FERNANDA FAIÃO FLORES

**Avaliação da atividade antitumoral do composto DM-1 e da
terapia de captura de nêutrons por boro em associação ao
quimioterápico dacarbazina no tratamento do melanoma**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e
da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto
Maria

São Paulo
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Faião-Flores, Fernanda

Avaliação da atividade antitumoral do composto DM-1 e da terapia de captura de nêutrons por boro em associação ao quimioterápico dacarbazina no tratamento do melanoma / Fernanda Faião Flores. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Durvanei Augusto Maria.

Descritores: 1.Melanoma 2.Terapias antitumorais 3.Dacarbazina 4.Terapia por captura de nêutrons de boro 5.Curcumina 6.DM-1

USP/FM/DBD-384/12

DEDICATÓRIA

Dedico esta etapa vitoriosa da minha vida à Deus, por me tornar apta à obter novos conhecimentos, por me dar força para continuar seguindo meu caminho pelo lado bom da fé e da coragem, por ser fonte infinita de sabedoria em que eu pude me amparar nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me auxiliar nesta conquista e por permitir a realização desta tese.

Aos meus pais e meu irmão por todos os anos de dedicação, preocupação, investimento e apoio que foram providenciais na minha formação acadêmica e principalmente moral. Agradeço especialmente minha mãe pelo amor incondicional e por toda forma de apoio imaginável para que eu nunca desistisse dos meus objetivos e sonhos.

Ao meu noivo Fernando por ter paciência e compreensão quando eu precisei estudar para as provas, escrever inúmeros relatórios e por sempre me incentivar, dando forças ao dizer que eu era forte o bastante para passar por tudo e conseguir trilhar um bom caminho. Agradeço por ser tão especial e inesquecível em minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria por todo o aprendizado e experiência ao longo desses 7 anos em que realizei minha iniciação científica e meu doutorado no Instituto Butantan e por me auxiliar no desenvolvimento de muitas características profissionais que levarei pelo resto da minha vida. Agradeço imensamente pela oportunidade de aprendizado.

Ao Prof. Dr. José Agustín Quincoces Suarez por ter me dado oportunidade de estágio desde o 1º ano de faculdade, por incentivar minhas idéias mirabolantes e por ter acreditado em mim desde o início.

Ao Prof. Dr. João Arruda Dias de Toledo Neto por me apresentar a BNCT e pelos inúmeros auxílios na correção de artigos, idéias de novos experimentos e por apesar de ser um co-orientador não oficial, sempre participar ativamente na minha construção acadêmica e profissional.

Ao Prof. Dr. Ricardo Pérez Tomas da Universidade de Barcelona por me ter me dado a oportunidade fantástica de aprender e vivenciar o âmbito de seu laboratório. Agradeço por me apoiar, incentivar, cobrar e investir no meu crescimento acadêmico.

Ao pesquisador Paulo Rogério Pinto Coelho por me auxiliar nos experimentos com BNCT, por disponibilizar a estrutura das irradiações e por me ajudar a liberar as amostras (inúmeras vezes) do IPEN. Não me esquecerei de agradecer ao pessoal da proteção radiológica que se assustavam a me ver com um isopor nas mãos e pensavam: “Meu Deus, esta menina possui câncer dentro do isopor!”, sem saber que toda vez que eu entrava no IPEN pensava: “Meu Deus, estas pessoas trabalham com radiação todos os dias!”.

Ao Dr. Jorge Sarkis do Ipen, pela contribuição no processamento, aquisição e análise dos dados da biodistribuição de boro.

À Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler da Faculdade de Ciências Farmacêuticas por ceder os melanócitos para os diversos ensaios, além da revisão e contribuição nos artigos científicos provenientes dos dados da tese.

À Dra. Vanessa Soto-Cerrato da Universidade de Barcelona pelos inúmeros ensinamentos, explicações, auxílio nos experimentos, pela grandiosa amizade e pela significativa contribuição à tese.

Apesar de todas as complicações e dificuldades que possam existir, a família é um bem precioso. E não falo somente da biológica, mas também daquela composta pelos amigos, com quem às vezes, temos laços ainda mais profundos.

Agradeço à minha família, por ser meu porto seguro, meu ponto de apoio e uma fonte inesgotável de alegria.

Aos meus amigos e companheiros atuais de laboratório: Miryam, Aline, Amanda belezinha, Álvaro, Janaina, Manoela, Thais, Kleber, Lara, Larissa, Eduardo, Rose e aos que participaram da minha jornada e já seguiram para outros rumos: Ana Rita, Rafael, Iara, Thais Contente, Danilo, Amanda docinho, Rosa, Mauricio, Mariana, Norma, Sonia, Dayane, Dona Vilma, Camila, Rodrigo, Adriana, Fabiana, Luciana, Marli e todos os outros que, se por um acaso me esqueci de citar, peço mil desculpas!

À todos os funcionários, técnicos e companheiros do Instituto Butantan.

Às minhas irmãs de coração Renata e Erica pelos anos de aventuras, conselhos, conversas e muito mais. A amizade de vocês é um bem muito precioso que quero preservar para o resto da minha vida. Agradeço também à

minha afilhada Lorena pelo carinho divino que tem o potencial de recarregar todas as minhas energias.

Às minhas companheiras caninas Jade, Latifa, Melody e Xuxa, por todos os carinhos, por correr em minha direção sempre quando eu chegava em casa, por sentar ao meu lado quando me sentia triste e assim me deixar contente novamente. Esse amor e lealdade não têm preço.

À todos os membros da banca de qualificação e de defesa da tese pelo auxílio, sugestões e críticas que me auxiliaram na busca por este título.

À todos os animais de laboratório que contribuíram para a minha pesquisa desde a iniciação científica. Vocês salvam mais vidas que o “911”.

À Fapesp pelo auxílio e apoio financeiro com a bolsa de doutorado direto (processo nº 2008/56397-8).

Obrigada!!!

Procure ser uma pessoa de valor, em vez de
procurar ser uma pessoa de sucesso.

O sucesso é consequência.

Albert Einstein

(1879-1955)

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 MELANOMA.....	2
1.2 DACARBAZINA (DTIC).....	4
1.3 SÍNTESE DE COMPOSTOS BIOATIVOS PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER.....	6
1.4 TERAPIA DE CAPTURA DE NÊUTRONS POR BORO (BNCT).....	8
2 OBJETIVO.....	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
3 MÉTODOS	15
3.1 CULTURA DAS LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS E NORMAIS.....	16
3.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	17
3.3 IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	18
3.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE PROLIFERATIVA <i>IN VITRO</i>	18
3.5 DILUIÇÃO DO COMPOSTO BPA	20
3.6 QUANTIFICAÇÃO DE MELANINA PRODUZIDA PELAS CÉLULAS DE MELANOMA E MELANÓCITOS.....	21
3.7 DETERMINAÇÃO DE PRODUTOS DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA POR QUANTIFICAÇÃO DE TBARS.....	21
3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE APOPTÓTICA E NECROSE POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	22

3.9 QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO SOLÚVEL NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS CELULARES.....	23
3.10 QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO NA MATRIZ EXTRACELULAR NAS CULTURAS CELULARES.....	24
3.11 ANÁLISE DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	25
3.12. ANÁLISE DAS FASES DO CICLO NAS POPULAÇÕES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	26
3.13 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES CELULARES NAS LINHAGENS TUMORAIS E NORMAIS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	28
3.14 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES CELULARES NA LINHAGEM DE MELANOMA POR WESTERN BLOT.....	29
3.15 ANÁLISE DE INTEGRIDADE CELULAR COM HOECHST 33342 POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	31
3.16 ANÁLISE DO CITOESQUELETO COM ACTINA E VINCULINA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	32
3.17 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	32
3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4 RESULTADOS	34
4.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE PROLIFERATIVA.....	35
4.2 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE PRODUTOS DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA POR QUANTIFICAÇÃO DE TBARS.....	42
4.3 ASPECTOS CITOLÓGICOS DAS LINHAGENS TUMORAIS E NORMAIS.....	48
4.4 AVALIAÇÃO DA PROPORÇÃO DE CÉLULAS MORTAS POR APOPTOSE E NECROSE.....	80
4.5 ANÁLISE DA QUANTIDADE DE COLÁGENO SINTETIZADO SOLÚVEL E NA MATRIZ EXTRACELULAR.....	83
4.6 ANÁLISE DO POTENCIAL ELÉTRICO DA MEMBRANA	89

MITOCONDRIAL PELA RODAMINA 123 POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	
4.7 QUANTIFICAÇÃO DE MELANINA EM LINHAGENS DE MELANOMA E MELANÓCITOS.....	96
4.8 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	97
4.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO DAS LINHAGENS DE MELANOMA B16F10 E MELANÓCITOS HUMANOS NORMAIS.....	106
4.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DAS LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO SKMEL-5 E A375 POR WESTERN BLOT.....	121
4.11 ANÁLISE DE INTEGRIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE MELANOMA A375 COM HOECHST 33342 POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	127
4.12 ANÁLISE DO CITOESQUELETO COM ACTINA E VINCULINA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	132
4.13 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DE MELANOMA SKMEL-5 POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	137
5 DISCUSSÃO	139
6 CONCLUSÕES	164
7 REFERENCIAS.....	167
APÊNDICE	

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

$\Delta\psi_m$	Potencial elétrico da membrana mitocondrial
^{10}B	Isótopo 10 do elemento boro
A375	Linhagem de melanoma humano
ANOVA	Análise de variância
APAF-1	Fator ativador da protease-1 apoptótica
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
B16F10	Linhagem de melanoma murino
Bad	Promotor de morte associado à Bcl-2
Bak	Antagonista homólogo de Bcl-2
Bax	Proteína x associada à Bcl-2
Bcl-2	Linfoma de células B 2
Bcl-xL	Linfoma de células B extra grande
Bid	Agonista de morte – domínio de interação de BH3
BPA	Borofenilalanina
BNCT	Terapia de Captura de Nêutrons por Boro
BSH	Borano de sulfidril
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CDK	Quinase dependente de ciclina
CO I	Controle irradiado
DM-1	Fenolato sintético
DISC	Complexo de sinalização de indução de morte
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTIC	Dacarbazina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAC'S FLOW	Solução tampão livre de azida sódica
FADD	Domínio de morte associado ao Fas
FasL	Fas ligante
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Isotiocianato de fluorosceína
FL	Canal de fluorescência
FN1	Linhagem de fibroblastos humanos normais
G0/G1	<i>Gap 0/Gap 1</i>
G2/M	<i>Gap 2</i> Mitose
Gy	Gray
HCl	Ácido clorídrico
HSP	Proteínas de choque térmico
HUVEC	Linhagem de células endoteliais humanas normais
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IC ₅₀	Concentração inibitória 50%
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPC-298	Linhagem de melanoma humano
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Ki67	Marcador celular de proliferação
L929	Linhagem de fibroblastos murinos normais
LAT	Transportador de aminoácidos
LET	Transferência de energia linear
LPO	Lipoperoxidação ou peroxidação lipídica

MAC	Membrana externa mitocondrial
Mcl-1	Leucemia celular mielóide
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz extracelular
MDR	Resistência à múltiplas drogas
MEWO	Linhagem de melanoma humano
miR 34	Micro-RNA
MOMP	Permeabilização da membrana mitocondrial externa
MTT	Sal de tetrazolio
NaOH	Hidróxido de Sódio
OD	Densidade óptica
p21	Proteína reguladora da transição da fase G1/S
p27	Proteína inibidora do ciclo celular
p53	Proteína supressora tumoral
PARP-1	Poli-ADP-Ribose Polimerase
PBS	Tampão fosfato salina
PE	Ficoeritrina
PI	Iodeto de propídio
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAse	Enzima que degrada o RNA
rpm	Rotações por minuto
RPMI-1640	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S	Fase de síntese de DNA
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SKMEL-5	Linhagem de melanoma humano
SKMEL-28	Linhagem de melanoma humano
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARs	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF-R1	Receptor de TNF do tipo 1
TRADD	Domínio de morte relacionado ao receptor de TNF
TRAIL	Ligante de indução de apoptose relacionado ao TNF
USP	Universidade de São Paulo
V	Volts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fórmula estrutural do quimioterápico Dacarbazina	5
Figura 2	Fórmula estrutural do composto natural curcumina comparada ao fenolato sintético DM-1	7
Figura 3	O princípio da técnica de BNCT	9
Figura 4	Fluxograma das condições experimentais utilizadas.	17
Figura 5	Fórmula estrutural dos compostos D-frutofuranose, BPA e o complexo BPA-Fructose	20
Figura 6	Gráfico da viabilidade celular obtida pelo teste de MTT para determinação da IC ₅₀ em linhagens tumorais e normais após 24 horas de tratamento com o quimioterápico DTIC.	36
Figura 7	Gráfico da viabilidade celular obtida pelo teste de MTT para determinação da IC ₅₀ em linhagens tumorais e normais após 24 horas de tratamento com o composto DM-1	38
Figura 8	Gráfico da viabilidade celular obtida pelo teste de MTT para determinação da IC ₅₀ em linhagens tumorais e normais após administração de BPA e posterior irradiação com nêutrons térmicos	40
Figura 9	Valores das médias $\pm$ dp dos radicais livres poliinsaturados peroxidados (Malondialdeído – MDA) formados no sobrenadante das culturas das linhagens normais e tumorais tratadas com o quimioterápico DTIC.	44
Figura 10	Valores das médias $\pm$ dp dos radicais livres poliinsaturados peroxidados (Malondialdeído – MDA) formados no sobrenadante das culturas das linhagens normais e tumorais tratadas com o composto DM-1.	45
Figura 11	Valores das médias $\pm$ dp dos radicais livres poliinsaturados peroxidados (Malondialdeído – MDA) formados no sobrenadante das culturas das linhagens normais e tumorais tratadas com o composto BPA seguida de irradiação com nêutrons térmicos.	46
Figura 12	Aspecto morfológico das culturas de melanoma B16F10 tratadas com as diferentes concentrações de DTIC	49

Figura 13	Aspecto morfológico das culturas de melanoma B16F10 tratadas com as diferentes concentrações de DM-1	50
Figura 14	Aspecto morfológico das culturas de melanoma B16F10 tratadas com as diferentes concentrações de BPA seguido da irradiação com nêutrons térmicos	51
Figura 15	Aspecto morfológico das culturas de melanoma MEWO tratadas com as diferentes concentrações de DTIC	53
Figura 16	Aspecto morfológico das culturas de melanoma MEWO tratadas com as diferentes concentrações de DM-1	54
Figura 17	Aspecto morfológico das culturas de melanoma MEWO tratadas com as diferentes concentrações de BPA seguido da irradiação com nêutrons térmicos	55
Figura 18	Aspecto morfológico das culturas de melanoma IPC-298 tratadas com as diferentes concentrações de DTIC	57
Figura 19	Aspecto morfológico das culturas de melanoma IPC-298 tratadas com as diferentes concentrações de DM-1	58
Figura 20	Aspecto morfológico das culturas de melanoma IPC-298 tratadas com as diferentes concentrações de BPA seguido da irradiação com nêutrons térmicos	59
Figura 21	Aspecto morfológico das culturas de melanoma SKMEL-28 tratadas com as diferentes concentrações de DTIC	61
Figura 22	Aspecto morfológico das culturas de melanoma SKMEL-28 tratadas com as diferentes concentrações de DM-1	62
Figura 23	Aspecto morfológico das culturas de melanoma SKMEL-28 tratadas com as diferentes concentrações de BPA seguido da irradiação com nêutrons térmicos	63
Figura 24	Aspecto morfológico das culturas de fibroblastos murinos normais L929 tratadas com as diferentes concentrações de DTIC	65

