diferente, indicando a necessidade de confirmar esses resultados preliminares. Como seria de se esperar, não houve diferença significativa dos níveis da lesão quando se compara as células tratadas com endoperóxido com ou sem suplementação com L-tirosina, uma vez que essas células não são produtoras de melanina.

FIGURA 20 – NÍVEIS DA LESÃO 8-OXODG APÓS TRATAMENTO COM $^1\text{O}_2$ NAS CÉLULAS BHK-21



Quantidades de 8-oxo-dG do DNA extraído das células BHK-21 detectadas por HPLC com detecção eletroquímica, em duplicatas. Os valores representam média \pm dp, (n = 2).

7.5 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16-F10, SK-MEL E BHK-21

7.5.1 Análise ultraestrutural através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das células B16-F10, SK-MEL e BHK-21

As alterações ultra-estruturais e morfologia celular foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura. As eletromicrografias apresentadas nas figuras 21, 22 e 23 foram obtidas em experimentos em que as células B16-F10, SK-MEL E BHK-21 (5×10^3) foram plaqueadas e incubadas com L-tirosina e posterior tratamento com DHPNO₂, seguindo-se após esse período com a preparação das lamínulas para a observação das células por Microscopia Eletrônica de Varredura, como apresentado nos Materiais e Métodos (item 6.6.1).

As imagens panorâmicas (FIGURA 21, linhas 1 e 2, coluna A) das células B16-F10 controle e DHPN, em meio sem a suplementação de L-tirosina evidenciam através de MEV que as células apresentam-se confluentes. Observa-se empilhamento celular

(células sobrepostas) característico de células tumorigênicas. Em maior magnitude observa-se que as mesmas estão espalhadas, apresentam morfologia hexagonal. Há poucas projeções laterais de membranas na forma de filopódios. A superfície celular contém evidentes microespículas.

Na análise ultra-estrutural das células B16-F10 (FIGURA 21, linha 3, colunas A e B) que foram submetidas ao tratamento com DHPNO₂ 1,0 mmol/L, sem a suplementação de L-tirosina, observa-se em menor magnitude, característica alteração na organização destas células. Verifica-se que as células apresentam longas projeções membranosas. Em maior magnitude, as células estão menos espalhadas, apresentam-se ultra-estruturalmente mais alongadas. Emitem estreitos e longos processos membranosos a partir das bordas do corpo celular. A superfície celular (membrana plasmática) apresenta irregularidades com estruturas vesiculares brotando da superfície celular. Verifica-se perda das características microespículas da superfície celular e mantêm-se os processos laterais na forma de filopódios. O tratamento com maior concentração do DHPNO₂ – 5,0 mmol/L (FIGURA 21, linha 4 e coluna A e B) causou o aparecimento de vesículas de secreção e mais células em processo de morte celular do que as células tratadas com DHPNO₂ 1,0 mmol/L, apresentando redução do número de células as quais também emitem estreitos e longas projeções membranosas com ausência de filopódios.

Visualiza-se no “insert” (FIGURA 21, linha 3, coluna B), células em processo de morte celular e também vesículas de secreção.

Quando as células foram expostas ao meio contendo L-tirosina 0,5 mmol/L (FIGURA 21, linha 1 e coluna C e D) e também àquelas tratadas com DHPN – 5,0 mmol/L (FIGURA 21, linha 2 e coluna C e D) observa-se, em menor magnitude, uma morfologia planar, células mais achatadas, e menos sobrepostas que aquelas tratadas com L-tirosina 0,25 mmol/L, e em maior magnitude, nota-se uma menor quantidade de microespículas, projeções membranosas e ausência de filopódios.

O tratamento com DHPNO₂ – 1,0 e 5,0 mmol/L em meio contendo L-tirosina 0,5 mmol/L (FIGURA 21, linhas 3 e 4 e colunas C e D) apresentou maior número de

células menores e com a superfície coberta de um grande número de microespículas, diferente do controle. Existem muitas vesículas de secreção e células em processo de morte celular em comparação às células controle. Porém, em relação às células tratadas nessas mesmas condições, mas em meio com L-tirosina 0,25 mmol/L, observa-se um maior número de células espaiadas e mais achatadas, bem aderidas ao substrato e com projeções membranosas mais curtas.

A análise ultra-estrutural para as células SK-MEL do controle e DHPN expostas ao meio com L-tirosina 0,11 mmol/L, (FIGURA 22, linhas 1 e 2 e coluna A) evidencia, em menor magnitude, que as células apresentam-se confluentes, sobrepostas, aderidas ao substrato, com uma menor região de contato do seu corpo celular, demonstrando estarem menos achatadas. Há característica sobreposição celular com perda de inibição de contato. Em maior magnitude (FIGURA 22, linhas 1 e 2, coluna B) observa-se morfologia hexagonal, poucas microespículas para as células do controle, porém para as tratadas com DHPN nota-se um número maior de microespículas, ambas não apresentam expansões laterais de membrana. Nas células expostas ao DHPN em meio contendo 0,11 mmol/L de L-tirosina, também se verificou longos filopódios (FIGURA 22, linha 2, coluna B).

Verifica-se nas células SK-MEL, tratadas com o endoperóxido DHPNO₂ em meio sem a suplementação de L-tirosina (FIGURA 22, linha 3, colunas A), um menor número de células, com maior espaçamento celular, possivelmente em decorrência da menor capacidade de espraiamento celular. Nota-se em maior aumento (FIGURA 22, linha 3, colunas B) que as células apresentam-se menores, com um corpo celular mais alongado emitindo amplas projeções. Quando as células foram expostas ao meio contendo L-tirosina 0,44 mmol/L (FIGURA 22, linha 1 e colunas C e D), observa-se uma maior adesão de todo o corpo celular sobre o substrato, assumindo morfologia mais planar. Pode-se ainda notar que essas são menores e com evidentes projeções do corpo celular contendo amplos e longos filopódios.

O que mais chama a atenção são as células expostas à L-tirosina 0,44 mmol/L e tratadas com DHPNO₂ (FIGURA 22, linha 3, colunas C e D), observa-se uma menor população celular, menores extensões, finos prolongamentos celulares e evidentes e

amplios filopódios. Pode-se observar ainda, células pequenas e arredondadas presas ao substrato, característica de células com sofrimento celular ou morrendo. Também se notam características vesículas de secreção sendo secretada para o meio. Esses resultados demonstram que o tratamento com a suplementação de L-tirosina altera as condições morfológicas celulares.

Não foram observadas alterações morfológicas das células BHK-21 tratadas com DHPNO₂ (FIGURA 23, linha 3, colunas A e B) quando comparadas com as células controles (FIGURA 23, linhas 1 e 2, colunas A e B). As células apresentam-se planares, espaiadas e bem aderidas ao substrato, morfológicamente com o aspecto alongado, não emitem projeções membranares, sobre a superfície celular (microespículas) ou na borda das células (filopódios). As células emitem características projeções do corpo celular (projeções membranosas) fazendo com que as mesmas apresentem distintas formas celulares.