Figura 25	Aspecto morfológico das culturas de fibroblastos murinos normais L929 tratadas com as diferentes concentrações de DM-1	66
Figura 26	Aspecto morfológico das culturas de fibroblastos murinos normais L929 tratadas com as diferentes concentrações de BPA seguido da irradiação com nêutrons térmicos	67
Figura 27	Aspecto morfológico das culturas de fibroblastos humanos normais FN1 tratadas com as diferentes concentrações de DTIC	69
Figura 28	Aspecto morfológico das culturas de fibroblastos humanos normais FN1 tratadas com as diferentes concentrações de DM-1	70
Figura 29	Aspecto morfológico das culturas de fibroblastos humanos normais FN1 tratadas com as diferentes concentrações de BPA seguido da irradiação com nêutrons térmicos	71
Figura 30	Aspecto morfológico das culturas de células endoteliais humanas normais HUVEC tratadas com as diferentes concentrações de DTIC	73
Figura 31	Aspecto morfológico das culturas de células endoteliais humanas normais HUVEC tratadas com as diferentes concentrações de DM-1	74
Figura 32	Aspecto morfológico das culturas de células endoteliais humanas normais HUVEC tratadas com as diferentes concentrações de BPA seguido da irradiação com nêutrons térmicos	75
Figura 33	Aspecto morfológico das culturas de melanócitos humanos normais tratados com as diferentes concentrações de DTIC	77
Figura 34	Aspecto morfológico das culturas de melanócitos humanos normais tratados com as diferentes concentrações de DM-1	78
Figura 35	Aspecto morfológico das culturas de melanócitos humanos normais tratados com as diferentes concentrações de BPA seguido da irradiação com nêutrons térmicos	79

Figura 36	Gráficos representativos do tipo Dot-plot adquiridos em citometro de fluxo e analisados no programa WinMDI 2.8 das populações celulares marcadas com Anexina-V (FL-1 – eixo X) e PI (FL-2 – eixo Y) das linhagens de melanoma B16F10, MEWO, IPC-298 e SKMEL-28 e melanócitos normais do grupo controle, tratados com o quimioterápico DTIC, composto DM-1 e BNCT	81
Figura 37	Gráfico de barras representando média±dp da proporção das linhagens de melanoma B16F10 (A), MEWO (B), IPC-298 (C) e SKMEL-28 (D) e melanócitos normais (E) de células vivas, em processo de necrose ou em processo de apoptose (inicial e tardia) nos diferentes esquemas de tratamento	82
Figura 38	Gráfico de barras das médias ± dp da quantidade de colágeno solúvel sintetizado e liberado no meio de cultura pelo método colorimétrico de Picrosirius das linhagens de melanoma B16F10 (A), SKMEL-28 (B), melanócitos normais (C) e fibroblastos humanos normais FN1 (D) tratados com as diferentes modalidades terapêuticas	84
Figura 39	Gráfico de barras das médias ± dp da proporção de colágeno na matriz extracelular das culturas das linhagens de melanoma B16F10 (A), SKMEL-28 (B), melanócitos normais (C) e fibroblastos humanos normais FN1 (D) tratados com as diferentes modalidades terapêuticas	86
Figura 40	Imagens 2D obtidas no programa de análise e morfometria <i>Image J</i> . versão 2.9 das linhagens de melanoma B16F10, SKMEL-28, fibroblastos humanos normais FN1 e melanócitos normais coradas com Picrosirius	87
Figura 41	Imagens 3D obtidas no programa de análise e morfometria <i>Image J</i> . versão 2.9 das linhagens de melanoma B16F10, SKMEL-28, fibroblastos humanos normais FN1 e melanócitos normais coradas com Picrosirius	88
Figura 42	Gráfico do tipo <i>overlay</i> representativo das populações celulares de melanoma B16F10 comparando-se o grupo Controle e os grupos tratados com o composto DM-1 (A), o quimioterápico Dacarbazina (B) e a	90

BNCT (C) analisados pelo programa *FlowJo*.

Figura 43	Gráfico do tipo <i>overlay</i> representativo das populações celulares de melanoma MEWO comparando-se o grupo Controle e os grupos tratados com o composto DM-1 (A), o quimioterápico Dacarbazina (B) e a BNCT (C) analisados pelo programa <i>FlowJo</i> .	91
Figura 44	Gráfico do tipo <i>overlay</i> representativo das populações celulares de melanoma ICP-298 comparando-se o grupo Controle e os grupos tratados com o composto DM-1 (A), o quimioterápico Dacarbazina (B) e a BNCT (C) analisados pelo programa <i>FlowJo</i> .	91
Figura 45	Gráfico do tipo <i>overlay</i> representativo das populações celulares de melanoma SKMEL-28 comparando-se o grupo Controle e os grupos tratados com o composto DM-1 (A), o quimioterápico Dacarbazina (B) e a BNCT (C) analisados pelo programa <i>FlowJo</i> .	92
Figura 46	Gráfico do tipo <i>overlay</i> representativo das populações celulares de fibroblastos L929 comparando-se o grupo Controle e os grupos tratados com o composto DM-1 (A), o quimioterápico Dacarbazina (B) e a BNCT (C) analisados pelo programa <i>FlowJo</i> .	93
Figura 47	Gráfico do tipo <i>overlay</i> representativo das populações celulares de fibroblastos FN1 comparando-se o grupo Controle e os grupos tratados com o composto DM-1 (A), o quimioterápico Dacarbazina (B) e a BNCT (C) analisados pelo programa <i>FlowJo</i> .	93
Figura 48	Gráfico do tipo <i>overlay</i> representativo das populações celulares marcadas de melanócitos normais comparando-se o grupo Controle e os grupos tratados com o composto DM-1 (A), o quimioterápico Dacarbazina (B) e a BNCT (C) analisados pelo programa <i>FlowJo</i> .	94
Figura 49	Gráfico de barras sobrepostas representando a média $\pm$ dp da atividade elétrica mitocondrial das linhagens de melanoma B16F10 (A), MEWO (B), IPC-298 (C), SKMEL-28 (D), melanócitos normais (E), fibroblastos normais L929 (F) e fibroblastos normais FN1 (G) entre o grupo controle e os diversos tratamentos	95
Figura 50	Gráfico de barras representando a média $\pm$ dp de melanina (média $\pm$ dp) encontrada nas culturas das	96

linhagens de melanoma B16F10, MEWO, SKMEL-28 e IPC-298 e linhagem de melanócitos normais

Figura 51	Histogramas representativos das aquisições em citometria de fluxo da distribuição das fases do ciclo celular das células de melanoma B16F10 do grupo controle (A), DTIC (B), DM-1 (C) e BNCT (D) pelo programa Cell-Quest e analisado pelo programa de análise MOD-Fit	97
Figura 52	Histogramas representativos das aquisições em citometria de fluxo da distribuição das fases do ciclo celular das células de melanoma MEWO do grupo controle (A), DTIC (B), DM-1 (C) e BNCT (D) pelo programa Cell-Quest e analisado pelo programa de análise MOD-Fit	98
Figura 53	Histogramas representativos das aquisições em citometria de fluxo da distribuição das fases do ciclo celular das células de melanoma IPC-298 do grupo controle (A), DTIC (B), DM-1 (C) e BNCT (D) pelo programa Cell-Quest e analisado pelo programa de análise MOD-Fit	99
Figura 54	Histogramas representativos das aquisições em citometria de fluxo da distribuição das fases do ciclo celular das células de melanoma SKMEL-28 do grupo controle (A), DTIC (B), DM-1 (C) e BNCT (D) pelo programa Cell-Quest e analisado pelo programa de análise MOD-Fit	99
Figura 55	Histogramas representativos das aquisições em citometria de fluxo da distribuição das fases do ciclo celular dos melanócitos do grupo controle (A), DTIC (B), DM-1 (C) e BNCT (D) pelo programa Cell-Quest e analisado pelo programa de análise MOD-Fit	100
Figura 56	Histogramas representativos das aquisições em citometria de fluxo da distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos L929 do grupo controle (A), DTIC (B), DM-1 (C) e BNCT (D) pelo programa Cell-Quest e analisado pelo programa de análise MOD-Fit	100
Figura 57	Histogramas representativos das aquisições em citometria de fluxo da distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos FN1 do grupo controle (A), DTIC (B), DM-1 (C) e BNCT (D) pelo	101

programa Cell-Quest e analisado pelo programa de análise MOD-Fit

Figura 58	Gráfico de barras das médias $\pm$ dp das células das linhagens de melanoma B16F10 (A), MEWO (B), IPC-298 (C), SKMEL-28 (D), melanócitos normais (E), fibroblastos normais L929 (F) e fibroblastos normais FN1 (G) em fase sub-G1 (DNA fragmentado), comparando-se o grupo controle com os demais grupos de tratamento	102
Figura 59	Gráfico de barras das médias $\pm$ dp das células das linhagens de melanoma B16F10 (A), MEWO (B), IPC-298 (C), SKMEL-28 (D), melanócitos normais (E), fibroblastos normais L929 (F) e fibroblastos normais FN1 (G) na fase quiescente G0/G1, comparando-se o grupo controle com os demais grupos de tratamento	103
Figura 60	Gráfico de barras das médias $\pm$ dp das células das linhagens de melanoma B16F10 (A), MEWO (B), IPC-298 (C), SKMEL-28 (D), melanócitos normais (E), fibroblastos normais L929 (F) e fibroblastos normais FN1 (G) na fase de síntese de DNA - S, comparando-se o grupo controle com os demais grupos de tratamento	104
Figura 61	Gráfico de barras das médias $\pm$ dp das células das linhagens de melanoma B16F10 (A), MEWO (B), IPC-298 (C), SKMEL-28 (D), melanócitos normais (E), fibroblastos normais L929 (F) e fibroblastos normais FN1 (G) na fase G2/M, comparando-se o grupo controle com os demais grupos de tratamento	105
Figura 62	Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de p27 em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos	107
Figura 63	Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de p21 em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos	108
Figura 64	Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de ciclina D1 em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos	109

Figura 65	Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de Bcl-2 em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos	111
Figura 66	Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de Bax em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos	112
Figura 67	Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de Bad em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos	113
Figura 68	Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de caspase 3 clivada em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos	114
Figura 69	Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de caspase 8 clivada em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos	115
Figura 70	Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de citocromo c em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos	116
Figura 71	Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de Ki67 em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos	118
Figura 72	Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de TNF-R1 em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos	119
Figura 73	Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de Hsp-47 em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos	120
Figura 74	Fotomicrografia da expressão proteica analisada por western blot dos marcadores antiapoptóticos (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL e a forma inativa de Bid) e marcadores	122

próapoptóticos (Bax e Bak) nas linhagens de melanoma SKMEL-5 e A375 após 0, 3, 6 ou 24 horas de tratamento com o composto DM-1

Figura 75	Gráfico de barras das médias $\pm$ dp da expressão dos marcadores antiapoptóticos (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL e a forma inativa de Bid) e marcadores próapoptóticos (Bax e Bak) nas linhagens de melanoma SKMEL-5 e A375 após 0, 3, 6 ou 24 horas de tratamento com o composto DM-1	123
Figura 76	Fotomicrografia da expressão proteica analisada por western blot dos marcadores de apoptose (caspase 9, caspase 3 e Parp) nas linhagens de melanoma SKMEL-5 e A375 após 0, 3, 6 ou 24 horas de tratamento com o composto DM-1	125
Figura 77	Gráfico de barras das médias $\pm$ dp da expressão dos marcadores de apoptose (caspase 9, caspase 3 e Parp) nas linhagens de melanoma SKMEL-5 e A375 após 0, 3, 6 ou 24 horas de tratamento com o composto DM-1	126
Figura 78	Fotomicrografia obtida em microscópio de fluorescência das células da linhagem de melanoma humano A375 do grupo controle coradas por Hoechst 33342	128
Figura 79	Fotomicrografia obtida em microscópio de fluorescência das células da linhagem de melanoma humano A375 do grupo tratado com o valor de IC ₅₀ do quimioterápico DTIC (548 μ M) coradas por Hoechst 33342	129
Figura 80	Fotomicrografia obtida em microscópio de fluorescência das células da linhagem de melanoma humano A375 do grupo tratado com o valor de IC ₅₀ do composto DM-1 (65 μ M) coradas por Hoechst 33342	130
Figura 81	Fotomicrografia obtida em microscópio de fluorescência das células da linhagem de melanoma humano A375 do grupo tratado com o quimioterápico DTIC (5 μ M) e com o composto DM-1 (5 μ M) coradas por Hoechst 33342	131
Figura 82	Fotomicrografia da morfologia do citoesqueleto das células de melanoma SKMEL-5 do grupo controle e	133

com o quimioterápico DTIC ou com o composto DM-1 após 90 minutos de tratamento (aumento de 20x). A marcação em verde corresponde à actina, a vermelha corresponde à vinculina e a última coluna representa *merge* ou a mescla das duas imuno-marcações.

Figura 83	Fotomicrografia da morfologia do citoesqueleto das células de melanoma SKMEL-5 do grupo controle e com o quimioterápico DTIC ou com o composto DM-1 após 90 minutos de tratamento (aumento de 40x). A marcação em verde corresponde à actina, a vermelha corresponde à vinculina e a última coluna representa <i>merge</i> ou a mescla das duas imuno-marcações.	134
Figura 84	Fotomicrografia da morfologia do citoesqueleto das células de melanoma SKMEL-5 do grupo controle e com o quimioterápico DTIC ou com o composto DM-1 após 90 minutos de tratamento (aumento de 100x). A marcação em verde corresponde à actina, a vermelha corresponde à vinculina e a última coluna representa <i>merge</i> ou a mescla das duas imuno-marcações	135
Figura 85	Gráfico de barras da média $\pm$ dp dos contatos focais em células de melanoma humano SKMEL-5 do grupo controle, com o quimioterápico DTIC ou com o composto DM-1 após 90 minutos de tratamento	136
Figura 86	Fotomicrografias obtidas em microscópio de contraste de fases para análise da retração dos filopódios do citoesqueleto das células de melanoma humano SKMEL-5 do grupo controle, com o quimioterápico DTIC ou com o composto DM-1 após 0 e 90 minutos de tratamento. As setas vermelhas indicam os filopódios que sofreram diminuição ou retração completa após 90 minutos de tratamento (aumento de 20x)	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Nomes, códigos e empresa fabricante dos anticorpos utilizados para as marcações celulares por citometria de fluxo	29
Tabela 2	Composição das soluções utilizadas na metodologia de Western Blot	30
Tabela 3	Nomes, códigos e empresa fabricante dos anticorpos utilizados para a análise da expressão proteica por Western blot	31
Tabela 4	Comparação entre os valores de IC ₅₀ de todas as modalidades de tratamento nas linhagens tumorais e normais	41
Tabela 5	Equivalência-molar dos valores de IC ₅₀ de todas as modalidades de tratamento nas linhagens tumorais e normais	42
Tabela 6	Comparação da eficácia do quimioterápico DTIC na produção de radicais livres poliinsaturados peroxidados em relação ao grupo controle	47
Tabela 7	Comparação da eficácia do composto DM-1 na produção de radicais livres poliinsaturados peroxidados em relação ao grupo controle	47
Tabela 8	Comparação da eficácia da terapia de BNCT na produção de radicais livres poliinsaturados peroxidados em relação ao grupo controle	47

RESUMO

Faião-Flores F. *AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO COMPOSTO DM-1 E DA TERAPIA DE CAPTURA DE NÊUTRONS POR BORO EM ASSOCIAÇÃO AO QUIMIOTERÁPICO DACARBAZINA NO TRATAMENTO DO MELANOMA* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

O melanoma maligno é a forma mais agressiva dos tumores cutâneos. Sendo o responsável por mais de 75% das mortes relativas á este tipo de câncer. O principal quimioterápico utilizado no tratamento do melanoma é a dacarbazina (DTIC), entretanto, as taxas de resposta são insatisfatórias. O composto DM-1 é um análogo estrutural da curcumina, e por esta razão possui propriedades biológicas semelhantes, como agente antiproliferativo e próapoptótico. A terapia de captura de nêutrons por boro (BNCT) atua por meio da deposição do isótopo $^{10}\text{Boro}$ nas células tumorais e após a irradiação de nêutrons térmicos há produção de partículas alfa e lítio que destroem a célula. Neste trabalho estudou-se o mecanismo de ação destas três terapias, DTIC, DM-1 e BNCT no tratamento do melanoma e seus efeitos em células normais *in vitro* com a finalidade de obtenção de modalidades terapêuticas diferentes para o tratamento desta neoplasia. A IC_{50} foi obtida pela metodologia de MTT, além da análise da progressão do ciclo celular e marcadores de morte celular por citometria de fluxo. O composto DM-1 e a BNCT apresentaram efeito citotóxico seletivo para as linhagens de melanoma, com alta produção de radicais livres peroxidados. Nas mesmas condições, estes efeitos foram mínimos em células normais, diferente do tratamento com DTIC. Houve diminuição da proporção de matriz extracelular e colágeno solúvel sintetizado em células de melanoma tratadas com DM-1, BNCT e DTIC, entretanto, o quimioterápico ocasionou isoladamente diminuição também em células normais. O potencial elétrico mitocondrial das células de melanoma foi diminuído nos três protocolos de tratamento, assim como houve aumento na quantidade de DNA fragmentado. Este efeito não foi encontrado em células normais tratadas com DM-1 e BNCT. O composto DM-1 foi capaz de induzir apoptose via

intrínseca e extrínseca, avaliado pela Anexina V e por marcadores de cinética e de morte celular. A terapia de BNCT induziu apoptose e necrose, indicando que esta terapia atua por diferentes vias em cada linhagem celular. BNCT e DM-1 induziram aumento na expressão dos marcados próapoptóticos, como Bax, citocromo c, caspase 3 e 8 clivadas, além de diminuir os valores na expressão de ciclina D1 e Ki-67, relacionados com a progressão do ciclo celular e proliferação. O quimioterápico DTIC apresentou alguns indícios de apoptose em células de melanoma, mas seus efeitos em células normais foram extensivos, ocasionando morte e parada do ciclo celular em melanócitos, células endoteliais e fibroblastos. O composto DM-1 apresentou formação de corpos apoptóticos, modificações no citoesqueleto e clivagem de caspase 9 e Parp em linhagens de melanoma humano. Desta forma, o composto DM-1 e a BNCT mostraram-se ferramentas terapêuticas mais eficazes no controle da progressão e no aumento da morte celular em células de melanoma. O poder efetivo da terapia de BNCT e do composto DM-1 faz com que a possibilidade de terapias combinatórias tenha resultados extremamente favoráveis na modulação da resposta proliferativa desses tumores.

Descritores: Melanoma; Terapias antitumorais; Dacarbazina; Terapia por captura de nêutrons por Boro; curcumina; DM-1.

SUMMARY

Faião-Flores F. *ANTITUMOR EVALUATION OF DM-1 COMPOUND AND BORON NEUTRON CAPTURE THERAPY ASSOCIATED TO DACARBAZINE CHEMOTHERAPEUTIC IN MELANOMA TREATMENT* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

Malignant melanoma is the most aggressive skin cancer. It is responsible for more than 75% of deaths. The main and most active chemotherapy in the melanoma treatment is represented by dacarbazine (DTIC), however, response rates are disappointing. The DM-1 compound is a curcumin structural analogue and it has similar biological properties, such as an antiproliferative and pro-apoptotic agent. Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) works through the deposition of the isotope ^{10}B in tumor cells, with subsequent irradiation of thermal neutrons, which produce alpha particles and lithium that destroy the cell. In this study, the action mechanism of these three therapies, DTIC, DM-1 and BNCT in the melanoma treatment and its effects in vitro on normal cells were studied in order to obtain different therapeutic modalities for cancer treatment. The IC_{50} was obtained by MTT method, besides the analysis of cell cycle progression and cell death markers by flow cytometry. The DM-1 and BNCT showed selective cytotoxic in melanoma cell lines, with high of free radicals production. In the same conditions, these effects were minimal in normal cells, unlike the treatment with DTIC. There was a decrease in the proportion of extracellular matrix and soluble collagen synthesized in melanoma cells treated with DM-1, BNCT and DTIC, however, only DTIC also resulted in decreased in normal cells. The mitochondrial electrical potential of melanoma cells was decreased in the three treatment protocols, as there was an increase in the amount of fragmented DNA. This effect was not found in normal cells treated with DM-1 and BNCT. The compound DM-1 was able to induce apoptosis by the intrinsic and extrinsic pathways, as assessed by Annexin V, cell death and kinetic markers. BNCT induced apoptosis and necrosis, indicating that this therapy acts through different pathways in each cell line. DM-1 and BNCT

induced an increase of pro-apoptotic markers, such as Bax, cytochrome c, cleaved caspase 3 and 8 expression, and they reduced cyclin D1 and Ki-67, expression related to the progression of the cell cycle and proliferation. The DTIC has shown some signs of apoptosis in melanoma cells, but its effect on normal cells were extensive, causing death and cell cycle arrest in melanocytes, fibroblasts and endothelial cells. The DM-1 showed apoptotic bodies formation, cytoskeleton changes and caspase 9 and Parp cleavage in human melanoma cell lines. Thus, the DM-1 and BNCT showed as therapeutic tools more with high effectiveness in controlling the cell cycle progression and cell death increase in melanoma cells. The effectiveness of BNCT and DM-1 makes the possibility of combinatorial therapies, with extremely favorable results in the modulation of the proliferative response of these tumors.

Descriptors: Melanoma; Antitumor therapies; Dacarbazine; Boron Neutron Capture Therapy; curcumin; DM-1.

1. INTRODUÇÃO

1.1 MELANOMA

O melanoma cutâneo é um tumor maligno. Forma-se a partir dos melanócitos que, por sua vez, migram da crista neural para toda a epiderme durante a embriogênese. Em consequência desse fato, o tumor apresenta grande capacidade de metastatização mesmo em fases iniciais, já que a característica de invadir e disseminar poderiam ser consideradas prerrogativas inatas deste tipo celular (Wainstein; Belfort, 2004). Na maioria das vezes, origina-se na epiderme, embora possa surgir a partir de mucosas ou em outros locais para os quais migram as células da crista neural (Machado et al., 2004).

Enquanto a incidência de muitos tumores sólidos está diminuindo gradualmente, a incidência do melanoma cutâneo está em ascensão, tornando esta malignidade um significativo problema clínico (Lev et al., 2004). Entre 1% a 3% de todos os tumores malignos são do tipo melanoma e sua incidência aumenta de 6% a 7% por ano (Howe et al., 2001; Bevona, Sober, 2002). Embora represente menos de 10% dos tumores de pele, é responsável por mais de 75% das mortes relativas á este tipo de câncer (Hall et al., 1999).

O melanoma maligno é a forma mais agressiva e causa a maioria das mortes dos tumores de pele. O prognóstico do melanoma maligno é relacionado ao estágio em que é detectado. Caso seja descoberto no estágio precoce é tratado com cirurgia, porém se o diagnóstico é realizado mais tardiamente, indica-se quimioterapia convencional (Mendes et al., 2008).

Os melanomas caracterizam-se inicialmente por uma lesão infiltrativa, que cresce rapidamente, tem alta taxa metastática e atingem com maior freqüência os órgãos genitais e membros pélvicos. Na maioria dos melanomas sua etiologia é desconhecida semelhante ao que acontece na maioria dos tumores em animais (Civita, 1972; Jones et al., 2000).

A taxa de sobrevida para pacientes com melanoma maligno aumentou gradualmente durante os últimos 25 anos. Quatro décadas atrás, 60% dos pacientes que eram diagnosticados com melanoma morriam em sequência, comparados com a média de 11% atualmente (Beddingfield, 2003). Entretanto, o prognóstico dos pacientes diagnosticados com melanoma no estágio intermediário/final permanece grave. A sobrevida mediana não é significativa, ficando em torno de 6 a 10 meses (Korn et al., 2008). Esta estatística está, em parte, explicada pela falta de agentes ativos eficazes para o tratamento do melanoma (Gogas et al., 2007).

O tumor apresenta, na maioria das vezes, duas fases distintas: a fase inicial ou de crescimento radial, no qual a lesão ainda é plana, pequena e possui comportamento mais benigno, e a fase de crescimento vertical, com pior prognóstico, apresentando células malignas profundamente localizadas na derme reticular ou mesmo invadindo o tecido subcutâneo (Hafner et al., 2004).

O melanoma é um tumor resistente à radioterapia e esta pode ser empregada para tratamentos paliativos, sendo suspensa se não apresentar resultados em curto prazo. Evidências demonstram que até 23% dos pacientes com melanoma poderiam se beneficiar da radioterapia, mas esta é aplicada em somente 13% dos pacientes nos diferentes países (Delaney et al., 2004).

De acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde, a resposta completa de tratamento foi definida como o desaparecimento de todo o tumor no mínimo em 4 semanas; a resposta parcial é definida como a redução de 50% da lesão e sem o aparecimento de lesões novas; a doença estável é definida como uma redução de até 50% na massa tumoral total ou um aumento menor de 25%; e doença progressiva definida como um aumento maior de 25% no tamanho de lesões mensuráveis ou na aparência de lesões novas (World Health Organization, 1979).

Todos os agentes disponíveis utilizados para o tratamento do melanoma são, na melhor das hipóteses, minimamente ativos (Majer et al., 2007).

1.2 DACARBAZINA (DTIC)

A modalidade terapêutica baseada na infusão de drogas citotóxicas é ainda hoje uma forma primária de abordagem do melanoma metastático. No entanto, apesar do uso difundido, os resultados encontrados são bastante decepcionantes na maioria dos casos. As drogas mais utilizadas atualmente são representadas pela dacarbazina (DTIC), cisplatina, nitrosuréias (carmustina e lomustina) e agentes que atuam sobre os microtúbulos (alcalóides da vinca e taxanos). O principal e mais ativo agente quimioterápico no tratamento do melanoma é representado pela DTIC. Estudos clínicos demonstram que somente 2% dos pacientes que recebem quimioterapia com DTIC isolada estarão vivos em 6 anos e a associação de drogas (poliquimioterapia) não mostrou benefício adicional na taxa de sobrevida (Sober et al., 2001).

A DTIC é um agente alquilante não-clássico, considerado o agente mais ativo para tratar este tipo tumoral e é o único aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) (Crosby et al., 2000; Chapman et al., 1999). É análogo estrutural do 5-amino-imidazol-4-carboxamida, precursor na biossíntese da purina (Figura 1A). Atua como antineoplásico alquilante, formando íons metilcarbônicos que atacam grupos nucleofílicos do DNA e induzem entrecruzamentos nas hélices de DNA. Isso resulta na inibição das sínteses de DNA, RNA e proteínas (Figura 1B). DTIC atua em todas as fases do ciclo celular (Calabresi et al., 2001).

Figura 1 – Fórmula estrutural do quimioterápico Dacarbazina (A). O quimioterápico DTIC gera espécies reativas que alquilam o nucleotídeo guanina ou adenina (B) (Otake, 2005).

Este quimioterápico pode exercer atividade antitumoral por metilação de ácidos nucleicos ou por danos diretos ao DNA, resultando na parada de crescimento e morte celular. Entretanto, as taxas de resposta para a monoterapia com DTIC são decepcionantes, variando de 10 a 25%, com respostas completas em menos de 5% dos pacientes (Middleton et al., 2000a; Middleton et al., 2000b).

A DTIC é o melhor agente na monoterapia para o melanoma, contudo, sua eficácia parece limitada em casos de doenças metastática visceral ou cerebral (Ho, 1995; Balch et al., 2001). Ensaios já foram realizados com diferentes regimes de poliquimioterapia, e alguns conseguem maiores taxas de resposta (50%), porém possuem maior toxicidade, sem aumentar a sobrevida (Rivers, 1996). Os resultados obtidos são fracos e o melanoma maligno continua sendo uma das neoplasias mais refratárias aos agentes quimioterápicos (Wainstein; Belfort, 2004).

Este agente alquilante permanece como o padrão no cuidado e tratamento do melanoma, e é frequentemente comparado a novos regimes terapêuticos (Serrone et al., 2000; Bajetta et al., 2002).

1.3 SÍNTESE DE COMPOSTOS BIOATIVOS PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER

Ao longo da história, os produtos naturais foram fontes ricas de compostos que possuem muitas aplicações no campo da medicina, da farmácia e da biologia. Dentro da área de tratamento do câncer, novas drogas comercializadas foram obtidas de fontes naturais, pela modificação estrutural de compostos naturais, ou pela síntese de novos compostos, projetados a partir de modelos naturais. A busca de melhores agentes citotóxicos continua sendo uma importante linha na descoberta de drogas antitumorais.

Os processos de semi-síntese de novos compostos, obtidos pela alteração molecular dos grupos funcionais podem gerar análogos estruturais com maior atividade farmacológica e com poucos efeitos secundários. Estes processos, complementados com protocolos de seleção baseado na elevada produção, química combinatória, química computacional e bioinformática podem ser recursos para os compostos que são mais eficientes do que aqueles usados atualmente na prática clínica (Gordaliza, 2007).

O fenolato de sódio 4-[5-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-3-oxo-penta-1,4-dienil]-2-metoxi-fenolato de sódio, denominado DM-1 (Quincoces et al., 2007; Quincoces et al., 2010) foi patenteado e é um composto que pode ser obtido por via sintética, a partir da vanilina, produto natural existente na própolis brasileira e em plantas. Por apresentar grande semelhança estrutural com a curcumina (*Curcuma longa*) [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxi-fenil) hepta-1,6-dien-3,5-diona], o composto DM-1 apresenta comprovadas semelhanças em seus perfis biológicos, como potencial antitumoral e antiinflamatório (Baliga; Katiyar, 2006) (Figura 2). Este monossal possui fórmula geral $C_{19}H_{17}O_5Na$ e massa molecular de 348 g/mol.

A **B**

Figura 2 – Fórmula estrutural do composto natural curcumina (A) comparada ao composto DM-1 (B). Nota-se a semelhança estrutural evidente entre as duas moléculas.

O composto DM-1 é um fenolato sintético, oriundo de substâncias da própolis e com estrutura similar à curcumina, obtendo assim as mesmas características farmacológicas e citotóxicas. O termo fenol pode ser definido como uma substância que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilas e/ou derivados funcionais como ésteres, metoxilas, glicosídeos e outros (Simões et al., 2000). Recentemente, alguns estudos *in vivo* foram realizados com o composto DM-1 evidenciando seu potencial antitumoral em camundongos portadores de melanoma e portadores de

adenocarcinoma mamário de Ehrlich (Faião-Flores et al., 2008; Faião-Flores et al., 2012a).

Compostos fenólicos constituem um grupo de substâncias que estão presentes extensamente no reino vegetal, onde são conhecidos mais de 8.000 com diferentes estruturas químicas e atividade. Estes compostos são consumidos regularmente como parte da dieta humana (Benavente-García et al., 2008; Middleton et al., 2000). As principais classes de compostos fenólicos na dieta são fenóis ácidos, flavonóides, cumarinas, e taninas (Harborne, 1986). Estes compostos podem agir em diferentes estágios do desenvolvimento de tumores malignos, protegendo o DNA de células normais de danos oxidativos (Bravo, 1998).