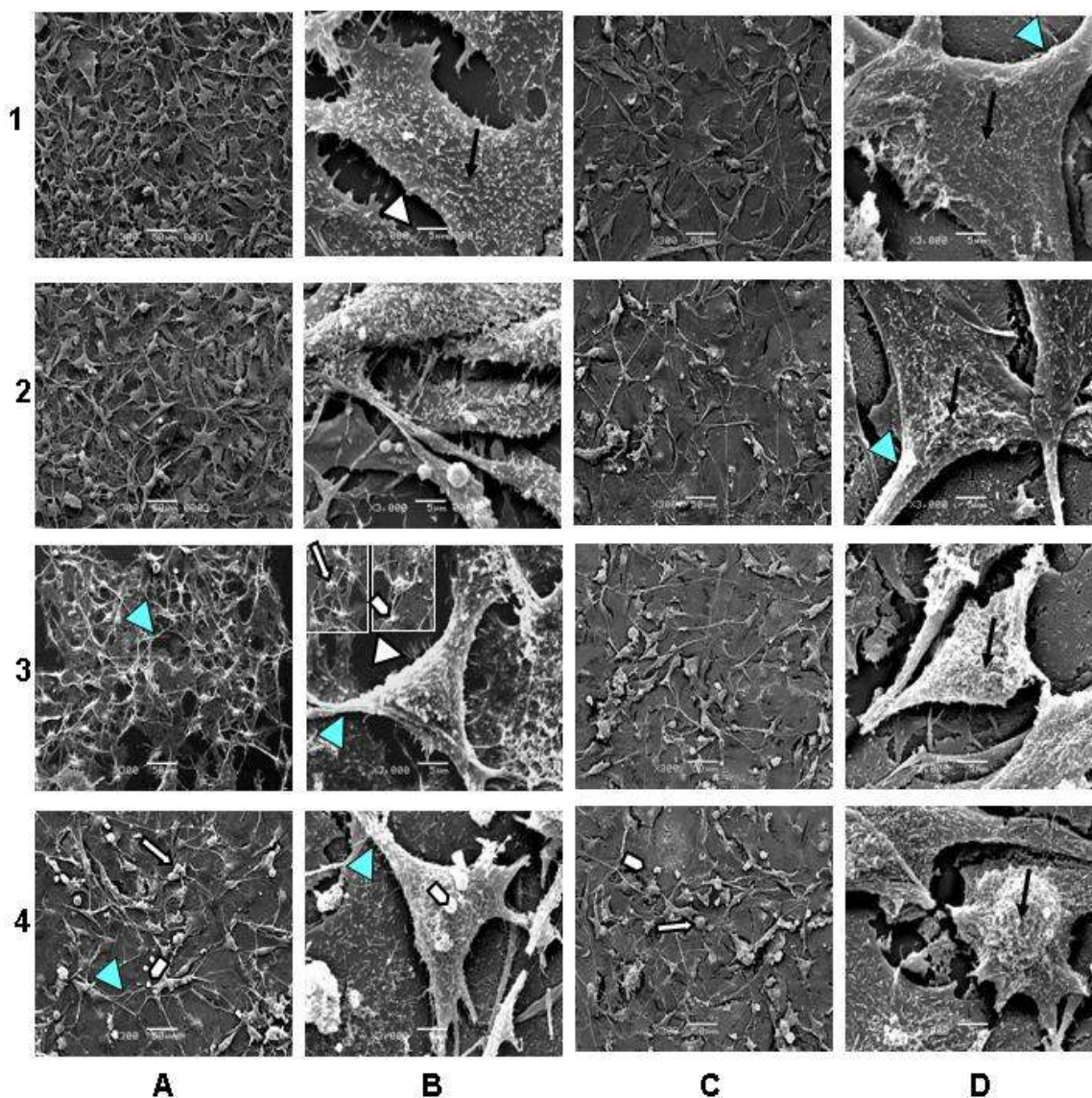
Os resultados obtidos na análise por microscopia eletrônica de varredura para as células produtoras de melanina (B16-F10 e SK-MEL) mostraram mudanças na morfologia, quando estas foram submetidas ao meio com L-tirosina 0,5 mmol/L. De fato, SCHWAHN *et al.* (2001) observaram mudanças morfológicas em melanócitos ao tratá-los com L-tirosina e α -MSH, apresentando-se completamente achatados.

Nas eletromicrografias das células de melanoma tratadas com DHPNO₂, em ambas as concentrações, existem muitas células redondas e soltas, bem como indícios de descolamento, sugerindo morte celular por “anoikis” (ROOS & KAINA, 2006). Este tipo de morte celular é apoptótica sendo induzida pela perda da adesão celular com o substrato ou outras células (VALENTIJN *et al.*, 2004 e ROOS & KAINA, 2006).

Esses resultados estão semelhantes àqueles de viabilidade celular, demonstrando que as células de melanoma são sensíveis ao DHPNO₂ e que as células não melanocíticas (BHK-21) não apresentam modificação em sua morfologia, bem como evidências de morte celular. Apesar da suplementação de L-tirosina causar modificações morfológicas nas células produtoras de melanina, em especial a B16-

F10, há fortes evidências de uma possível proteção por parte da melanina, pois as eletromicrografias demonstraram uma maior quantidade de células viáveis, quando comparadas às células que passaram pelos mesmos tratamentos com $^1\text{O}_2$ sem a suplementação de L-tirosina.

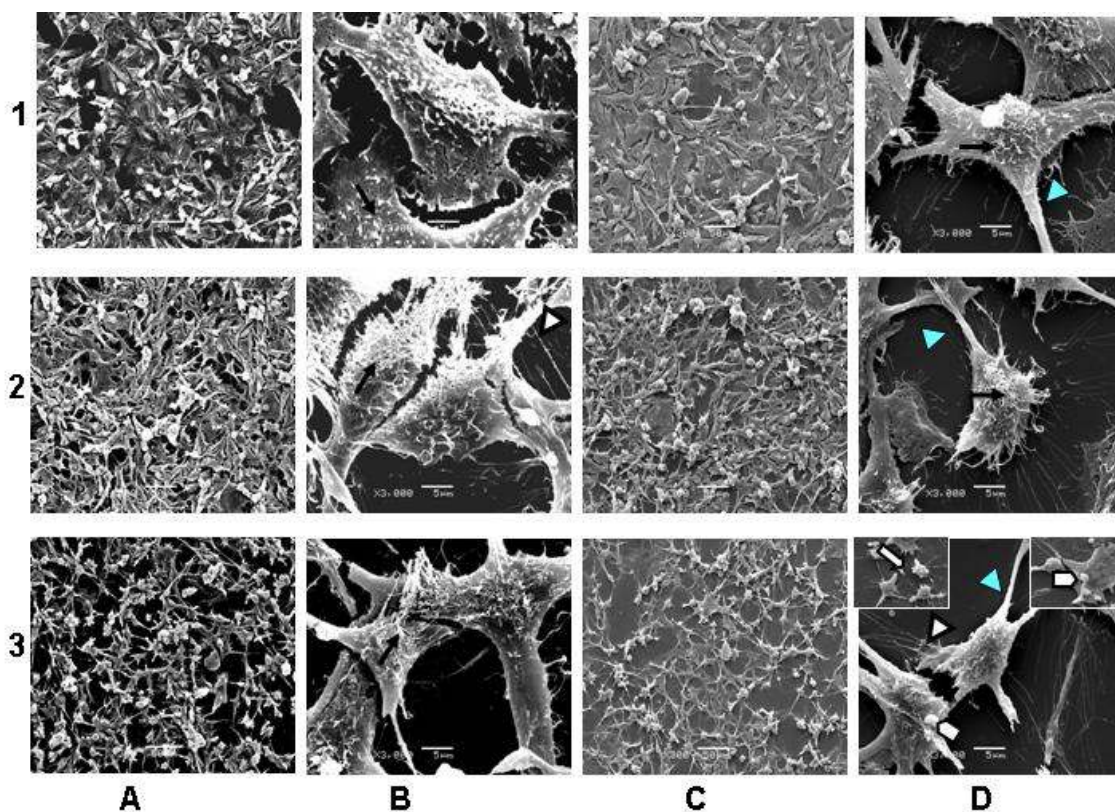
FIGURA 21 – EFEITO DO $^1\text{O}_2$ NA MORFOLOGIA CELULAR DAS CÉLULAS B16-F10 SUPLEMENTADAS OU NÃO COM L-TIROSINA



Eletromicrografias das células B16-F10 tratadas com $^1\text{O}_2$ em meio suplementado ou não com L-tirosina. As eletromicrografias das colunas **B** e **D** correspondem ao mesmo tratamento das colunas **A** e **C**, respectivamente, diferenciando apenas na magnitude das imagens. Magnitudes das colunas **A** e **C** 300x e **B** e **D** 3000x. As imagens **1A** e **1B** correspondem as células controles mantidas em meio contendo L-tirosina 0,25 mmol/L. As imagens **1C** e **1D** correspondem as células controles mantidas em meio contendo L-tirosina 0,5 mmol/L. As imagens **2A** e **2B** as células foram tratadas com DHPN 5,0 mmol/L em meio com L-tirosina 0,25 mmol/L. As **2C** e **2D** tratadas com DHPN 5,0 mmol/L em meio com L-tirosina 0,5 mmol/L. As **3A** e **3B** tratadas com DHPNO₂ 1,0 mmol/L em meio com L-tirosina 0,25 mmol/L. As **3C** e **3D**