Recentemente, houve um aumento substancial nos estudos dos efeitos dos polifenóis em diferentes tumores. Alguns estudos relacionam seu possível poder antiproliferativo e antimetastático no tratamento do melanoma (Menon et al., 1995; Menon et al., 1999; Iwashita et al., 2000; Gomez-Cordoves et al., 2001). Alguns trabalhos relatam que a presença de estruturas aromáticas hidroxiladas, como no caso do composto DM-1, pode induzir inibição de células tumorais (Ohno et al., 1999; Qiu et al., 2000).

O composto DM-1 difere-se destes fenóis utilizados devido aos diferentes números e posições de substituintes da cadeia principal, conferindo atividade citotóxica potente dos fenóis em linhagens tumorais sem ocasionar danos em linhagens normais (Yáñez et al., 2004).

1.4 TERAPIA DE CAPTURA DE NÊUTRONS POR BORO (BNCT)

A radioterapia é um tratamento baseado no emprego de radiações ionizantes sobre o tumor, destruindo as células tumorais e impedindo seu crescimento. Esta ação também pode exercer-se sobre os tecidos normais (Barcellos-Hoff et al., 2005).

A ação biológica da radioterapia fundamenta-se em radiações ionizantes que apresentam a capacidade de produzir radicais livres, interagir com a matéria e ceder à energia que produz rupturas das moléculas

biológicas, sendo a mais sensível o DNA (Schmaljohann et al., 2005). Além disso, a radioterapia convencional pode produzir efeitos colaterais como reações cutâneas, alterações gastrointestinais, mucosite, mielossupressão, e até efeitos mais graves como miocardite e fibrose pulmonar (Turriziani et al., 2005).

A terapia de captura de nêutrons por boro (BNCT) é uma modalidade de tratamento por radiação, e o seu sucesso depende da deposição de ^{10}B nas células tumorais seguida pela irradiação por nêutrons térmicos, resultando na produção de partículas ionizantes altamente tóxicas para a célula. Os dois fragmentos emitidos pela reação nuclear ($^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$), quando o ^{10}B captura um nêutron térmico têm curto alcance no tecido, em média de 9 μm para a partícula alfa (α) e 5 μm para o lítio, com um alcance total de 14 μm (Figura 3). Como consequência, eles liberam suas energias somente para as células próximas ou no meio intracelular. Para uso na BNCT, no mínimo 10-30 μg ^{10}B são necessários serem entregues por grama de tecido tumoral, correspondendo 10-30 ppm. Na BNCT, um agente de entrega seletiva é utilizado para depositar o boro nas células cancerígenas. Esta terapia é utilizada para os tratamentos de glioblastoma multiforme, melanoma maligno, entre outros (Kullberg, 2003).

Figura 3 – O princípio da técnica de BNCT consiste em captura de ^{10}B pelas células tumorais seguida de irradiação com nêutrons térmicos. A reação resulta na produção de partículas alfa e Lítio, gerando uma alta energia com alcance de até 14 μm de diâmetro, destruindo a célula tumoral sem causar danos ao tecido adjacente (Dandamudi; Campbell, 2007).

A terapia da captura de nêutrons por boro é uma radioterapia experimental, binária em que um composto que contém ^{10}B é administrado ao paciente, e acumulado preferencialmente no tecido neoplásico. O tumor é irradiado com os nêutrons de baixa energia produzidos por um reator nuclear, ^{10}B absorve nêutrons e os destrói, produzindo poderosas, mas de baixa escala, radiação alfa e partículas de lítio no tumor. Atualmente, os compostos administrados clinicamente que possuem boro são ($\text{Na}_2\text{H}_{11}^{10}\text{B}_{12}\text{SH}$, borano de sulfidril, BSH) e um derivado de aminoácido ($(\text{HO})_2^{10}\text{B}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$, borofenilalanina, BPA) (Campos, 2000). Ambos são atóxicos e têm sido testados clinicamente (Slatkin, 1991). O uso de BPA foi baseado na premissa que este composto seria acumulado seletivamente nas células neoplásicas que sintetizavam ativamente melanina (Tsuji et al., 1983).

Teoricamente, cada componente usado na BNCT não letal, isto é, o feixe de nêutrons tem uma energia muito baixa, que não causa estragos apreciáveis nos tecidos e a droga que fará o transporte do ^{10}B às células cancerígenas não possui características farmacológicas indesejadas (Walker, 1998).

A terapia de BNCT combina essencialmente um radiosensibilizador, o elemento Boro, isótopo 10 (^{10}B), com radiação não-ionizante de nêutrons, constituindo um sistema binário. Uma das principais vantagens do sistema binário da terapia de BNCT é a possibilidade de manipulação de cada componente independentemente (González et al., 2004) para maximizar a seletividade para células malignas além de poupar células de tecidos normais (Barth et al., 1992).

BNCT pode ser utilizado como tratamento adjuvante, em junção a outras modalidades, incluindo a cirurgia, a quimioterapia que, quando usada em combinação, pode conduzir a uma melhoria na sobrevida do paciente (Barth et al., 2005).

Neste contexto, a característica binária de BNCT pode ser uma ferramenta atrativa para melhorar a resposta do tratamento padrão da radioterapia, entregando uma dose elevada ao tumor e reduzindo os efeitos

em tecidos normais, devido à diferente captação de boro em células normais e tumorais (Blaumann et al., 2004; Hiratsuka et al., 2000).

Os primeiros testes clínicos realizados em humanos da terapia de BNCT em pacientes com melanoma foram realizados por Mishima após extensos estudos *in vitro* e *in vivo*. Após a incorporação do ^{10}B em um precursor intermediário da melanina (BPA) tornou possível a captura mais seletiva (Mishima et al., 1989). Os tratamentos pela terapia de BNCT de pacientes com melanoma no Japão foram seguidos por Fukuda et al. (1999) e Busse et al. (1997) nos EUA. Todos os estudos mostraram dados encorajadores no controle do crescimento e na disseminação tumoral (Menéndez et al., 2009).

O tratamento de melanoma por BNCT já obteve sucesso na Argentina, com baixa toxicidade e boa resposta clínica (González et al., 2004). Diversos ensaios clínicos estão sendo conduzidos em pacientes com glioblastoma multiforme, melanoma e câncer de tireóide no mundo todo (Wang et al., 2004).

Atualmente, a técnica BNCT possui centros de pesquisas (Mitev et al., 2009) no Japão, Alemanha, Finlândia, Itália, Argentina, entre outros, porém não há centro especializado nesta modalidade terapêutica no Brasil.

O mecanismo da captação e liberação de BPA ainda não está totalmente esclarecido, em particular a correlação entre a concentração intracelular do boro com o transporte ativo/passivo pela membrana celular (Menichetti et al., 2009). Devido a BPA ser um aminoácido e também um análogo da fenilalanina ou da tirosina, a sua utilização é mais viável e interessante do que os outros compostos que possuem boro (Chen et al., 2006).

Diversos estudos mostraram que a BPA é captada mais ativamente por células em proliferação (Yoshida et al., 2002), provavelmente porque a BPA pode seguir a via dos aminoácidos essenciais que são captados por células com elevada atividade metabólica (Menichetti et al., 2009).

O principal benefício da terapia de BNCT é sua habilidade de entregar seletivamente radiação por meio de alta transferência de energia linear

(LET) à nível individual para as células tumorais no mesmo campo de radiação das células normais (Yang et al., 2009).

Alguns estudos mostraram que BPA acumula-se em outras células malignas, além das células de melanoma, por exemplo, células de glioma (Coderre et al., 1990). Pode ser direcionada para células em proliferação ou quiescência e pode transpassar a barreira hemato-encefálica (Barth et al., 1999). Uma possível rota para o transporte intracelular é via mecanismo de transporte de aminoácidos (Papasprou et al., 1994; Sjoberg et al., 1997).

BNCT possui uma destruição seletiva das células tumorais, enquanto preserva o tecido adjacente. É a única radioterapia com alta seletividade para o tumor. Assim, emerge como uma modalidade terapêutica para o tratamento do câncer (Yamamoto et al., 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Com base nas potenciais características antitumorais das terapias apresentadas e visando uma posterior combinação sinérgica entre esses agentes, o objetivo foi investigar os efeitos do composto DM-1 e da terapia de BNCT comparados ao quimioterápico convencional DTIC no tratamento do melanoma.

3. MÉTODOS

3.1 CULTURA DAS LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS E NORMAIS

As células das linhagens tumorais de melanoma: murino (B16F10) e humano (IPC-298, SKMEL-28, MEWO, SKMEL-5 e A375); linhagem normal de fibroblastos murinos (L929), linhagem normal de células endoteliais humanas (HUVEC - Human Umbilical Vein Endothelial Cells) (linhagens comerciais provenientes da ATCC), fibroblastos humanos (FN1) – CAPPesq HCFMUSP nº921/06 (linhagem estabelecida pelo Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria do laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan) foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² em meio de cultura (RPMI-1640 completo), suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 2 mM de L-glutamina e antibióticos. A linhagem de melanócitos humanos normais oriundos de pele de prepúcio de neonatos – FM308 (cedidos pela Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler do Departamento de Análises Clínicas e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo) foram cultivados em meio de cultura 254CF (Life Sciences®), suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 2 mM de L-glutamina e antibióticos.

Para a realização dos experimentos *in vitro*, após sub-confluência, as células foram desprendidas com solução de Tripsina-EDTA 0,05%, neutralizadas com o mesmo volume de soro fetal bovino inativado, centrifugadas duas vezes por 10 minutos à 1500 rpm, ressuspensas em meio de cultura. A concentração celular foi ajustada em câmara de Neubauer, com viabilidade superior à 97%.

3.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Figura 4 – Fluxograma das condições experimentais utilizadas. As células normais e tumorais foram tratadas isoladamente com o quimioterápico DTIC, o composto DM-1 ou com a terapia de BNCT (incubação com BPA seguida de irradiação com nêutrons térmicos). Estes grupos foram comparados com as células que não receberam tratamento (controle) e com células que receberam somente a irradiação de nêutrons térmicos (controle irradiado).

- Grupo controle: células foram mantidas em meio de cultura completo;
- Grupo DM-1: células tratadas com o composto DM-1 diluído em solução salina 0,9 %;
- Grupo DTIC: células tratadas com o quimioterápico DTIC diluído em solução salina 0,9 %;
- Grupo controle Irradiado: células foram irradiadas nas mesmas condições que o grupo BNCT, porém sem receber o composto BPA (somente para avaliar os efeitos da radiação isolada, não foi utilizada como forma de tratamento);

- Grupo BNCT: células receberam o composto BPA e imediatamente antes da irradiação com nêutrons térmicos, o meio contendo BPA foi trocado por meio de cultura livre de ^{10}B .

Todos os protocolos são detalhados em cada metodologia.

3.3 IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para os protocolos em que foi utilizado o tratamento com BNCT, após 24 horas da adesão e confluência celular acima de 70%, as células foram tratadas com BPA na concentração da $\text{IC}_{50\%}$ de cada linhagem celular. As células foram irradiadas após 90 minutos de incubação com BPA por diferentes períodos de tempo, detalhados em cada metodologia. O local das irradiações foi o reator IEA-R1 instalado no IPEN, operando com potência de 3,5 MW, fluência de nêutrons térmicos de $2,3 \cdot 10^8 \pm 0,3 \cdot 10^8 \text{ n/cm}^2\text{s}$, nêutrons epitérmicos de $4,6 \cdot 10^6 \pm 0,1 \cdot 10^6 \text{ n/cm}^2\text{s}$ e nêutrons rápidos de $3,53 \cdot 10^7 \pm 0,1 \cdot 10^7 \text{ n/cm}^2\text{s}$. A dose de nêutrons térmicos absorvidos foi estimada em 4,2 Gy/h, enquanto a dose de interferência referente à radiação gama foi estimada em 2,1 Gy/h.

3.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE PROLIFERATIVA *IN VITRO* PELO TESTE COLORIMÉTRICO MTT

MTT é um ensaio colorimétrico quantitativo que mede a proliferação, a viabilidade e toxicidade celular. MTT é um sal de tetrazolium amarelo e a oxirredução do MTT leva à formação de cristais de formazan insolúveis em água e de coloração violácea. Esta reação ocorre apenas em células viáveis, através da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (Otake, 2005).

Após o desprendimento por tripsinização e centrifugação, as células (B16F10, MEWO, IPC-298, SKMEL-28, SKMEL-5, A375, L929, FN1, HUVEC e Melanócitos) foram plaqueadas na concentração de 10^5 células/mL em placas de 96 orifícios.

As células foram tratadas após 24 horas de adesão e confluência com diferentes concentrações do composto DM-1 (1 mg/mL á 0,002 mg/mL) e do quimioterápico DTIC (1 mg/mL á 0,002 mg/mL) diluídos em solução salina. Para cada linhagem celular e cada modalidade de tratamento foram realizados três experimentos separadamente em triplicata.

Para o tratamento com BNCT, após 24 horas da adesão e confluência celular, as células foram tratadas com diferentes concentrações de BPA (8,36; 4,18; 2,09; 1,04; e 0,52 mg/mL) e frutose (nas mesmas proporções para a diluição de BPA) (Yoshino et al., 1989) diluídas em solução salina. As concentrações escolhidas equivalem á quantidade de ^{10}B presente (440,0; 220,0; 110,0; 55,0; e 27,5 $\mu\text{g } ^{10}\text{B/mL}$), respectivamente. As células foram irradiadas por 120 minutos nas condições citadas no item 3.3.

A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-1)2,5-difenil tetrazolio brometo] (Mosmann, 1983). O sobrenadante da cultura celular foi retirado e armazenado em freezer -20°C para análise da produção de radicais livres (peroxidação lipídica). Foram adicionados 20 μL de MTT (5 mg/mL) às células, e estas incubadas por 3 horas em estufa contendo 5% de CO_2 a 37°C . Após este período, o meio foi removido e acrescentou-se 100 μL de metanol absoluto para dissolver os cristais de formazan formados e precipitados. A quantificação da absorbância foi avaliada espectrofotometricamente a 540 nm.

Avaliamos por esta metodologia a citotoxicidade das modalidades de tratamento para determinação matemática da equação da reta, a concentração inibitória 50% (IC_{50}) e o coeficiente de correlação (r^2).

Após o período de incubação com os compostos e seus respectivos tratamentos, as células foram fotodocumentadas no aumento de 40 vezes no microscópio óptico de inversão mais o aumento de 3 vezes da aquisição digitalizada em pixels em câmera digital.

3.5 DILUIÇÃO DO COMPOSTO BPA

O composto BPA possui baixa solubilidade em água, sendo assim, a opção para aumentar esta solubilidade é o uso de complexos orgânicos. Monossacarídeos aumentam a solubilidade de BPA em água, entretanto, é necessária uma série de etapas para complexar o monossacarídeo à BPA. Após adicionar a mesma quantidade dos dois compostos, BPA e frutose (1:1) em uma quantidade determinada de água ultrapura, deve-se elevar o pH da solução (que inicialmente é $6,0 \pm 0,5$) até 10 ou baixar até 2, e em seguida reajustar para $7,2 \pm 0,2$. A solução torna-se homogênea e o complexo formado permanece solubilizado por um período de até sete dias, sem a formação de precipitados, se conservada em geladeira (Lahann, 1999).

Somente o enantiômero puro L-BPA foi utilizado, o isolamento e a pureza foram controlados quimicamente e farmacologicamente pela empresa responsável pela síntese. O complexo BPA-frutose foi preparado utilizando-se metodologia referenciada na principal patente e em outros trabalhos (Figura 5). A BPA foi obtida da empresa Interpharma Praha, a.s. (Praga, República Checa) e convertida em BPA-frutose em nosso laboratório. Os resultados apresentados foram realizados com o composto BPA-frutose e estão indicados somente como BPA.