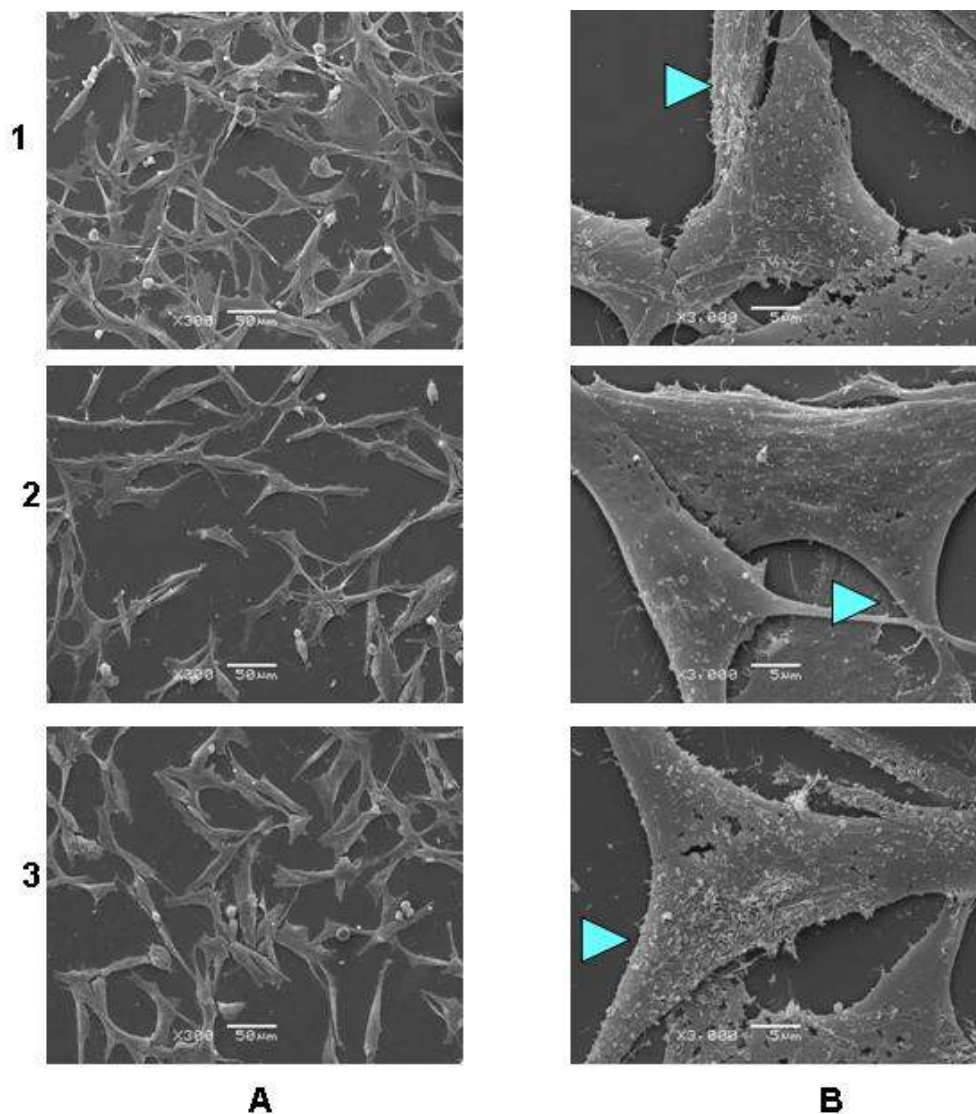
tratadas com DHPNO₂ 1,0 mmol/L em meio com L-tirosina 0,5 mmol/L. . As **4A** e **4B** tratadas com DHPNO₂ 5,0 mmol/L em meio com L-tirosina 0,25 mmol/L. As **4C** e **4D** tratadas com DHPNO₂ 5,0 mmol/L em meio com L-tirosina 0,5 mmol/L. Filopódios (▶), Microespículas (➡), Projeções membranosas (▷), Morte celular (⇔) e Vesículas (◻).

FIGURA 22 – EFEITO DO $^1\text{O}_2$ NA MORFOLOGIA CELULAR DAS CÉLULAS SK-MEL SUPLEMENTADAS OU NÃO COM L-TIROSINA



Células da linhagem SK-MEL foram tratadas com $^1\text{O}_2$ e L-tirosina, conforme descrito em Materiais e Métodos, item 6.6.1. As eletromicrografias das colunas **B** e **D** correspondem ao mesmo tratamento das colunas **A** e **C**, respectivamente, diferenciando apenas na magnitude das imagens. Magnitudes das colunas **A** e **C** 300x e **B** e **D** 3000x. As imagens **1A** e **1B** correspondem as células controles mantidas em meio contendo L-tirosina 0,11 mmol/L. As imagens **1C** e **1D** correspondem as células controles mantidas em meio contendo L-tirosina 0,44 mmol/L. As imagens **2A** e **2B** as células foram tratadas com DHPN 1,0 mmol/L em meio com L-tirosina 0,11 mmol/L. As **2C** e **2D** tratadas com DHPN 1,0 mmol/L em meio com L-tirosina 0,44 mmol/L. As **3A** e **3B** tratadas com DHPNO₂ 1,0 mmol/L em meio com L-tirosina 0,11 mmol/L. As **3C** e **3D** tratadas com DHPNO₂ 1,0 mmol/L em meio com L-tirosina 0,44 mmol/L. Filopódios (\blacktriangleright), Microespículas (\blackrightarrow), Projeções membranas (\blacktriangleleft), Morte Celular (\Rightarrow) e Vesículas (\square).

FIGURA 23 – EFEITO DO $^1\text{O}_2$ NA MORFOLOGIA CELULAR DAS CÉLULAS BHK-21 SUPLEMENTADAS OU NÃO COM L-TIROSINA



Avaliação morfológica das células BHK-21 tratadas com $^1\text{O}_2$ e L-tirosina, conforme descrito em Materiais e Métodos, item 6.6.1. As micrografias das colunas **A** e **B** correspondem ao mesmo tratamento, diferenciando na resolução das figuras (de 300 para 3000x, respectivamente). **(1A e 1B)** micrografias das células controle com L-tirosina 0,25 mmol/L. **(2A e 2B)** micrografias das células tratadas com DHPN 1,0 mmol/L em meio com L-tirosina 0,25 mmol/L. **(3A e 3B)** micrografias das células tratadas com DHPNO₂ 1,0 mmol/L em meio com L-tirosina 0,25 mmol/L. Projeções membranosas (▶).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O principal agente causador de doenças cutâneas é a radiação UV (SETLOW *et al.*, 1993; PERLIS & HERLYN, 2004). Estudos epidemiológicos mostram uma grande associação entre a formação de melanoma e a exposição à luz do sol (PERLIS & HERLYN, 2004). A radiação UV é uma fonte exógena de várias ROS, incluindo o $^1\text{O}_2$, que podem induzir mutações no DNA, danos a lipídeos e proteínas (KVAM & TYRRELL, 1999). Acredita-se geralmente que a melanina protege a pele dos efeitos da radiação UV, uma vez que indivíduos de pele escura são menos susceptíveis ao câncer de pele. Porém, há evidências que a melanina possui potencial para fotoproteção e fotossensibilização (KOWALCZUC *et al.*, 2001; BUSTAMANTE, *et al.*, 1993). Estudos em animais e humanos têm mostrado que a melanina pode agir como um sensibilizador na indução de melanoma pela radiação UVA (SETLOW *et al.*, 1993; LEY, 1997; MOAN *et al.*, 1999). Desta forma, considerando o papel contraditório da melanina, o principal objetivo desse trabalho foi investigar, em células produtoras desse pigmento, se a produção de melanina induzida pela L-tirosina, mostraria um papel protetor ou potencializador frente aos danos causados pelo $^1\text{O}_2$ nas células em estudo.

Os resultados de viabilidade celular realizado pelos métodos de Azul de Trypan e MTT foram semelhantes. As linhagens produtoras de melanina demonstraram que em baixas concentrações do composto DHPNO₂, a melanina não interfere na morte celular, pois os tratamentos com células estimuladas ou não, mostraram-se iguais estatisticamente. Entretanto, quando a quantidade do $^1\text{O}_2$ foi aumentada, observou-se um aumento na viabilidade celular das células estimuladas em relação às células não estimuladas, sugerindo que a melanina estaria protegendo as células. As células BHK-21, linhagem não produtora de melanina, apresentaram alta resistência ao efeito do $^1\text{O}_2$. Esses resultados reforçam o papel da melanina na morte celular, bem como, a citotoxicidade do $^1\text{O}_2$ em células de melanoma.

Embora, alguns resultados apontem que a melanina poderia proteger as células da morte e outros que ela não interferiria na viabilidade celular, a avaliação dos danos ao DNA mostraram que as células suplementadas com L-tirosina tiveram aumento significativo nos níveis da lesão 8-oxodG, sugerindo que a melanina poderia ser responsável pela indução desses danos em conjunto ao $^1\text{O}_2$.

KVAM & TYRRELL (1999), mostraram que células de melanoma humano (GLL19 e IGR1), após exposição à radiação UVA e com melanogênese estimulada, acumularam duas vezes mais danos oxidativos às bases do DNA do que as células não estimuladas. MARROT e colaboradores (1999) estudaram o efeito da melanogênese em melanócitos humanos normais estimulados com L-tirosina, constatando através de ensaio cometa que células estimuladas apresentaram mais quebras no DNA que àquelas não estimuladas. Nossos resultados estão de acordo com o apresentado por esses pesquisadores.

Dessa forma pode-se considerar que os danos oxidativos ao DNA não se apresentaram diretamente relacionados à morte celular em função da concentração de melanina nas células.

As eletromicrografias também evidenciaram diferenças entre as células estimuladas e não estimuladas, observando-se que as células suplementadas com L-tirosina tiveram sua morfologia alterada, mas também se visualizou um maior número de células aderidas em comparação às células que não foram submetidas à L-tirosina. As eletromicrografias das células BHK-21 concordam com os resultados de viabilidade celular, mostrando nenhuma alteração morfológica visível nesta linhagem, nem evidências de morte celular.

Estes resultados em conjunto mostram que a melanina e o $^1\text{O}_2$ interferem no sistema fisiológico celular das células de melanoma (B16-F10 e SK-MEL), causando danos e podendo levar ao processo de morte celular, essa associação pode contribuir para os estudos relacionados a terapias contra o câncer.

O presente trabalho abre novas possibilidades de estudos que possam contribuir para a compreensão do mecanismo de ação da melanina e do $^1\text{O}_2$ em células

de melanoma, uma vez que este tipo de câncer possui alta resistência a diversos tratamentos. Seria interessante utilizar vários tipos de melanomas humano, relacionados a diferentes fototipos de pele, avaliando-se assim, os danos causados pelo $^1\text{O}_2$ junto à melanina, sendo esta estimulada ou inibida.

Em nossos estudos fizemos o processamento das células para as diferentes análises após 2 h de exposição ao $^1\text{O}_2$, porém, seria também importante investigar o processo de morte celular, seus precursores e componentes, realizando o processamento dos experimentos em diferentes tempos. SUTO *et al.* (2005) com o objetivo de avaliar o tipo de morte celular causada pelo $^1\text{O}_2$ em células HepG2 e RBL, processou experimentos após 2, 16 e 22 h.

Também poderia ser avaliado o papel do α -MSH nas células de melanoma, no intuito de observar sua influência na morfologia celular e danos ao DNA. BÖHM e colaboradores (2005) mostraram que ao irradiar melanócitos humanos normais, o α -MSH reduz a apoptose causada pela radiação UVB e também diminui as lesões no DNA, em especial os dímeros pirimidínicos. A identificação dos caminhos ou estratégias para reduzir o acúmulo de danos ao DNA nas células seria importante para a compreensão do melanoma e desenvolvimento de novas terapias contra essa patologia.

9. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

1. O estímulo da melanogênese foi eficiente com a utilização de L-tirosina ou α -MSH.
2. As células produtoras de melanina (B16-F10 e SK-MEL) tratadas com $^1\text{O}_2$ apresentaram menor viabilidade celular em relação à linhagem não produtora de melanina;
3. No tratamento das células produtoras de melanina com DHPNO_2 nas concentrações de 0,5 e 1,0 mmol/L, a quantidade de melanina presente não influenciou na viabilidade celular;
4. Quando as células B16-F10 foram tratadas com maiores concentrações de DHPNO_2 (5,0 e 10,0 mmol/L) e estimuladas com L-tirosina (0,5 mmol/L), observou-se uma melhoria significativa na viabilidade celular, em relação às células não estimuladas;
5. A quantidade de melanina junto ao $^1\text{O}_2$ causou um aumento significativo da lesão altamente mutagênica, a 8-oxodG, nas células B16-F10 tratadas com DHPNO_2 em meio suplementado com L-tirosina 0,5 mmol/L;
6. As eletromicrografias além de mostrarem o efeito tóxico do $^1\text{O}_2$, exclusivamente nas células de melanoma, apontam para uma discreta proteção na morte celular por parte da melanina;
7. A morfologia celular da linhagem de melanoma murino B16-F10 e SK-MEL é alterada quando as células foram expostas a um meio enriquecido com 0,5 mmol/L de L-tirosina e DHPNO_2 .
8. As células BHK-21 não apresentaram alterações em sua morfologia quando tratadas com DHPNO_2 .

10. REFERÊNCIAS

ABDEL-MALEK, Z. A. Regulation of human pigmentation by ultraviolet light and by endocrine, paracrine, and autocrine hormones. In: NORDLUND J.J.; BOISSY R.E.; HEARING V. J.; KING R. A.; ORTONNE J. P. *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*, New York: Oxford Press; v. p. 115–122, 1998.

ABDEL-NASER, M. B; KRASAGAKIS, K.; GARBE, C.; EBERLE, J. Direct effects on proliferation, antigen expression and melanin synthesis of cultured normal human melanocytes in response to UVB and UVA light. *Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine*, Blackwell Munksgaard, v. 19, p. 122 – 127, 2003.

AGAR, N.; YOUNG, A. R. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage? *Mutation Research*, Amsterdam, v. 571, p. 121-132, 2005.

ADRAIN, C.; MARTIN, S. J. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochemical Sciences*, Amsterdam, v. 26, p. 390-397, 2001.

ANSON, R. M.; CROTEAU, D. L.; STIERUM, R. H.; FILBURN, C.; PARSELL, R.; BOHR, V. A. Homogenous repair of singlet oxygen-induced DNA damage in differentially transcribed regions and strands of human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*. Oxford, v.26, p. 662-668, 1998.

AUGUSTO, O. **Radicais Livres, bons, maus e naturais**. Oficina de Textos, São Paulo, 2006.

BAMIAS, A.; DIMOPOULOS, M. A. Thalidomide and immunomodulatory drugs in the treatment of câncer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, London, v. 14, p. 55-55, 2005.

BIOAGENCY – **Apoptose**. Disponível em : <[http:// www.bioagency.com.br](http://www.bioagency.com.br) > Acesso jan. 2006.

BOHM, M.; SCHOLZEN, T. E.; ROBINSON, S. J.; HEALY, E.; LUGER, T. A.; SCHWARZ, T.; SCHWARZ, A. α -Melanocyte-stimulating Hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage. *Journal of Biological Chemistry*, USA, v. 280, p. 5795-5802, 2005.

BOITEUX, S.; O'CONNOR, T.R.; LEDERER, F.; GOUYETTE, A.; LAVAL, J. Homogeneous *Escherichia coli* FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/apyrimidinic sites. *Journal of Biological Chemistry*, USA, v. 265, p. 3916-3922, 1990.

BOITEUX, S.; GAJEWSKI, E.; LAVAL, J.; DIZDAROGLU, M. Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase):

excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. **Biochemistry**, New York, v. 31, p. 106-110, 1992.

BOITEUX, S.; RADICELLA, J. P. The human *Ogg1* gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Orlando, v. 377, p. 1-8, 2000.

BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, London, v. 24, p. 19-33, 1995.

BONT, R.; LAREBEKE, N. V. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. **Mutagenesis**, USA, v. 19, p. 169-185, 2004.