Figura 5 – Fórmula estrutural dos compostos D-frutofuranose (a), BPA (b) e o complexo BPA-Frutose (c) (Chen et al., 2006).

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE MELANINA PRODUZIDA PELAS CÉLULAS DE MELANOMA E MELANÓCITOS

As linhagens celulares de melanoma (B16F10, MEWO, IPC-298 e SKMEL-28) e melanócitos normais foram cultivadas em placas de 6 orifícios com a concentração inicial de 10^3 células/mL por 24 horas para adesão e confluência celular. Após este período, o meio de cultura foi removido, as células foram tripsinizadas, recolhidas em microtubo de centrifugação e em seguida foi adicionado o mesmo volume de soro fetal bovino para neutralização da tripsina. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos á 1500 rpm e os sobrenadantes foram descartados. Ao pellet resultante foram adicionados 800µL de NaOH 1M incubando-se a 100°C por 1 hora. Após este período, a quantidade de melanina foi avaliada espectrofotometricamente a 470nm (Abdel-Naser et al., 2003). Para cada linhagem celular e cada modalidade de tratamento foram realizados três experimentos separadamente em triplicata.

Os valores de melanina foram expressos em densidade óptica (OD)/ 10^3 células.

3.7 DETERMINAÇÃO DE PRODUTOS DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA POR QUANTIFICAÇÃO DE TBARS

Os sobrenadantes das culturas celulares gerados da mesma maneira como descritos na metodologia do MTT foram recolhidos e mantidos sob refrigeração de -20 °C até o momento da análise da peroxidação lipídica. A quantificação da peroxidação de lipídeos em culturas celulares é baseada na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) (Ohkawa, et al., 1979), predominantemente o malondialdeído (MDA), que é formado após a lipoperoxidação das membranas celulares. Estas substâncias produzem uma coloração característica que é medida espectrofotometricamente.

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente. Em um microtubo foi adicionado 50 μ L da referida amostra juntamente com 250 μ L de ácido tricloroacético - TCA 20 % (20 g de ácido tricloroacético em 100 mL de água ultrapura). Em outro microtubo, 50 μ L da mesma amostra foi adicionada juntamente com 250 μ L de ácido tiobarbitúrico – TBA 0,86 % (0,86 g de ácido tiobarbitúrico em 100 mL de TCA 20 %). Os microtubos foram colocados em banho-maria (100°C) por 20 minutos, seguido de resfriamento á 0°C por 20 minutos. Os microtubos foram centrifugados á 8000 rpm por 4 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação das TBARS. A leitura foi realizada com comprimento de onda de 535 nm em espectrofotômetro. Para cada linhagem celular e cada modalidade de tratamento foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

O cálculo dos valores de lipoperoxidação foi realizado descontando o valor do branco respectivo de cada série, subtraindo a absorbância da série de TBA da média da série de TCA e dividindo-se pelo coeficiente de extinção molar do MDA que é 0,0312. Os resultados foram expressos em nanomoles de MDA por mililitro (nM MDA/mL).

3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE APOPTÓTICA E NECROSE POR CITOMETRIA DE FLUXO

A finalidade desta análise foi determinar quantitativamente a porcentagem de células que se submetem a apoptose por virtude da habilidade de se ligarem a anexina V e de excluir o Iodeto de Propídio (PI). Anexina V, um membro do cálcio e proteínas ligadas a fosfolipídios, é uma proteína com atividade anticoagulante vascular que é encontrada em maior quantidade na face citosólica das membranas plasmáticas. A utilidade da anexina V em aplicações de citometria de fluxo é derivada de sua afinidade seletiva para fosfolipídios negativamente carregados.

Após o desprendimento e centrifugação das células, as mesmas foram ajustadas para a concentração de 5×10^5 células/mL, adicionadas em placas de 24 orifícios, com amostras em triplicata.

As células de melanoma B16F10, MEWO, IPC-298, SKMEL-28 e melanócitos normais foram tratados com a respectiva IC₅₀. O período de tratamento com DM-1 e DTIC foi de 6 horas, enquanto a BPA foi adicionada 90 minutos antes da irradiação. Para o tratamento com BNCT, as células foram irradiadas por 30 minutos no reator IEA-R1 nas mesmas condições de fluência de nêutrons citada no item 3.3.

Para cada linhagem celular e cada modalidade de tratamento foram realizados três experimentos separadamente em triplicata.

As células foram lavadas duas vezes em PBS a 4°C, ressuspensas em 100 µl de tampão de ligação e incubadas por mais 30 minutos com 1 µg de anexina V-FITC (Santa-Cruz) e 18 µg/ml de solução de iodeto de propídio (Sigma Chemical).

Células que expressam a fosfatidilserina na face exterior das membranas celulares ligam a anexina V e as células com uma membrana celular comprometida permitem que o Iodeto de propídio ligue-se ao DNA celular. As células resultantes, quando analisadas imediatamente por citometria de fluxo, apresentam quatro potenciais populações celulares: as células vivas não marcadas com nenhum fluorocromo, células necróticas marcadas somente com PI, células que se encontram no início apoptose marcadas somente com anexina V e quando há a dupla marcação (iodeto de propídio e anexina V) há apoptose em fase tardia. Canais de fluorescência: Anexina-V/FITC (FL-1) e Iodeto de Propídio/PE (FL-2).

3.9 QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO SOLÚVEL NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS CELULARES

Para quantificar a produção de colágeno solúvel pela matriz extracelular utilizamos a metodologia Picrosirius (Sirus-Red).

As células de melanoma B16F10 e SKMEL-28, fibroblastos FN1 e melanócitos normais foram tratados com 100 µM de DM-1, 100 µM de DTIC e 220 µg de ¹⁰B (4,18 mg/mL de BPA) para que não houvesse morte significativa, verificando-se assim a indução de alguns efeitos, tais como

produção de colágeno solúvel pela matriz extracelular. O período de tratamento com DM-1 e DTIC foi de 6 horas, enquanto a BPA foi adicionada 90 minutos antes da irradiação. Para o tratamento com BNCT, as células foram irradiadas por 30 minutos no reator IEA-R1 nas mesmas condições de fluência de nêutrons citada no item 3.3.

Após o tratamento das células, a placa foi colocada sem tampa em estufa a 37°C overnight para a secagem do seu conteúdo. Em seguida, adicionou-se 200 µL de solução de Bouim saturada e incubadas por uma hora. O fixador foi removido e adicionou-se 300 µL de água destilada em cada orifício. A placa foi seca em temperatura ambiente por aproximadamente duas horas. Após este período, acrescentou-se 200 µL do corante Picrosirius 0,1% por uma hora, sob leve agitação e proteção da luz. O corante foi removido cuidadosamente e adicionou-se 250 µL de HCl 0,01 M para a remoção do corante não aderido. A solução de HCl foi removida e adicionou-se 150 µL de NaOH 0,1 M por 30 minutos. O conteúdo da placa foi lido em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550nm (Junqueira et al., 1979). Para cada linhagem celular e cada modalidade de tratamento foram realizados três experimentos separadamente em triplicata.

3.10 QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO PRESENTE NA MATRIZ EXTRACELULAR NAS CULTURAS CELULARES

Após o desprendimento e centrifugação das células, as mesmas foram ajustadas para a concentração de 5×10^5 células/mL, adicionadas em placas de 24 orifícios, com amostras em triplicata.

As células de melanoma B16F10 e SKMEL-28, fibroblastos FN1 e melanócitos normais foram tratados com 100 µM de DM-1, 100 µM de DTIC e 220 µg de ^{10}B (4,18 mg/mL de BPA) para que não houvesse morte significativa, verificando a indução de alguns efeitos, tais como produção de colágeno solúvel pela matriz extracelular. O período de tratamento com DM-1 e DTIC foi de 6 horas, enquanto a BPA foi adicionada 90 minutos antes da irradiação. Para o tratamento com BNCT, as células foram irradiadas por 30

minutos no reator IEA-R1 nas mesmas condições de fluência de nêutrons citada no item 3.3.

Após o tratamento das células, o sobrenadante das culturas foi retirado para avaliação do colágeno solúvel e as placas, ainda com as células aderidas receberam 100 µL de glutaraldeído 0,5 % para a fixação. Após 24 horas, as placas foram secas em estufa 37°C por duas horas. Em seguida, foi adicionado 200 µL de álcool 98° por dois minutos por três vezes. Após este processo, adicionou-se álcool 70° por dois minutos por três vezes. O excesso de álcool foi retirado e as placas secaram em temperatura ambiente. Após a secagem foi adicionado 50 µL da solução de Picrosirius e as placas foram mantidas á 37°C por duas horas. As placas foram lavadas em água corrente para retirar o excesso do corante e secas em temperatura ambiente (Junqueira et al., 1979). Com o material seco, procederam-se as fotomicrografias das culturas celulares em microscópio invertido de luz polarizada (Zeiss). Para cada linhagem celular e cada modalidade de tratamento foram realizados três experimentos separadamente em triplicata.

3.11 ANÁLISE DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Para a análise do potencial de membrana mitocondrial foi utilizado o fluorocromo Rhodamine 123 Sigma-Aldrich (Rodamina 123), que inibe a função mitocondrial, assim marcando somente as mitocôndrias ativas ou viáveis. O fluorocromo Rodamina 123 liga-se às membranas mitocondriais e inibe o transporte de elétrons, retardando a respiração celular.

Após o desprendimento e centrifugação das células, as mesmas foram ajustadas para a concentração de 5×10^5 células/mL, adicionadas em placas de 24 orifícios. Para cada linhagem celular e cada modalidade de tratamento foram realizados três experimentos separadamente em triplicata.

As células de melanoma B16F10, MEWO, IPC-298, SKMEL-28, fibroblastos normais L929 e FN1 e melanócitos normais foram tratados com a respectiva IC₅₀. O período de tratamento com DM-1 e DTIC foi de 6 horas,

enquanto a BPA foi adicionada 90 minutos antes da irradiação. Para o tratamento com BNCT, as células foram irradiadas por 30 minutos no reator IEA-R1 nas mesmas condições de fluência de nêutrons citada no item 3.3.

Após o tratamento, o sobrenadante das amostras foi recolhido em microtubo com as células tripsinizadas. Todas as amostras foram centrifugadas por 10 minutos á 1800 rpm sob refrigeração de 4°C, o sobrenadante foi descartado, o pellet ressuspense em PBS, e a amostra congelada em temperatura de -80°C, mantendo-se esta condição até o momento do preparo das amostras para análise.

No momento da análise, as amostras foram centrifugadas á 1800 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 5 µL de Rodamina 123 (5 mg/mL) (Bernal et al., 1982) em cada tubo. As amostras foram colocadas em estufa de CO₂ (5%) á 37°C por 30 minutos. Após este período, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspense em 100 µL de tampão Fac's Flow (solução tampão, livre de azida sódica utilizada em citômetro de fluxo).

A leitura e análise da marcação da Rodamina 123 nas células foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) em intensidade de fluorescência FL-1H.

3.12. ANÁLISE DAS FASES DO CICLO NAS POPULAÇÕES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO

O Iodeto de Propídio (PI) é um fluorocromo que se intercala estequiometricamente às duplas fitas de DNA. A fluorescência captada em FL-2 é proporcional ao conteúdo de DNA na célula. Células diplóides que não estejam replicando (fases G₀/G₁ do ciclo celular) possuem conteúdo de células 2n, emitindo sinais de menor intensidade que as células situadas na fase S, durante a qual ocorre o aumento do conteúdo de DNA. Células em fase S, por sua vez, geram sinais de menor intensidade que aquelas situadas em G₂/M até que completem a replicação do conteúdo de DNA para 4n, que permanece assim durante a fase G₂ até a mitose, na qual cada

célula mãe dá origem a duas células filhas. As células situadas no pico hipodiplóide (sub-G1) possuem conteúdo de DNA menor que $2n$, e podem representar aumento na ocorrência de debris celulares e DNA fragmentado, característicos de eventos de morte celular. Todos os sinais gerados foram amplificados e convertidos pelo aparelho em pulsos, permitindo a construção dos gráficos de distribuição das células no ciclo celular. Considerando a existência de uma relação proporcional entre o aumento do conteúdo de DNA e a área do pulso gerado.

Após o desprendimento e centrifugação das células, as mesmas foram ajustadas para a concentração de 5×10^5 células/mL, adicionadas em placas de 24 orifícios. Para cada linhagem celular e cada modalidade de tratamento foram realizados três experimentos separadamente em triplicata.

As células de melanoma B16F10, MEWO, IPC-298, SKMEL-28, fibroblastos normais L929 e FN1 e melanócitos normais foram tratados com a respectiva IC_{50} . O período de tratamento com DM-1 e DTIC foi de 6 horas, enquanto a BPA foi adicionada 90 minutos antes da irradiação. Para o tratamento com BNCT, as células foram irradiadas por 30 minutos no reator IEA-R1 nas mesmas condições de fluência de nêutrons citada no item 3.3.

Para cada linhagem celular e cada modalidade de tratamento foram realizados experimentos separadamente.

As amostras foram tripsinizadas, centrifugadas por 10 minutos á 1800 rpm sob refrigeração de 4°C , o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em álcool 70° com RNase em temperatura de -20°C , mantendo-se esta condição até o momento do preparo das amostras para análise.

A determinação do ciclo celular foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD), utilizando a metodologia do iodeto de propídio. As suspensões celulares foram centrifugadas por 10 minutos á 1800 rpm sob refrigeração de 4°C , os sobrenadantes foram descartados e as amostras incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente com 30 mg/ml de solução de tripsina e em seguida com 5g/L de inibidor de tripsina e 0,1 g/L de ribonuclease – A. Após este período as células foram incubadas com 1,8

mg/mL de PI por 15 minutos, em temperatura de 4 °C, seguida da análise em citometria de fluxo (Moron et al., 2011).

A aquisição da população celular, em média de 10.000 eventos foi realizada pelo programa “Cell Quest” (BD) e o conteúdo de DNA medido em intensidade de fluorescência (FL2). Os resultados foram expressos em porcentagem média de células nas diferentes fases do ciclo celular: DNA fragmentado, Fase quiescente G0/G1, Fase de síntese - S e Fase G2/M.

3.13 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES CELULARES NAS LINHAGENS TUMORAIS E NORMAIS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após o desprendimento e centrifugação das células de melanoma B16F10 e melanócitos normais, as mesmas foram ajustadas para a concentração de 5×10^5 células/mL, adicionadas em placas de 24 orifícios. Para cada linhagem celular e cada modalidade de tratamento foram realizados três experimentos separadamente em triplicata. Após 24 horas da adesão e confluência, as células foram tratadas por 6 horas com o valor da $IC_{50\%}$ de cada composto (DM-1 e DTIC), e tratadas com BPA 90 minutos antes da irradiação com nêutrons térmicos. Para a terapia de BNCT, as células foram tratadas com o valor da $IC_{50\%}$ específica para cada linhagem e foram irradiadas por 30 minutos no reator IEA-R1 nas mesmas condições de fluência de nêutrons citada no item 3.3. Para cada linhagem celular e cada modalidade de tratamento foram realizados experimentos separadamente.

Todas as amostras foram centrifugadas por 10 minutos á 1800 rpm sob refrigeração de 4 °C, o sobrenadante foi descartado, o pellet ressuspenso em PBS, e a amostra congelada em temperatura de -80 °C, mantendo-se esta condição até o momento do preparo das amostras para análise.