BOULTON, M., DOCCHIO, F., DAYHAWBARKER, P., RAMPONI, R.; CUBEDDU, R. Age-related changes in the morphology, absorption and fluorescence of melanossomes and lipofuscin granules of the retinal pigment epithelium. **Vision Research**, Oxford, v. 30, p. 1291-1303, 1990.

BOULTON, M., ROZANOWSKA, M.; ROZANOWSKI, B. Retinal photodamage **Journal of Photochemistry and Photobiology B.**, Lausanne, v. 64, p. 144-161, 2001.

BOURRÉ, L.; ROUSSET, M.; THIBAUT, S.; ELÉOUET, S.; LAJAT, Y.; PATRICE, T. PDT effects of m-THPC and ALA, phototoxicity and apoptosis. **Apoptosis**, Amsterdam, v. 7, p. 221-230, 2002.

BRIVIBA, K.; KLOTZ, L.O.; SIES, H. Toxic and signaling effects of chemically or photochemically generated single oxygen in biological systems. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 378, p. 1259-1655, 1997.

BUCHKO, G. W.; WAGNER; R. J. CADET, J.; RAOUL, S. WEINFELD, M. Methylene blue-mediated photooxidation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1263, p. 17-24, 1995.

BUSTAMANTE, J.; GUERRA, L.; BREDESTON, L.; MORDOH, J.; BOVERIS, A. Melanin content and hydroperoxide metabolism in human melanoma cells. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 196, p. 172-176, 1991.

CADET, J.; BERGER, M.; DOUKI, T.; RAVANAT, J-P. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biological significance. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, Berlin, v. 131, p. 1-87, 1997.

CATANIA, A.; LIPTON, J. W. Alpha-Melanocyte stimulating hormone in the modulation of host reactions. **Endocrine Reviews**, USA, v. 14, p. 564-576, 1993.

CAVALCANTE, A. K. D.; MARTINEZ, G. R.; DI MASCIO, P.; MENCK, C. F. M.; AGNEZ-LIMA, L. F. Citotoxicity and mutagenesis induced by singlet oxygen in wild

type and DNA repair deficient *Escherichia coli* strains. **DNA Repair**, Amsterdam, v. 1, p. 1051-1056, 2002.

CHEDEKEL, M. R., SMITH, S. K., POST, P. W., POKORA, A.; VESSELL, D. L. Photodestruction of Pheomelanin: Role of oxygen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 75, p. 5395-5399, 1978.

CHISTOPHOROU, M. A.; RINGSHAUSEN, I.; FINCH, A. J.; SWIGART, B. L.; EVAN, G. I. The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. **Nature**, London, v.443, p. 1219-1225, 2006

COOKE, M. S.; EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **FASEB Journal**, New York, v. 17, p. 1195-1214, 2003.

COSSO, R. G.; TURIM, J.; NANTES, I. L.; ALMEIDA, A. M.; DI MASCIO, P.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition induced by chemically generated singlet oxygen. **Journal Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 34, p. 157-163, 2002.

DAYHAW-BARKER, P.; DAVIES, S.; SHAMSI, F.; ROZANOWSKA, M.; ROZANOWSKI, B.; BOULTON, M. The phototoxicity of aged RPE melanosomes. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Philadelphia, v. 42, S755, 2001.

DEVASAGAYAM, T. P.; SUNDQUIST, A. R.; DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Activity of thiols as singlet molecular oxygen quenchers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, Lausanne, v. 09, p. 105-116, 1991.

DEXTER, T. J.; BENNETT, D. C. Differentiation apparently repressed by the nucleus. Rapidly-induced pigmentation of enucleated melanoma cells. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 168, p. 255-264, 1987.

DEWILDE, A.; PELLIEUX, C.; PIERLOT, C.; WATTRÉ P.; AUBRY, J. M. Inactivation of intracellular and non-enveloped viruses by a non-ionic naphthalene endoperoxide. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 379, p. 1377-1379, 1998.

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

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

EBLIN, K. E., BOWEN, M. E., CROMEY, D. W., BREDFELDT, T. G., MASH, E. A. LAU, S. S., GANDOLFI, A. J. Arsenite and monomethylarsonous acid generate oxidative stress response in human bladder cell culture. **Toxicology and Applied Pharmacology**, California, v. 217, p. 7-14, 2006.

ELDER, D. E. Human melanocytic neoplasm and their etiology relationship with sunlight. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v.92, p. 297 – 303, 1989.

ELLER, M. S.; OSTROM, K.; GILCHREST, B. A. DNA damage enhances melanogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 93, p. 1087-1092, 1996.

ELLER, M. S.; GILCHREST, B. A. Tanning as part of the eukaryotic SOS response. **Pigment Cell Research**, USA, v.13, p. 94-97. 2000.

EPE, B.; PFLAUM, M, BOITEUX, S. DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 299, p. 135-145, 1993.

EPE, B.; BALLMAIER, D.; ADAM, W.; GRIMM, G. N.; SAHA-MÖLLER, C. R. Photolysis of n-hydroxypyridine-thiones, a new source of hydroxyl radicals for the direct damage of cell-free and cellular DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 24, p. 1625-1631, 1996.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 11, p. 81-125, 1991.

FIALA, E. S; CONAWAY, C. C.; MATHIS, J. E. Oxidative DNA e RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane, **Cancer Research**, Baltimore, v. 49, p. 5518-5522, 1989.

FINKEL, T. AND HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, London, v. 408, p. 239-247, 2000.

FLOYD, R. A.; WEST, M. S.; ENEFF, K. L.; SCHNEIDER, J. E. Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine sensitive detection and mechanisms of formation. **Free Radical Research Communications**, London, v. 1, p. 163-172, 1986.

FLOYD, R. A.; WATSON, J. J.; WONG, P. K.; ALTMILLER, D. H.; RICKARD, R. C. Methylene blue plus light mediates 8-hydroxyguanine formation in DNA. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Orlando, v. 273, p. 106-111, 1989.

FLOYD, R.A. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 11, p. 1447-1450, 1990.

FOOTE, C. S.; CLENNAN, E. L. Properties and reactions of singlet oxygen. London: **Blackie Academic and Professional**, p. 105-141, 1995.

FOUNDATION SKIN CANCER - **Melanoma**. Disponível em: <<http://www.skincancer.org>> Acesso jan. 2007.

GEN, W.; TANI, M.; TAKESHITA, J.; EBIHARA, Y.; TAMAKI, K. Mechanisms of Ca^{2+} overload induced by extracellular H_2O_2 in quiescent isolated ratcardiomyocytes. **Basic Research in Cardiology**, Alemanha, v. 6, p. 623-629, 2001.

GIACOMONI, P. U. Open questions in photobiology III. Melanin and photoprotection. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, Lausanne, v. 29, p. 87-89, 1995.

GODAR, D. E.; THOMAS, D. P; MILLER S. A.; LEE W. Long-wavelength UVA radiation induces oxidative stress, cytoskeletal, damage and hemolysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 57, p.12018 – 11026, 1993.

GREEN, D.; REED, J. C. M. Mitochondria and apoptosis. **Science**, Washington, v. 281, p. 1309-1312, 1998.

HAANEN, C.; VERMES, I. Apoptosis: Programmed cell death in fetal development. **European Journal of Obstetrics & Gynecology**, Amsterdam, v. 64, p. 129-133, 1996.

HADDAD, M. M.; XU, W.; SCHWAHN, D. J.; LIAO, F.; MEDRANO, E. E. Activation of a cAMP pathway and induction of Melanogenesis correlate with association of p16INK4 and p27KIP1 to CDKs, loss of E2F-binding activity, and premature senescence of human melanocytes. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 253, p. 561–572, 1999.

HALABAN, R.; LANGDON, R.; BIRCHALL, N.; CUONO, C.; BAIRD, A.; SCOTT, G.; MOELLMANN, G.; MCGUIRE, J. Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 107, p. 1611-1619, 1988.

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

HANES, J. W.; THAL, D. M.; JOHNSON, K. A. Incorporation and replication of 8-oxo-deoxyguanosine by the human mitochondrial DNA polymerase. **Journal Biological Chemistry**, USA, v. 281, p. 36241-36248, 2006.

HANLEY, W. B.; LEE, A. W.; HANLEY, A. J.; LEHOTAY, D. C.; AUSTIN, V. J.; SCHOONEYT, W. E.; PLATT, B. A.; CLARKE, J. T. Hypotyrosinemia' in phenylketonuria. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 69, p. 286–294, 2000

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, London, v. 407, p. 770-776, 2000.