Alíquotas de 100 µL das suspensões celulares foram incubadas por 1 hora, à 4°C, com 1 µg de anticorpo específico para os diversos marcadores celulares estudados na tabela 1 (p27, p21, Bcl-2, Bax, Bad, ciclina D1, caspase 3, caspase 8, citocromo c, TNF-R1, Ki-67 e Hsp-47) e 10 µL de

Triton X-100 0,1% para permeabilizar a membrana celular. Após este período as células foram centrifugadas por 10 minutos á 1500 rpm e lavadas com PBS gelado. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspenso em PBS contendo 0,1 % de paraformaldeído.

A leitura e análise da expressão do marcador foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) em intensidade de fluorescência FL-1/FL-2 de acordo com cada anticorpo.

Tabela 1 – Nomes, códigos e empresa fabricante dos anticorpos utilizados para as marcações celulares por citometria de fluxo

Anticorpos	Fabricante
p21 (SC 6246)	Santa Cruz®
p27 (SC 56454)	Santa Cruz®
Bcl-2 (SC 7382)	Santa Cruz®
Bax (SC 7480)	Santa Cruz®
Bad (#92915)	Cell Signaling®
Ciclina D1 (27618-500)	Abcam®
Caspase 3 (SC 7272)	Santa Cruz®
Caspase 8 (C4106)	Sigma®
Citocromo c (SC13156)	Santa Cruz®
TNF-R1 (SC52746)	Santa Cruz®
Ki-67 (SC 23900)	Santa Cruz®
HSP-47 (SC 8352)	Santa Cruz®

3.14 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES CELULARES NA LINHAGEM DE MELANOMA POR WESTERN BLOT

As células das linhagens de melanoma humano SKMEL-5 e A375 (10^6 células/ml) foram tratadas após 24 horas de adesão e confluência em placas de petri 60 mm. Estas linhagens celulares foram tratadas com o valor de IC₅₀ do composto DM-1 por 0, 3, 6 ou 24 horas. Após esse período, as

células foram lavadas com PBS e lisadas com solução de SDS. Os extratos celulares foram centrifugados a 10.000 rpm durante 10 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram agitados vigorosamente e aquecidos à 93°C durante 5 minutos. A concentração protéica do sobrenadante foi obtida por ensaio de BCA (Pierce, Rockford, IL) usando albumina de soro bovino com padrão. Aos extratos celulares foi adicionado o tampão Laemmli e aquecidos à 100°C durante 5 minutos antes de carregar o gel de eletroforese.

Aproximadamente 40 µg de proteínas foram carregadas no gel de eletroforese na presença de tampão. As proteínas migraram no gel por aproximadamente 2 horas, submetidas a uma diferença de potencial elétrico de 120 V. A transferência foi realizada em membranas de PVDF (Millipore, Bedford, MA), previamente ativadas com metanol em tampão de transferência. Após a transferência, as membranas foram incubadas com solução bloqueadora para saturar sítios de ligação inespecíficas da membrana. As soluções utilizadas estão apresentadas resumidamente na tabela 2.

Tabela 2 – Composição das soluções utilizadas na metodologia de Western Blot

Solução	Composição
Tampão de eletroforese	25mM Tris; 192mM Glicina; 20% SDS
Tampão de transferência	25mM Tris; 192mM Glicina; 20% Metanol
TBS-T	20mM Tris; 150mM NaCl Ph 7,6; 0,2% Tween
Solução bloqueadora	5% leite desnatado em TBS-T (p/v)
Tampão laemmli	Tris-HCl 25mM Ph 6,8; 2% SDS; 10% Glicerol; 0,002% azul de bromofenol
Tampão de lise	85mM Tris pH 6,8; 2% SDS; 100µM PMSF; 0,3µM aprotinina; 1µM leupeptina

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* à 4°C sob agitação constante, com os anticorpos detalhados na tabela 3 foram utilizados seguindo as especificações recomendadas em cada caso. Após a incubação, as membranas foram lavadas com TBS-T e então incubadas com o anticorpo secundário. Foram utilizados anticorpos secundários conjugados

com peroxidase *horseradish* (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). O sinal foi detectado com o uso do kit de detecção luminescente *ECL Western blotting detection reagents* (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). O anticorpo anti-vinculina foi utilizado representada como controle endógeno.

Tabela 3 – Nomes, códigos e empresa fabricante dos anticorpos utilizados para a análise da expressão proteica por Western Blot

Anticorpo	Diluição	Origem	Fabricante
Caspase 9	1:1000	coelho	Cell Signaling®
Caspase 3	1:1000	cabra	Santa Cruz®
Parp	1:1000	coelho	Cell Signaling®
Bcl-2	1:1000	coelho	Santa Cruz®
Bax	1:1000	coelho	Cell Signaling®
Mcl-1	1:1000	camundongo	Santa Cruz®
Bak	1:1000	cabra	Santa Cruz®
Bcl-XI	1:1000	coelho	Santa Cruz®
Bid	1:1000	coelho	Cell Signaling®
Vinculina	1:1000	camundongo	Sigma®

3.15 ANÁLISE DE INTEGRIDADE CELULAR COM HOECHST 33342 POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

O corante de DNA Hoechst 33342 (Sigma–Aldrich Chemical Co, St Louis, MO) foi utilizado para a detecção dos corpos apoptóticos e condensação nuclear por microscopia de fluorescência. As células de melanoma humano A375 (10^5 células/ml) foram tratadas após 24 horas de adesão e confluência em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro. Esta linhagem celular foi tratada com o valor de IC_{50} do composto DM-1 (65 μ M), do quimioterápico DTIC (548 μ M) ou com a combinação dos dois compostos DTIC (5 μ M) + DM-1 (5 μ M) por 24 horas. Após esse período, as lamínulas foram lavadas com PBS e incubadas com 2 μ g/mL do corante

Hoechst 33342 por 30 minutos à 37°C no escuro. As células foram lavadas com PBS, analisadas no microscópio de fluorescência (Carl Zeiss Jena) e fotografadas com uma câmera digital acoplada (Olympus DP11).

3.16 ANÁLISE DO CITOESQUELETO COM ACTINA E VINCULINA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As células de melanoma humano SKMEL-5 (2×10^5 células/ml) foram tratadas após 24 horas de adesão e confluência em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro. Esta linhagem celular foi tratada com o valor de IC_{50} do composto DM-1 (75 μ M) ou com 100 μ M do quimioterápico DTIC por 90 minutos. Após este período, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% durante 10 minutos à temperatura ambiente, antes da permeabilização por Triton-X-100. Após 5 minutos, as células foram saturadas com 1% (p/v) de albumina em PBS por 15 minutos e após 30 minutos, com os anticorpos primários anti-vinculina (diluição 1:400) e anti-actina BODIPY FL Phalloidin (diluição 1:50) (Invitrogen, Carlsbad, CA). O anticorpo secundário utilizado foi Cy³ cabra anti-camundongo IgG (diluição 1:50) (Jackson ImmunoResearch, Inc.). Após 30 minutos de incubação à 37°C, as células foram fixadas com Mowiol (Sigma–Aldrich Chemical Co, St Louis, MO). As amostras foram secas à 4°C, protegidas da luz. As imagens foram obtidas no microscópio Nikon eclipse E800.

3.17 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR POR MICROSCOPIA ÓPTICA

As células de melanoma humano SKMEL-5 (2×10^5 células/ml) foram tratadas após 24 horas de adesão e confluência em placas de Petri de 35 mm. Esta linhagem celular foi tratada com o valor de IC_{50} do composto DM-1 (75 μ M) ou com 100 μ M do quimioterápico DTIC por 90 minutos. Durante este período foram obtidas imagens das culturas celulares por microscopia óptica com contraste de fases (Zeiss Apoptome) à cada 5 minutos, durante

os 90 minutos de tratamento para análise da contração dos filopódios e mudanças na morfologia das células.

3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada utilizando-se a análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de comparação múltipla de TUKEY-KRAMER. Todos os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (dp), considerando-se como nível crítico para significância valores $p < 0.05$. As diferenças significantes entre o grupo controle e os grupos tratados foram indicados por: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$. Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0.

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE PROLIFERATIVA EM CÉLULAS TUMORAIS E NORMAIS

Após a cultura das linhagens celulares de melanoma B16F10, MEWO, IPC-298, SKMEL-28, A375 e SKMEL-5; fibroblastos normais L929 e FN1; células endoteliais normais HUVEC e melanócitos normais, as células foram incubadas com o reativo MTT para determinação da viabilidade celular. A concentração inibitória (IC_{50}) foi calculada a partir da equação da reta e todos os valores de R^2 foram maiores que 0.95, mostrando uma correlação extremamente significativa e positiva.

As IC_{50} das linhagens de melanoma tratadas com o quimioterápico DTIC foram muito semelhantes às encontradas nas linhagens de fibroblastos e melanócitos normais. Os valores situam-se entre 100 à 708 $\mu\text{g/mL}$ nas linhagens de melanoma e 733 à 793 $\mu\text{g/mL}$ nas linhagens de fibroblastos e melanócitos. Ainda, o quimioterápico DTIC apresentou valor de IC_{50} extremamente baixo para a linhagem HUVEC, indicando valores de citotoxicidade altamente significantes para as células endoteliais (Figura 6).

Figura 6 – Gráfico da viabilidade celular obtida pelo teste de MTT para determinação da IC_{50} em linhagens tumorais e normais após 24 horas de tratamento com o quimioterápico DTIC. Curva em verde: reta obtida, curva em preto: reta calculada. Os valores da porcentagem da viabilidade celular nas diferentes concentrações foram plotados e foram calculadas a equação da reta e a curva de regressão linear no programa Graph Pad Prism Instat 5.

O tratamento das linhagens celulares de melanoma com o composto DM-1 resultou em valores de IC_{50} altamente significativos entre 23 à 105 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando extrema toxicidade para estas linhagens tumorais. Em melanócitos e células endoteliais os valores de IC_{50} encontrados foram maiores em relação ao quimioterápico DTIC, evidenciando a baixa toxicidade do composto DM-1. Em fibroblastos normais não foi observado este potencial de citotoxicidade nas concentrações utilizadas (Figura 7).

Figura 7 - Gráfico da viabilidade celular obtida pelo teste de MTT para determinação da IC_{50} em linhagens tumorais e normais após 24 horas de tratamento com o composto DM-1. Curva em azul: reta obtida, curva em preto: reta calculada. Os valores da porcentagem da viabilidade celular nas diferentes concentrações foram plotados e foram calculadas a equação da reta e a curva de regressão linear no programa Graph Pad Prism InStat 5.

A BNCT foi efetiva para o tratamento das células de melanoma de todas as linhagens, com valores de IC_{50} entre 3,31 á 6,93mg/mL. Em fibroblastos e melanócitos normais, podemos observar valores de IC_{50} entre 34,37 e 103,60mg/mL, demonstrando que é necessário uma quantidade muito superior de BPA, com posterior irradiação de nêutrons térmicos, para que haja inibição do crescimento de células normais, em relação á quantidade necessária para induzir citotoxicidade em células tumorais. A linhagem de células endoteliais HUVEC mostrou-se mais sensível á terapia de BNCT, entretanto, o valor de IC_{50} encontrado ainda permanece significativamente alto em relação às células tumorais (Figura 8).

Figura 8 - Gráfico da viabilidade celular obtida pelo teste de MTT para determinação da IC₅₀ em linhagens tumorais e normais após administração de BPA e posterior irradiação com nêutrons térmicos. Curva em rosa: reta obtida, curva em preto: reta calculada. Os valores da porcentagem da viabilidade celular nas diferentes concentrações foram plotados e foram calculadas a equação da reta e a curva de regressão linear no programa Graph Pad Prism Instat 5.

Comparando-se as equivalências-molares das modalidades terapêuticas, podemos concluir que são necessárias altas quantidades do composto DM-1, de BPA e consequentemente do isótopo ^{10}B para que ocorram efeitos citotóxicos em células normais, em comparação ao quimioterápico DTIC que induz citotoxicidade sem seletividade para as linhagens tumorais e normais. Apenas a linhagem de melanócitos normais apresenta valor de IC_{50} na equivalência-molar do composto DM-1 maior do que o quimioterápico DTIC. Porém, tal fato deve-se à massa do composto DM-1 ser praticamente o dobro da massa do quimioterápico DTIC. As comparações entre os valores de IC_{50} e as diferentes equivalências-molares estão apresentadas nas tabelas 4 e 5, respectivamente. As linhagens de melanoma humano SKMEL-5 e A375 foram tratadas apenas com o composto DM-1 ou com o quimioterápico DTIC para posterior utilização nos ensaios de western blot, Hoechst, análise do citoesqueleto e/ou análise da retração dos filopódios em colaboração com a Universidade de Barcelona.

Tabela 4 – Comparação entre os valores de $\text{IC}_{50\%}$ de todas as modalidades de tratamento nas linhagens tumorais e normais.

$\text{IC}_{50\%}$	DTIC ($\mu\text{g/mL}$)	DM-1 ($\mu\text{g/mL}$)	BPA (mg/mL)	^{10}B ($\mu\text{g/mL}$)
B16F10	708	29	3,31	172
MEWO	437	105	6,93	360
IPC-298	583	104	5,68	295
SKMEL-28	620	92	3,71	192
MELANÓCITOS	754	1050	34,37	1807
HUVEC	32	830	13,37	703
L929	733	18020	103,60	5387
FN1	793	6860	53,06	2759
SKMEL-5	30	26	-	-
A375	100	23	-	-

Tabela 5 – Equivalência-molar dos valores de IC_{50%} de todas as modalidades de tratamento nas linhagens tumorais e normais.

IC_{50%}	DTIC (μM)	DM-1 (μM)	BPA (μM)
B16F10	3886	83	15836
MEWO	2398	302	33156
IPC-298	3200	299	27175
SKMEL-28	3403	264	17750
MELANÓCITOS	4123	3004	164433
HUVEC	175	2375	63965
L929	4023	51574	495670
FN1	4352	19633	253863
SKMEL-5	164	75	-
A375	548	65	-

4.2 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE PRODUTOS DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA POR QUANTIFICAÇÃO DE TBARS

A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) nas diferentes modalidades de tratamento foi avaliada em quantidade de radicais livres formados a partir da peroxidação das membranas celulares com a liberação de malondialdeído.

O tratamento com o quimioterápico DTIC resultou em uma significativa formação de radicais peroxidados lipídicos das membranas celulares das linhagens de melanoma, porém com danos oxidativos significativos nas linhagens de fibroblastos, células endoteliais e melanócitos normais (Figura 9).

A quantificação de TBARs nas linhagens tratadas com o composto DM-1 demonstrou efeito deletério somente em células de melanoma, sem uma produção significativa de radicais livres em células normais (Figura 10).

A BNCT também se mostrou citoprotetora, pois induziu aumento significativo de TBARs em células de melanoma, sem aumentar significativamente este potencial em células normais. Células irradiadas sem a adição de BPA, utilizadas como controle irradiado foram analisadas para verificar se havia citotoxicidade induzida apenas pela radiação de nêutrons térmicos. Entretanto, somente a radiação não se mostrou efetiva para induzir aumento na síntese de radicais livres peroxidados (Figura 11).

As comparações entre a razão da efetividade do quimioterápico DTIC, composto DM-1 e a terapia de BNCT em relação ao grupo controle podem ser observadas nas tabelas 6, 7 e 8.

Figura 9 – Valores das médias $\pm$ dp dos radicais livres poliinsaturados peroxidados (Malondialdeído – MDA) formados no sobrenadante das culturas das linhagens normais e tumorais tratados com o quimioterápico DTIC. Linhagens: B16F10 (A), MEWO (B), IPC-298 (C), SKMEL-28 (D), Melanócitos (E), HUVEC (F), L929 (G) e FN1 (H). Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

Figura 10 - Valores das médias $\pm$ dp dos radicais livres poliinsaturados peroxidados (Malondialdeído – MDA) formados no sobrenadante das culturas das linhagens normais e tumorais tratados com o composto DM-1. Linhagens: B16F10 (A), MEWO (B), IPC-298 (C), SKMEL-28 (D), Melanócitos (E), HUVEC (F), L929 (G) e FN1 (H). Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

Figura 11 – Valores das médias $\pm$ dp dos radicais livres poliinsaturados peroxidados (Malondialdeído – MDA) formados no sobrenadante das culturas das linhagens normais e tumorais tratados com a terapia de BNCT. Linhagens: B16F10 (A), MEWO (B), IPC-298 (C), SKMEL-28 (D), Melanócitos (E), HUVEC (F), L929 (G) e FN1 (H). Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

Tabela 6 - Comparação da eficácia do quimioterápico DTIC na produção de radicais livres poliinsaturados peroxidados em relação ao grupo Controle.

DTIC (mg/mL)	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008	0,004	0,002
B16F10	11,95	5,70	5,03	4,70	4,09	2,92	2,41	2,23	2,15	1,95
MEWO	134,32	57,07	46,18	29,07	17,50	11,07	8,57	8,04	7,50	5,36
IPC-298	15,96	6,79	6,34	6,17	6,12	6,02	5,65	5,37	4,98	4,70
SKMEL-28	12,15	5,90	5,09	4,93	4,23	3,09	2,46	2,27	2,22	2,09
MELANÓCITOS	4,13	2,33	1,59	1,53	1,51	1,42	1,36	1,23	1,13	0,99
HUVEC	52,59	21,22	14,50	9,27	6,28	3,71	3,56	2,29	1,99	1,29
L929	11,79	5,66	5,00	4,21	3,95	2,89	2,37	2,21	2,08	1,84
FN1	6,72	4,19	3,40	2,97	2,79	2,70	1,33	1,21	1,06	1,01

Tabela 7 - Comparação da eficácia do composto DM-1 na produção de radicais livres poliinsaturados peroxidados em relação ao grupo Controle.

DM-1 (mg/mL)	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008	0,004	0,002
B16F10	86,10	82,48	79,87	38,86	24,36	22,42	17,99	17,38	16,31	13,49
MEWO	55,36	50,71	48,21	34,13	25,11	24,34	22,96	22,93	22,68	22,50
IPC-298	18,45	18,13	17,70	17,63	11,72	3,80	3,66	3,22	2,90	2,79
SKMEL-28	13,90	13,51	12,77	6,21	3,96	3,58	2,94	2,62	2,27	1,63
MELANÓCITOS	1,85	1,47	1,31	1,17	1,14	1,08	1,03	0,98	0,82	0,81
HUVEC	2,63	1,46	1,19	1,10	1,08	1,08	1,03	1,02	1,02	1,01
L929	2,24	2,11	2,03	1,94	1,95	1,89	1,87	1,84	1,84	1,82
FN1	1,34	1,27	1,21	1,18	1,16	1,15	1,13	1,10	1,07	1,04

Tabela 8 - Comparação da eficácia da terapia de BNCT na produção de radicais livres poliinsaturados peroxidados em relação ao grupo Controle.

BPA (mg/mL)	Controle Irradiado	8,36	4,18	2,09	1,045	0,52
B16F10	1,03	28,65	25,08	20,28	14,87	2,79
MEWO	2,50	11,04	10,50	10,11	7,11	5,79
IPC-298	1,02	14,19	14,07	11,28	10,34	9,31
SKMEL-28	1,02	20,08	15,03	13,84	13,59	11,90
MELANÓCITOS	1,00	1,89	1,74	1,53	1,32	1,14
HUVEC	1,45	2,20	1,79	1,29	1,24	1,00
L929	1,13	2,32	2,00	1,71	1,68	1,39
FN1	1,13	2,90	2,69	2,36	1,73	1,16

4.3 ASPECTOS CITOLÓGICOS DAS LINHAGENS TUMORAIS E NORMAIS

As linhagens de melanoma B16F10, MEWO, IPC-298 e SKMEL-28, além das linhagens normais de fibroblastos L929 e FN1, células endoteliais HUVEC e melanócitos foram tratadas com diferentes concentrações do quimioterápico Dacarbazina e do composto DM-1 (1 mg/mL á 0,002 mg/mL) e de BPA (8,36 mg/mL á 0,52 mg/mL). Para o tratamento com BNCT, as células foram irradiadas por 120 minutos no reator IEA-R1 nas mesmas condições de fluência de nêutrons citada no item 3.3. As imagens foram adquiridas à partir das amostras da metodologia do MTT.

As células da linhagem de melanoma murino B16F10 tratadas com o quimioterápico DTIC apresentaram perda de contornos celulares e formação de debris. No tratamento com o composto DM-1, pode-se evidenciar a presença de corpos apoptóticos, debris, perda dos contornos celulares com possível perda de adesão focal, além da significativa perda da densidade celular em todas as concentrações analisadas. Ainda, com o tratamento pela radioterapia de BNCT observa-se presença de debris e morte celular evidente nas maiores concentrações de BPA (Figuras 12, 13 e 14).

Figura 12 – Aspecto morfológico das culturas de melanoma B16F10 tratadas com as diferentes concentrações de DTIC. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Figura 13 – Aspecto morfológico das culturas de melanoma B16F10 tratadas com as diferentes concentrações de DM-1. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Figura 14 – Aspecto morfológico das culturas de melanoma B16F10 tratadas com as diferentes concentrações de BPA seguido da irradiação com nêutrons térmicos. Aumento 40x.

Na linhagem de melanoma humano MEWO há presença evidente de morte celular no tratamento com DTIC nas maiores concentrações, enquanto no tratamento com o composto DM-1 nota-se a presença de corpos apoptóticos, formação de vacúolos citoplasmáticos, perda de adesão celular e contornos disformes da membrana em todas as concentrações. A radioterapia de BNCT induziu evidente morte celular com total perda das características morfológicas desta linhagem e presença abundante de restos celulares no sobrenadante em todas as concentrações (Figuras 15, 16 e 17).

Figura 15 – Aspecto morfológico das culturas de melanoma MEWO tratadas com as diferentes concentrações de DTIC. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Figura 16 – Aspecto morfológico das culturas de melanoma MEWO tratadas com as diferentes concentrações de DM-1. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Figura 17 – Aspecto morfológico das culturas de melanoma MEWO tratadas com as diferentes concentrações de BPA seguido da irradiação com nêutrons térmicos. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

O tratamento com o quimioterápico DTIC na linhagem de melanoma IPC-298 evidenciou a presença de contornos esféricos da membrana citoplasmática até a concentração de 0,15 mg/mL. O composto DM-1 induziu perda dos contornos celulares em todas as concentrações com presença de debris e restos celulares. O tratamento com a radioterapia de BNCT apontou o desarranjo do conteúdo nuclear e evidente morte celular em todas as concentrações (Figuras 18, 19 e 20).

Figura 18 – Aspecto morfológico das culturas de melanoma IPC-298 tratadas com as diferentes concentrações de DTIC. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Figura 19 – Aspecto morfológico das culturas de melanoma IPC-298 tratadas com as diferentes concentrações de DM-1. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Figura 20 – Aspecto morfológico das culturas de melanoma IPC-298 tratadas com as diferentes concentrações de BPA seguido da irradiação com nêutrons térmicos. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Os mesmos parâmetros celulares também foram encontrados nos tratamentos da linhagem de melanoma humano SKMEL-28. Com o quimioterápico DTIC evidenciou-se morte celular nas maiores concentrações, enquanto que os tratamentos com o composto DM-1 e a radioterapia de BNCT apresentaram maior quantidade de debris e formação de corpos apoptóticos. Figuras 21, 22 e 23. Em todas as linhagens de melanoma, no tratamento com a BNCT também foram capturadas imagens das células que receberam somente a irradiação com nêutrons, utilizadas como controle irradiado para comprovar o dano mínimo que estas células sofreram ao serem irradiadas sem BPA.

Figura 21 – Aspecto morfológico das culturas de melanoma SKMEL-28 tratadas com as diferentes concentrações de DTIC. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Figura 22 – Aspecto morfológico das culturas de melanoma SKMEL-28 tratadas com as diferentes concentrações de DM-1. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Figura 23 – Aspecto morfológico das culturas de melanoma SKMEL-28 tratadas com as diferentes concentrações de BPA seguido da irradiação com nêutrons térmicos. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Em fibroblastos murinos normais da linhagem L929, o tratamento com o quimioterápico DTIC induziu alterações nos contornos celulares com presença de células esféricas em injúria. O tratamento com o composto DM-1 não produziu modificações em todas as concentrações testadas nesta linhagem. A BNCT também não induziu alterações significativas na população de células L929, não interferindo na quantidade e nos aspectos morfológicos destes fibroblastos (Figuras 24, 25 e 26).

Figura 24 – Aspecto morfológico das culturas de fibroblastos murinos normais L929 tratadas com as diferentes concentrações de DTIC. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Figura 25 – Aspecto morfológico das culturas de fibroblastos murinos normais L929 tratadas com as diferentes concentrações de DM-1. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Figura 26 – Aspecto morfológico das culturas de fibroblastos murinos normais L929 tratadas com as diferentes concentrações de BPA seguido da irradiação com nêutrons térmicos. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Os fibroblastos humanos normais da linhagem FN1 tratados com o quimioterápico DTIC sofreram uma significativa diminuição da densidade celular, com evidente injúria e morte celular. As imagens do tratamento com o composto DM-1 foram semelhantes ao grupo controle, sem alterações significativas. A BNCT causou poucas modificações na densidade celular, sem a presença de modificações na estrutura e no arranjo do citoesqueleto (Figuras 27, 28 e 29). As imagens das células do grupo controle Irradiado em fibroblastos normais evidenciou pequenos danos celulares e justificou a presença de alterações morfológicas provocadas na BNCT.

Figura 27 – Aspecto morfológico das culturas de fibroblastos humanos normais FN1 tratadas com as diferentes concentrações de DTIC. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Figura 28 – Aspecto morfológico das culturas de fibroblastos humanos normais FN1 tratadas com as diferentes concentrações de DM-1. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Figura 29 – Aspecto morfológico das culturas de fibroblastos humanos normais FN1 tratadas com as diferentes concentrações de BPA seguido da irradiação com nêutrons térmicos. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

As células endoteliais humanas HUVEC tratadas com o quimioterápico DTIC apresentaram perda de contornos celulares, formação de debris e evidências de injúria celular. O tratamento com o composto DM-1 não demonstrou citotoxicidade significativa, pois não induziu modificações expressivas na confluência e morfologia desta linhagem. Ainda, com o tratamento com BNCT pode-se observar presença de debris e morte celular evidente nas maiores concentrações de BPA. A BNCT não provocou modificações significantes na densidade celular, sem a presença de modificações na estrutura e no arranjo do citoesqueleto (Figuras 30, 31 e 32).

As imagens capturadas das células do grupo controle irradiado evidenciaram pequenos danos celulares e justificou a presença de alterações morfológicas provocadas pela BNCT.

Figura 30 – Aspecto morfológico das culturas de células endoteliais humanas normais HUVEC tratadas com as diferentes concentrações de DTIC. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Figura 31 – Aspecto morfológico das culturas de células endoteliais humanas normais HUVEC tratadas com as diferentes concentrações de DM-1. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Figura 32 – Aspecto morfológico das culturas de células endoteliais humanas normais HUVEC tratadas com as diferentes concentrações de BPA seguido da irradiação com nêutrons térmicos. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Os melanócitos normais tratados com o quimioterápico DTIC apresentaram severa diminuição na densidade populacional e aumento na formação de restos celulares. O tratamento com o composto DM-1 não demonstrou modificações significantes na confluência e morfologia desta linhagem normal. O tratamento com BNCT revelou poucas modificações na densidade celular, sem a presença de alterações na estrutura do citoesqueleto (Figuras 33, 34 e 35).

Figura 33 – Aspecto morfológico das culturas de melanócitos humanos normais tratados com as diferentes concentrações de DTIC. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Figura 34 – Aspecto morfológico das culturas de melanócitos humanos normais tratados com as diferentes concentrações de DM-1. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

Figura 35 – Aspecto morfológico das culturas de melanócitos humanos normais tratados com as diferentes concentrações de BPA seguido da irradiação com nêutrons térmicos. Objetiva de 40x. Imagem obtida no microscópio invertido no aumento 40x.

4.4 AVALIAÇÃO DA PROPORÇÃO DE CÉLULAS MORTAS POR APOPTOSE E NECROSE

As linhagens de melanoma B16F10, MEWO, SKMEL-28 e IPC-298 e melanócitos normais foram submetidas à análise da atividade apoptótica pela metodologia da expressão de Anexina V e iodeto de propídio (PI), por citometria de fluxo.

As linhagens foram tratadas com os respectivos valores de IC_{50%} para cada tipo tumoral em cada modalidade de tratamento (como descrito no item materiais e métodos).

Após a aquisição no citometro de fluxo, a indicação dos quadrantes nos gráficos do tipo Dot-plot foram as seguintes: quadrante inferior esquerdo: células vivas; quadrante superior esquerdo: células em necrose; quadrante inferior direito: células em apoptose na fase inicial; quadrante superior direito: células em apoptose na fase tardia. Sendo o eixo das abscissas o canal de fluorescência FL-1H (Anexina-V) e o eixo das ordenadas o canal de fluorescência FL-2H (PI).

Em todas as linhagens de melanoma foram encontradas menores quantidade de células vivas em todos os tratamentos, principalmente com o composto DM-1. A quantidade de necrose foi maior nos tratamentos com o quimioterápico DTIC e a terapia de BNCT, enquanto a modalidade de tratamento DM-1 não induziu aumento da morte celular por esta via. A quantificação de proporção de células em apoptose tardia foi extremamente significativa no tratamento com o composto DM-1, indicando a via pela qual esta terapia induz morte celular.

As diversas modalidades de tratamento estudadas não ocasionaram diminuição na viabilidade celular ou mudanças significativas na proporção de melanócitos normais em necrose e apoptose (Figuras 36 e 37).

Figura 36 - Gráficos representativos do tipo Dot-plot adquiridos em citômetro de fluxo e analisados no programa WinMDI 2.8 das populações celulares marcadas com Anexina-V (FL-1 – eixo X) e PI (FL-2 – eixo Y) das linhagens de melanoma B16F10, MEWO, IPC-298 e SKMEL-28 e melanócitos normais do grupo controle, tratados com o quimioterápico DTIC, composto DM-1 e BNCT.

Figura 37 – Gráfico de barras representando média±dp da proporção das linhagens de melanoma B16F10 (A), MEWO (B), IPC-298 (C) e SKMEL-28 (D) e melanócitos normais (E) de células vivas, em processo de necrose ou em processo de apoptose (inicial e tardia) nos diferentes esquemas de tratamento. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER. ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

4.5 ANÁLISE DA QUANTIDADE DE COLÁGENO SINTETIZADO SOLÚVEL E NA MATRIZ EXTRACELULAR

As linhagens de melanoma B16F10 e SKMEL-28, fibroblastos normais FN1 e melanócitos normais foram analisadas quanto à capacidade de sintetizar colágeno e liberá-lo no meio de cultura e na constituição de sua matriz extracelular (MEC) para conferir adesão e meio pelos quais as células trocam metabólitos e captam nutrientes dos tecidos.