HILL, H. Z. The function of melanin or six blind people examine an elephant. **Bioessays**, Cambridge, v. 14, p. 49-56, 1992.

HILL, H. Z.; HILL, G. J. UVA, pheomelanin and the carcinogenesis of melanoma. **Pigment Cell Research**, USA, v. 13, p. 140-144, 2000.

HOOGDUIJN, M. J.; SMIT, N. P.; LAARSE, V. D.; NIEUWPOORT, F. V.; WOOD, J. M.; THODY, A. J. Melanin has a role in Ca^{2+} homeostasis in human melanocytes. **Pigment Cell Research**, USA, v. 16, p.127-132, 2003

HOOGDUIJN, M. J.; CEMELI E.; ROSS, K.; ANDERSON, D.; THODY, A. J.; WOOD, J. M. Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H_2O_2 -induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca^{2+} . **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 294, p. 60 - 67, 2004.

HUR, G. M.; KIM, Y-S; WON, M.; CHOKSI, S.; LIU, Z-G. The death domain kinase RIP has an important role in DNA damage-induced, p53-independent cell death. **Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 281, p. 25011-25017, 2006.

IMOKAWA. G.; YADA, Y.; MIYAGISHI. Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. **Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 267, p. 24675-24680, 1992.

INCA (Instituto Nacional do Câncer) – Ministério da Saúde. **Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer**. Disponível em : <<http://www.inca.gov.br>> Acesso jan. 2007.

ITO, S. Advances in chemical analysis of melanins. In: NORDLUND, J. J.; BOISSY, R. E.; HEARING, V. J.; KING, R. A.; ORTONNE, J. P. (eds). **The pigmentary system: physiology and pathophysiology**, New York: Oxford University Press, p. 439- 450, 1998.

ITO, S.; WAKAMATSU, K.; OZEKI, H.; Chemical analysis of melanins and its application to the regulation of melanogenesis. **Pigment Cell Research**, USA, v. 13, p.103-109, 2000.

ITO, S.; WAKAMATSU, K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice and other animals: a comparative review. **Pigment Cell Research**, USA, v. 16, p.523-531, 2003.

JHAPPAN, C.; NOOMAN, F. P.; MERLINO, G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. **Oncogene**, Basingstoke, v. 22, p. 3099-3112, 2003.

JOHNSTON, D.; ORLOW, S. J.; LEVY, E.; BYSTRYN, J-D. Induction of B16 melanoma melanogenesis by a serum-free synthetic medium. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 201, p. 91-98, 1992.

KALYANARAMAN, B.; KORYTOWSKI, W.; PILAS, B., SARNA, T.; LAND, E. J.; TRUSCOTT, T. G. Reaction between ortho semiquinonas and oxygen: Pulse radiolysis spin electron resonance and oxygen uptake studies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Orlando, v. 266, p. 277-284, 1988.

KAMEYAMA, K.; MONTAGUE, P. M.; HEARING, V. J. Expression of melanocytes-stimulating hormone receptors correlates with mammalian pigmentation, and be modulated by interferons. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 137, p. 35-44, 1988.

KANOFSKY, J. R. Singlet oxygen production by biological systems. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 70, p. 1-28, 1989.

KARAKAYA, A.; JARUGA, P.; BOHR, V. A.; GROLLMAN, A. P.; DIZDAROGLU, M. Kinetics of excision of purine lesions from DNA by *Escherichia coli* Fpg protein. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 474-479, 1997.

KASAI, H.; CRAIN, P. F.; KUCHINO, Y.; NISHIMURA, S.; OOTSUYAMA, A.; TANOOKA, H. Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 7, p. 1849-1851, 1986.

KASIBHATLA, S.; BRUNNER, T.; GENESTIER, L.; ECHEVERRI, F.; MAHBOUBI, A.; GREEN, D. R. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF- κ B and AP-1. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 1, p. 543-551, 1998.

KASPER, B.; D'HONDT, V.; VEREECKEN, P.; AWADA, A. Novel treatment strategies for malignant melanoma: A new beginning? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, USA, Article in press, 2007.

KASRAEE, B.; HÜGIN, A.; TRAN, C.; SORG, O.; SAURAT, J-H. Methimazole is an inhibitor of melanin synthesis in cultured B16 melanocytes. **Journal of Investigative Dermatology**. Baltimore, v.122, p. 1338-1341, 2004.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v. 26, p. 239-257, 1972.

KNAPOWSKI, J.; WIECZOROWSKA – TOBIS, K.; WITOWSKI, J. Pathophysiology of Ageing. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Polônia, v. 53, p.135-146, 2002.

KOCHEVAR, I. E.; LYNCH, M. C., ZHUANG, LAMBERT, C. R. Singlet oxygen, but not oxidizing radicals, induces apoptosis in HL-60 cells. **Photochemistry Photobiology**, Oxford, v. 72, p. 548-553, 2000.

KOCHEVAR, I. E.; REDMOND, R. W. Photosensitized production of singlet oxygen. **Methods in Enzymology**, New York, v. 319, p. 20-28, 2000.

KOLAROVA, H.; NEVRELOVA, P.; BAJGAR, R.; JIROVA, D.; KEJLOVA, K.; STRNAD, M. In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 21, p. 249-253, 2007.

KORYTOWSKI, W.; KALYANARAMAN, B.; MENON, I. A.; SARNA, T. & SEALY, R. C. Reaction of superoxide anions with melanins: electron spin resonance and spin trapping studies **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 882, p.145-153, 1986.

KORYTOWSKI, W.; PILAS, B.; SARNA, T.; KALYANARAMAN, B. Photoinduced generation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in melanins. . **Photochemistry Photobiology**, Oxford, v. 45, p. 185-190, 1987

KORYTOWSKI, W.; SARNA, T. Bleaching of melanin pigments role of copper ions and hydrogen peroxide in autooxidation and photooxidation of synthetic dopa-melanin. **Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 265, p. 12410-12416, 1990.

KOWALCZUK, C.; PRIESTNER, M.; BALLER, C.; PEARSON, A.; CRIDLAND, N.; SAUNDERS, R.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Effect of increased intracellular melanin concentration on survival of human melanoma cells exposed to different wavelengths of UV radiation. **International Journal of Radiation Biology**, London, v. 77, p. 883-889, 2001.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, p. 463-471, 1999.

KROCAN, H. E.; STANDAL, R.; SLUPPHAUG, G. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. **Biochemistry Journal**, London, v. 325, p. 1-16, 1997.

KVAM, E.; TYRRELL, R. M. The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet a irradiation of DNA or melanoma cells. **Journal of Investigative Dermatology**. Baltimore, v.113, p. 209-213, 1999.

LANE, D. P. p53, guardian of the genome. **Nature**, London, v. 358, p. 15-16. 1992

LARSSON, P.; ANDERSSON, E.; JOHANSSON, U.; ÖLLINGER, K.; ROSDAHL, I. Ultraviolet A and B affect human melanocytes and keratinocytes differently. A study of oxidative alterations and apoptosis. **Experimental Dermatology**, v. 14, p. 117-123, 2005.

LEE, J. M.; BERNSTEIN, A. Apoptosis, cancer and the P53 tumor suppressor gene. **Cancer and Metastasis Reviews**, Boston, v.14, p. 149-161, 1995.

LENAZ, G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1366, p. 53-67, 1998.

LEY, R. D. Ultraviolet radiation A-induced precursors of cutaneous melanoma in *Monodelphis domestica*. **Cancer Research**, Baltimore, v.57, p. 3682-3684, 1997.

LINDAHL, T.; WOOD, R. D. Quality control by DNA repair. **Science**, Washington, v. 286, p. 1897-1905, 1999.

LIU, Z.; LU, H.; SHI, H.; DU, Y.; YU, Y.; GU, S.; CHEN, X.; LIU, J. K.; HU, C. A. PUMA overexpression induces reactive oxygen species generation and proteasome-mediated stathmin degradation in colorectal cancer cells. **Cancer Research**, Baltimore, v.65, p. 1647-1654, 2005.

LOTZE, M. T.; DALLAL, R. M.; KIRKWOOD, J. M.; FLICKINGER, J. C. Melanoma: Cutaneous melanoma. DEVITA, V. T. Jr; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. In: **Cancer: Principles and Practice of Oncology**, 6 ed. Lippincott and Williams & Wilkins, 2001.

MACCUBBIN, A. E.; PRZYBYSZEWSKI, J.; EVANS, M. S. DNA damage in UVB-irradiated keratinocytes. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 16, p. 1659-1660, 1995.

MARCHETTI, P.; DECAUDIN, D.; MACHO, A.; ZAMZAMI, N.; HIRSCH, T.; SUSIN, S. A.; KROEMER, G. Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status on mitochondrial function. **European Journal of Immunology**, Alemanha, v. 27, p. 289-296, 1997.

MARKOVIC, S. N.; GEYER, S. M.; DAWKINS F.; SHARFMAN, W.; ALBERTINI, M.; MAPLES, W.; FRACASSO, P. M.; FITCH, T.; LORUSSO, P.; ADJEI, A. A.; ERLICHMAN, C. A phase II study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma. **Cancer**, USA, v. 103, p. 2584-2589, 2005.

MARNETT, L. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, p.361-370, 2000.

MARROT, L; BELAIDI, J-P.; MEUNIER, J-R.; PEREZ, P.; AGAPAKIS-CAUSSE, C. The human Melanocyte as a particular target for UVA Radiation and an Endpoint for Photoprotection Assessment. **Photochemistry Photobiology**, Oxford, v. 69, p. 686-693, 1999.

MARTINEZ, G. R.; DI MASCIO, P.; BONINI, M.; AUGUSTO, O.; BRIVIBA, K.; SIES, H.; MAURER, P.; ROTHLSBERGER, U.; HEROLD, S.; KOPPENOL, W. Peroxynitrite does not decompose to singlet oxygen ($^1\Delta_g O_2$) and nitrosyl (NO).

Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, v. 97, p. 10307-10312, 2000.

MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Utilização de endoperóxidos de derivados de naftaleno como fontes químicas de $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, p. 686-689, 2000.

MARTINEZ, G. R. ; RAVANAT, J-L. ; MEDEIROS, M. H. G. ; CADET, J. ; DI MASCIO, P. Synthesis of a naphthalene endoperoxide as a source of ^{18}O -labeled singlet oxygen for mechanistic studies. **Journal of the American Chemical Society**, USA, v. 122, p. 10212-10213, 2000.

MARTINEZ, G. R. **Geração química de oxigênio-18 molecular no estado singlete, $^{18}\text{O}_2$ ($^1\Delta_g \text{O}_2$) e estudos de lesões em DNA**. São Paulo, 2003. Tese (Doutorado em Ciências Bioquímica) Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

MARTINEZ, G. R., GASPARUTTO, D., RAVANAT, J-L., CADET, J., MEDEIROS, M. H. G., DI MASCIO, P. Identification of the main oxidation products of 8-methoxy-2'-deoxyguanosine by singlet molecular oxygen. **Free Radical Biology & Medicine**. New York, v. 38, p 1491-1500, 2005.

MICHAELS, M. L.; TCHOU, J.; GROLLMAN, A. P.; MILLER, J. H. A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. **Biochemistry**, New York, v. 31, p. 10964-10968, 1992.

MIYAMOTO, S.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Singlet molecular oxygen generated from lipid hydroperoxides by the Russell Mechanism: Studies using ^{18}O -labeled linoleic acid hydroperoxide and monomol light emission measurements. **Journal of the American Chemical Society**, USA, v. 125, p. 6172-6179, 2003.

MOAN, J.; DAHLBALCK, A.; SEATLOW, R.B. Epidemiological support for an hypothesis for melanoma induction indicating a role for UVA radiation. **Photochemistry Photobiology**, Oxford, v. 70, p. 243-247, 1999.

MORISON, W. L. What is the function of melanin? **Archives of Dermatology**, New York, v. 121, p. 1160-1163, 1985.

NIEUWPOORT, F. V.; SMITH, N. P. M.; KOLB, R.; MEULEN, V. D. H.; KOERTEN, H.; PAVEL, S. Tyrosine-induced melanogenesis shows differences in morphologic and melanogenic preferences melanosomes from light and dark skin types. **Journal of Investigative Dermatology**. Baltimore, v. 122, p. 1251-1255, 2004.

NOFSINGER, J. B.; LIU, Y.; SIMON J. D. Aggregation of eumelanin mitigates photogeneration of reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 32, p. 720-730. 2002.

OTSU, K.; SATO, K.; IKEDA, Y.; IMAI, H.; NAKAGAWA, Y.; OHBA, Y.; FUJII, J. An abortive apoptotic pathway induced by singlet oxygen is due to the suppression of caspase activation, **Biochemistry Journal**, London, v. 389, p. 197-206, 2005.

PELICANO, H.; CARNEY, D.; HUANG, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug Resistance Updates**, Houston, v. 7, p. 97-110, 2004.

PERLIS, C.; HERLYN, M. Recent advances in melanoma biology. **The Oncologist**, USA, v. 9, p. 182-187, 2004.

PETER, I.; MEZZACASA, A.; LEDONNE, P.; DUMMOLLER, R.; HEMMOLLI, S. Comparative analysis of immunocritical melanoma markers in the mouse melanoma cell lines B16, K1735 and S91-M3. **Melanoma Research**, London, v. 11, p. 21-30, 2001.

PHILLIPS, H. J. Dye exclusions tests for cell viability. In: **Tissue Culture, methods and applications**, Kruse, J. R.; Patterson, J. R. M. K. (eds). A. P.: New York, p. 406-408, 1973.

PIERLOT, C.; AUBRY, J. M.; BRIVIBA, K.; SIES, H.; DI MASCIO, P. Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. **Methods in Enzymology**, New York, v. 319, p. 3-20, 2000.

PIRO, L. D. Apoptosis, Bcl-2 antisense, and cancer therapy. **Oncology**, Basel, v. 18, p. 5-10, 2004.

POURZAND, C.; TYRRELL, R. M. Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar UV radiation. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 70, p. 380-390, 1999.

RANADIVE, N. S.; MENON, I. A. Role of reactive oxygen species and free radicals from melanins in photoinduced cutaneous inflammations. **Pathology and Immunopathology Research**, Basel, v. 5, p. 118-139, 1986.

RANAVAT, J.-L.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; CADET, J. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. **Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 275, p. 40601- 40604, 2000.

RANAVAT, J.-L.; SAINT-PIERRE, C.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; CADET, J. Damage to isolated DNA mediated by singlet oxygen. **Helvetica Chimica Acta**, Suiça, v. 84, p. 3702-3709, 2001.

REES J. L.; HEALY E. Melanocortin receptors, red hair and skin cancer. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, Malden, v. 2, p. 94-98, 1997.

REILLY, T. P.; BELLEVUE, F. H.; WOSTER, P. M.; SVENSSON, C. K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of

sulfamethoxazole and dapsons. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 55, p.803-810, 1998.

RIBAS, A.; CAMACHO, L. H.; LOPEZ-BERESTEIN, G. Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte associate antigen-4 monoclonal antibody CP-675,206. **Journal of Clinical Oncology**, USA, v. 23, p. 8968-8977, 2005.

RIEBER, M. S.; RIEBER, M. Specific tyrosinases associated with melanoma replicative senescence and melanogenesis. **Cancer Research**, Baltimore, v. 53, p. 2469-3471, 1993.

RIVOLTINI, L.; CASTELLI, C.; CARRABBA, M.; MAZZAFERRO, V.; PILLA, L.; HUBER, V.; COPPA, J.; GALLINO, G.; SCHEIBENBOGEN, C.; SQUARCINA, P.; COVA, A.; CAMERINI, R.; LEWIS, J. J.; SRIVASTAVA, P. K.; PARMIANI, G. Human tumor-derived heat shock protein 96 mediates in vitro activation and in vivo expansion of melanoma- and colon carcinoma-specific T cells. **Journal of Immunology**; Baltimore, v.171, p.3467-3474, 2003.

ROOS, P. W.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **TRENDS in Molecular Medicine**, USA, v. 12, p. 440-450, 2006.

ROUZAUD, F.; KADEKARO, A. L.; ABDEL-MALEK, Z. A.; HEARING, V. J. MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 571, p. 133-152, 2005.

ROZANOWSKA, M.; BOBER, A.; BURKE, J.; SARNA, T. The role of retinal pigment epithelium melanin in photoinduced oxidation of ascorbate. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 65, p. 472-479,1997.

ROZANOWSKA, M.; SARNA, T.; LAND, E.; TRUSCOTT, T. Free radical scavenging properties of melanin: Interaction of eu and pheomelanin models with reducing and oxidizing radicals. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, p.518-525, 1999.

ROZANOWSKA, M., KORYTOWSKI, W., ROZANOWSKI, B., SKUMATZ, C., BOULTON, M., BURKE, J.; SARNA, T. Photoreactivity of aged human RPE melanossomes a comparison with lipofuscin. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Philadelphia, v. 43, p. 2088-2096, 2002.

SARNA, T., DULEBA, A.; KORYTOWSKI, W.; SWARTZ, H. M. Interaction of melanin with oxygen. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Orlando, v. 200, p. 140-148, 1980.

SARNA, T.; MENON, I. A.; SEALY, R. C. Photosensitization of melanins: a comparative study. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v.42, p.529-532, 1984.

SARNA, T.; PILAS, B.; LAND, E. J.; TRUSCOTT, G. Interaction of radicals from water radiolysis with melanin. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 883, p. 162-167, 1986.

SARNA, T. New trends in photobiology: Properties and function of the ocular melanin a photobiophysical view. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, Lausanne, v. 12, p.215-258, 1992.

SARNA, T., BURKE, J.; KORYTOWSKI, W.; ROZANOWSKA, M.; SKUMATZ, C.; ZAREBA, A.; ZAREBA, M. Loss of melanin from human RPE with aging: possible role of melanin photooxidation. **Experimental Eye Research**, London, v. 76, p. 89-98, 2003.

SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**, London, v. 407, p. 784-788, 2000.

SCHNEIDER, J. E.; PRICE, S. MAIDT, L.; GUTTERIDGE, J. M. C.; FLOYD, R. A. Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p. 631-635, 1990.

SCHULZ, I.; MAHLER, H-C.; BOITEUX, S.; EPE, B. Oxidative DNA base damage induced by singlet oxygen and photosensitization: recognition by repair endonucleases and mutagenicity. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 461, p. 145-156, 2000.

SCHWAHN, D. J.; XU, W.; HERRIN, A. B.; BALES, E.S.; MEDRANO, E. E. Tyrosine levels regulate the melanogenic response to α -melanocyte-stimulating hormone in human melanocytes: implications for pigmentation and proliferation. **Pigment Cell Research**, USA, v.14, p. 32-39, 2001.

SEALY, R. C.; FELIX, C. C.; HYDE, J. S.; SWARTZ, H. M. **Free Radicals in Biology**, ed. Pryor, W. A. v. 4, p. 209-259, 1980.

SEALY, R. C.; SARNA, T.; WANNER, E. J.; RESZKA, K. Photosensitization of melanin: an electron spin resonance study of sensitized radical production and oxygen consumption. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 40, p. 453-459, 1984.

SEATLOW, R. B.; GRIST, E.; THOMPSON, K.; WOODHEAD, A. D. Wavelengths affective in induction of malignant melanoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 90, 6666-6670, 1993.

SHIBUTANI, S.; TAKESHITA, M.; GROLLMSN, A. P. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damage base 8-oxodG. **Nature**, London, v. 349, p. 431-434, 1991.

SHIGENAGA, M. K.; PARK, J.-W.; CUNDY, K. C.; GIMENO, C. J.; AMES, B. N. In vivo oxidative DNA damage measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in

DNA and urine by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p. 521-530, 1990.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie International**, Alemanha, v. 25, p. 1058-1071, 1986.

SILVEIRA, R. B.; SANTOS, J. F.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spider. **Toxicon**, New York, v. 40, p. 815-822, 2002.

SIMON, H.-U.; HAJ-YEHIA, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis**, v. 5, p. 415-418, 2000.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H.E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 531, p. 231-251, 2003.

SOBER, A. J.; KHO, H. K. Melanoma e outras lesões cutâneas pigmentadas. In: ISSELBACHER K. J.; BRAUNWALD, E.; WILSON, J. D.; MARTIN, J. B.; FAUCI, A. S.; KASPER, D. L. (Ed). **Harrison: Medicina Interna**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill. p. 1958-1962. 1995

STEINBECK, M. J.; KHAN, A. U.; KARNOVSKY, M. J. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical. **Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 267, p. 13425-13433, 1992.

SUTO, D.; SATO, K.; OHBA, Y.; YOSHIMURA, T.; FUJII, J. Suppression of the pro-apoptotic function of cytochrome *c* by singlet oxygen via a haem redox state-independent mechanism. **Biochemistry Journal**, London, v. 392, p. 399-406, 2005.

TAKEUCHI, S.; ZHANG, W.; WAKAMATSU, K.; ITO, S.; HEARING, V. J.; KRAEMER, K. H.; BRASH, E. Melanin acts as a potent UVB photosensitizer to cause an atypical mode of cell death in murine skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA., v. 101, p. 15076-15081, 2004.

TARHINI, A. A.; AGARWALA, S. S. Novel agents in development for treatment of melanoma. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, London, v. 14, p. 885-892, 2005.

TCHOU, J.; BODEPUDI, V.; SHIBUTANI, S.; ANTOSHECHKIN, I.; MILLER, J.; GROLLMAN, A. P.; JOHNSON, F. Substrate specificity of Fpg protein. **Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 269, p. 15318-15324, 1994.

TENTORI, L.; LEONETTI, C.; SCARSELLA, M.; MUZI, A.; VERGATI, M.; FORINI, O.; LACAL, P. M.; RUFFINI, F.; GOLD, B.; LI, E.; ZHANG, J.; GRAZIANI, G. Poly(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor as chemosensitizer of

malignant melanoma for temozolomide. **European Journal of Cancer**, Oxford, v.41, p. 2948-2957, 2005

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, Washington, v. 267, p. 1456-1462, 1995.

VALENTIJN, A. J.; ZOUQ, N.; GILMORE, A. P. Anoikis. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 32, p. 421-425, 2004.

VAN DER KEMP, P. A.; THOMAS, D.; BARBEY, R.; OLIVEIRA, R. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the Ogg1 gene of *Sacharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanina and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 93, p. 5197-5202, 1996.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.243, p. 167-190, 2000.

WANG, L.; HIRAYASU, K.; ISHIZAWA, M.; KOBAYASHI, Y. Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 1774-1775, 1994.

WANG, Y.; ROSENSTEIN, B.; GOLDWYN, S.; ZHANG, X.; LEBWOHL, M.; WEI, H. Differential regulation of P53 and Bcl-2 expression by ultraviolet A end B. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 111, p. 380-384, 1998.

WENCZL, E.; VAN DER SCHANS, G. P.; ROZA, L.; KOLB, R. M.; TIMMERMAN, A. J.; SMIT, N. P.; PAVEL, S.; SCHOTHORST, A. A. (Pheo)melanin photosensitizes UVA-induced DNA damage in cultured human melanocytes. **Journal of Investigative Dermatology**. Baltimore v. 111, p. 678-682, 1998

WIKBERG, J. E.; MUCENIECE, R.; MANDRIKA, I.; PRUSIS, P.; LIND-BLOM, J.; POST, C.; SKOTTNER, A. New aspects on the melanocortins and their receptors. **Pharmacological Research**, London, v. 42, p. 393-420, 2000.

WYLLIE, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**, London, v. 284, p. 555-556, 1980.

WOOD, M. L.; DIZDAROGLU, M.; GAJESKI, K.; ESSIGMANN, J. M. Mechanistic studies of ionizing and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. **Biochemistry**, New York, v. 29, p. 7024-7032, 1990.

ZHUANG, S.; LYNCH, M. C.; KOCHEVAR, I. E. Caspase-8 mediates caspase-3 activation and cytochrome c release during singlet oxygen-induced apoptosis of HL-60 cells. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 250, p. 203-212, 1999.

ZONG, W. X.; DITSWORTH, D.; BAUER, D. E.; WANG, Z. Q. THOMPSON, C. B. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. **Genes & Development**, USA, v. 18, p. 1272-1282, 2004.