Neste trabalho foi utilizada a metodologia de Picrosirius (Sirius-Red) para quantificar a síntese de colágeno solúvel no sobrenadante da cultura celular e analisar a proporção colágeno na matriz extracelular nas mesmas condições. A quantidade de colágeno solúvel na linhagem de melanoma B16F10 e SKMEL-28 foi significativamente menor em todos os tratamentos, entretanto, o quimioterápico DTIC induziu diminuição da síntese de colágeno também na linhagem normal FN1. A terapia de BNCT pouco influenciou a produção desta proteína. A quantidade de colágeno solúvel sintetizado pelos melanócitos normais do grupo controle foi similar aos tratados, conferindo apenas um moderado aumento no tratamento com o composto DM-1 e o quimioterápico DTIC (Figura 38).

Figura 38 – Gráfico de barras das médias $\pm$ dp da quantidade de colágeno solúvel sintetizado e liberado no meio de cultura pelo método colorimétrico de Picrosirius das linhagens de melanoma B16F10 (A), SKMEL-28 (B), melanócitos normais (C) e fibroblastos humanos normais FN1 (D) tratados com as diferentes modalidades terapêuticas. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

A análise da proporção de colágeno na MEC nas linhagens de melanoma B16F10 e SKMEL-28 foi diminuída em todos os tratamentos, porém o quimioterápico DTIC também induziu diminuição na presença de colágeno da MEC em células normais, indicando que o protocolo com este fármaco implica em severos efeitos colaterais. A linhagem de melanócitos normais não apresentou alterações significativas em nenhuma das modalidades de tratamento quanto ao aumento ou diminuição da proporção de colágeno na MEC (Figura 39).

As imagens representativas das culturas celulares coradas pelo Picrosirius foram visualizadas pelo programa *Image J*, versão 2.9 para análise 3D e composição dos gráficos quantitativos que estão apresentados na figura 40. A coloração vermelha indica o colágeno no arcabouço da matriz extracelular e a coloração verde foi utilizada como fator de diferenciação do fundo da placa de cultivo. A figura 41 representa as imagens em 3D das culturas celulares das linhagens de melanoma, fibroblastos e melanócitos tratados com todas as modalidades terapêuticas e o grupo controle.

Figura 39 – Gráfico de barras das médias $\pm$ dp da proporção de colágeno na matriz extracelular das culturas das linhagens de melanoma B16F10 (A), SKMEL-28 (B), melanócitos normais (C) e fibroblastos humanos normais FN1 (D) tratados com as diferentes modalidades terapêuticas. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

Figura 40 – Imagens 2D obtidas no programa de análise e morfometria *Image J*, versão 2.9 das linhagens de melanoma B16F10, SKMEL-28, fibroblastos humanos normais FN1 e melanócitos normais coradas com Picrosirius. A coloração vermelha indica o colágeno do arcabouço da matriz extracelular e a coloração verde foi utilizada como fator de diferenciação do fundo da placa de cultivo.

Figura 41 – Imagens 3D obtidas no programa de análise e morfometria *Image J*, versão 2.9 das linhagens de melanoma B16F10, SKMEL-28, fibroblastos humanos normais FN1 e melanócitos normais coradas com Picrosirius. A coloração vermelha indica o colágeno no arcabouço da matriz extracelular e a coloração verde foi utilizada como fator de diferenciação do fundo da placa de cultivo.

4.6 ANÁLISE DO POTENCIAL ELÉTRICO DA MEMBRANA MITOCONDRIAL PELO FLUOROCROMO RODAMINA 123 POR CITOMETRIA DE FLUXO

As linhagens de melanoma B16F10, MEWO, SKMEL-28 e IPC-298, fibroblastos normais L929 e FN1 e melanócitos normais foram submetidas à análise do potencial da membrana mitocondrial pelo fluorocromo rodamina 123.

A técnica de análise da rodamina 123 por citometria de fluxo permite analisar a viabilidade das mitocôndrias celulares, fornecendo parâmetros como células viáveis e/ou mitocôndrias metabolicamente ativas ou células inviáveis e/ou mitocôndrias metabolicamente inativas em que as células permanecem preservadas ou sofrem alterações que levam à morte. Ou seja, as células marcadas com Rodamina não tiveram a função mitocondrial inibida pela ligação das membranas mitocondriais no transporte de elétrons. As células que não foram marcadas ou com intensidade de fluorescência menor, não possuíam transporte ativo de elétrons com consequente inibição da utilização das mitocôndrias. Estas determinações foram obtidas com base na intensidade de fluorescência captada pela citometria, em que a população com maior intensidade de fluorescência foi identificada como viável e a com menor intensidade foi identificada como a população inviável. O *overlay*, ou sobreposição, dos histogramas obtidos no citômetro de fluxo foi utilizado para demonstrar a eficácia de determinado tratamento frente ao grupo controle.

Na linhagem de melanoma B16F10, tratada por 6 horas com o valor de IC_{50} para cada tratamento e tratada por 30 minutos no tratamento com a BNCT com o valor da IC_{50} de BPA pode-se observar pouca indução de citotoxicidade com o quimioterápico em comparação aos tratamentos com o composto DM-1 e à BNCT, que obtiveram diferenças significantes em relação ao grupo controle. No grupo controle irradiado não se obteve diferenças significativas em relação ao controle, não afetando assim a utilização da BNCT. O *overlay* representativo das comparações das

populações tratadas *versus* à população controle evidencia o potencial citotóxico do composto DM-1 e da BNCT nesta linhagem tumoral (Figura 42).

Figura 42 – Gráfico do tipo *overlay* representativo das populações celulares de melanoma B16F10 comparando-se o grupo Controle e os grupos tratados com o composto DM-1 (A), o quimioterápico Dacarbazina (B) e a BNCT (C) analisados pelo programa *FlowJo*.

Na linhagem de melanoma MEWO, observa-se citotoxicidade significativa com o quimioterápico DTIC, semelhante ao grupo tratado com o composto DM-1. A BNCT mostrou ser extremamente citotóxica para esta linhagem, com apenas 1,86% de mitocôndrias viáveis. No grupo controle irradiado induziu baixa toxicidade, porém com valores acima da média dos tratamentos utilizados (36,46%). O *overlay* representativo das comparações das populações tratadas *versus* à população controle evidenciou o potencial citotóxico do composto DM-1, do quimioterápico DTIC e principalmente da radioterapia de BNCT (Figura 43).

Figura 43 – Gráfico do tipo *overlay* representativo das populações celulares de melanoma MEWO comparando-se o grupo Controle e os grupos tratados com o composto DM-1 (A), o quimioterápico Dacarbazina (B) e a BNCT (C) analisados pelo programa *FlowJo*.

Na linhagem de melanoma IPC-298, pode-se observar indução significativa de citotoxicidade em todos os tratamentos, sem alterações relevantes entre o quimioterápico DTIC e a BNCT. Ainda, nota-se que o controle irradiado também induziu citotoxicidade nesta linhagem. O resultado mais relevante foi o tratamento com o composto DM-1 que produziu intenso desequilíbrio na quantidade de mitocôndrias metabolicamente inativas (apenas 1,81%). O *overlay* representativo das comparações das populações tratadas *versus* à população controle evidencia o potencial citotóxico de todas as modalidades (Figura 44).

Figura 44 – Gráfico do tipo *overlay* representativo das populações celulares de melanoma IPC-298 comparando-se o grupo Controle e os grupos tratados com o composto DM-1 (A), o quimioterápico Dacarbazina (B) e a BNCT (C) analisados pelo programa *FlowJo*.

Na linhagem de melanoma humano SKMEL-28, o quimioterápico DTIC gerou danos semelhantes ao grupo controle. Os tratamentos com o composto DM-1 e à radioterapia de BNCT obtiveram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo sem tratamento. O grupo controle irradiado não obteve diferenças significativas em relação ao controle, não afetando assim a utilização da radioterapia de BNCT. O *overlay* representativo das comparações das populações tratadas *versus* à população controle evidencia o potencial citotóxico do DM-1 e da BNCT nesta linhagem tumoral (Figura 45).

Figura 45 – Gráfico do tipo *overlay* representativo das populações celulares de melanoma SKMEL-28 comparando-se o grupo Controle e os grupos tratados com o composto DM-1 (A), o quimioterápico Dacarbazina (B) e a BNCT (C) analisados pelo programa *FlowJo*.

Os fibroblastos murinos normais L929 sofreram danos citotóxicos com tratamento com o quimioterápico DTIC em comparação aos tratamentos com o composto DM-1 e à radioterapia de BNCT, que não obtiveram diferenças significantes em relação ao grupo controle. O grupo controle irradiado também não obteve diferenças significantes em relação ao controle, não afetando assim a utilização da radioterapia de BNCT. O *overlay* representativo das comparações das populações tratadas *versus* à população controle evidencia a similaridade entre as populações de células viáveis no tratamento com o composto DM-1 e da BNCT (Figura 46).

Figura 46 – Gráfico do tipo *overlay* representativo das populações celulares de fibroblastos L929 comparando-se o grupo Controle e os grupos tratados com o composto DM-1 (A), o quimioterápico Dacarbazina (B) e a BNCT (C) analisados pelo programa *FlowJo*.

Na linhagem de fibroblastos humanos normais FN1 observa-se que todas as modalidades de tratamento não induziram citotoxicidade significativa em comparação ao grupo controle. O overlay representativo das comparações das populações tratadas *versus* à população controle evidencia a similaridade entre as populações de células viáveis nos tratamentos comparados ao grupo controle (Figura 47).

Figura 47 – Gráfico do tipo *overlay* representativo das populações celulares de fibroblastos FN1 comparando-se o grupo Controle e os grupos tratados com o composto DM-1 (A), o quimioterápico Dacarbazina (B) e a BNCT (C) analisados pelo programa *FlowJo*.

O tratamento com o quimioterápico DTIC induziu moderada citotoxicidade em melanócitos normais em comparação aos tratamentos com o composto DM-1 e à radioterapia de BNCT, que não resultaram em diminuição significativa do potencial elétrico da membrana mitocondrial desta linhagem. O *overlay* representativo das comparações das populações tratadas *versus* à população controle evidencia o potencial citoprotetor do composto DM-1 e BNCT nesta linhagem normal (Figura 48).

Figura 48 – Gráfico do tipo *overlay* representativo das populações celulares marcadas de melanócitos normais comparando-se o grupo Controle e os grupos tratados com o composto DM-1 (A), o quimioterápico Dacarbazina (B) e a BNCT (C) analisados pelo programa *FlowJo*.

A atividade funcional e metabólica mitocondrial das linhagens tumorais e normais analisadas está representada na figura 49. O grupo controle irradiado não apresentou modificações em nenhuma das linhagens estudadas e por este razão, os dados não foram apresentados.

Figura 49 – Gráfico de barras sobrepostas representando a média $\pm$ dp da atividade elétrica mitocondrial das linhagens de melanoma B16F10 (A), MEWO (B), IPC-298 (C), SKMEL-28 (D), melanócitos normais (E), fibroblastos normais L929 (F) e fibroblastos normais FN1 (G) entre o grupo controle e os diversos tratamentos. Nota-se em branco a porcentagem relativa de mitocôndrias inativas/células inviáveis em relação as mitocôndrias ativas/células viáveis em preto. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

4.7 QUANTIFICAÇÃO DE MELANINA EM LINHAGENS DE MELANOMA E MELANÓCITOS

A quantificação de melanina foi realizada nas quatro linhagens de melanoma (B16F10, MEWO, IPC-298 e SKMEL-28) e melanócitos normais para realizar a correlação com o efeito da terapia de BNCT e o conteúdo de melanina.

A melanina foi produzida em maior quantidade nas linhagens B16F10 e MEWO, sendo a diferença, estatisticamente significativa em relação às outras linhagens celulares. Todas as linhagens de melanoma apresentaram conteúdo de melanina superior à linhagem de melanócitos (Figura 50).

Figura 50 – Gráfico de barras representando a média $\pm$ dp de melanina (média $\pm$ dp) encontrada nas culturas das linhagens de melanoma B16F10, MEWO, SKMEL-28 e IPC-298 e linhagem de melanócitos normais. Análise estatística de variância de ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

4.8 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

O tratamento das linhagens de melanoma B16F10, MEWO, SKMEL-28 e IPC-298, fibroblastos normais L929 e FN1 e melanócitos normais, foi realizado com a IC₅₀ do composto DM-1, do quimioterápico DTIC e BNCT.

Os resultados foram expressos em gráfico do tipo histograma com porcentagem média de células nas diferentes fases do ciclo celular: sub-G1 (DNA fragmentado), G0/G1 quiescente, fase S de síntese e fase G2/M em divisão.

Na linhagem de melanoma murino B16F10 a população celular encontrada na fase de sub-G1 (DNA fragmentado) foi significativamente maior em todos os protocolos. A radioterapia de BNCT induziu significativa diminuição nas fases S e G2/M, assim como o tratamento com o composto DM-1. O quimioterápico DTIC não apresentou eficácia como as outras modalidades de tratamento além de aumentar a população de células na fase S (Figura 51).

Figura 51 – Histogramas representativos das aquisições em citometria de fluxo da distribuição das fases do ciclo celular das células de melanoma B16F10 do grupo controle (A), DTIC (B), DM-1 (C) e BNCT (D) pelo programa Cell-Quest e analisado pelo programa de análise MOD-Fit.

Na linhagem de melanoma MEWO a população celular encontrada em sub-G1 (DNA fragmentado) também foi significativamente maior e a população encontrada em fase G0/G1 menor em todos os protocolos. Além destes efeitos, a BNCT induziu diminuição nas fases S e G2/M. O quimioterápico DTIC e o composto DM-1 não apresentaram diferenças nas demais fases do ciclo celular (Figura 52).

Figura 52 – Histogramas representativos das aquisições em citometria de fluxo da distribuição das fases do ciclo celular das células de melanoma MEWO do grupo controle (A), DTIC (B), DM-1 (C) e BNCT (D) pelo programa Cell-Quest e analisado pelo programa de análise MOD-Fit.

A linhagem de melanoma IPC-298 apresentou população celular em sub-G1 (DNA fragmentado) significativamente maior e a população em fase G0/G1 menor em todos os protocolos. A fase S não foi alterada na maioria dos protocolos experimentais, porém no tratamento com o composto DM-1 houve discreta diminuição em relação ao grupo controle (Figura 53).

Figura 53 – Histogramas representativos das aquisições em citometria de fluxo da distribuição das fases do ciclo celular das células de melanoma IPC-298 do grupo controle (A), DTIC (B), DM-1 (C) e BNCT (D) pelo programa Cell-Quest e analisado pelo programa de análise MOD-Fit.

O melanoma SKMEL-28 apresentou população celular em sub-G1 (DNA fragmentado) e em fase G2/M significativamente maior e a fase G0/G1 menor em todos os protocolos. Todos os protocolos não modificaram a fase de síntese, exceto o grupo tratado com DM-1 que apresentou moderado aumento (Figura 54).

Figura 54 – Histogramas representativos das aquisições em citometria de fluxo da distribuição das fases do ciclo celular das células de melanoma SKMEL-28 do grupo controle (A), DTIC (B), DM-1 (C) e BNCT (D) pelo programa Cell-Quest e analisado pelo programa de análise MOD-Fit.

Na linhagem de melanócitos humanos normais a população celular encontrada em sub-G1 (DNA fragmentado) não foi modificada significativamente nos grupos tratados, assim como a fase de síntese de DNA (S). Os tratamentos com DTIC e BNCT resultaram em moderado

aumento da fase de proliferação G0/G1, sendo que o quimioterápico DTIC induziu discreto aumento na fase G2/M (Figura 55).

Figura 55 – Histogramas representativos das aquisições em citometria de fluxo da distribuição das fases do ciclo celular dos melanócitos do grupo controle (A), DTIC (B), DM-1 (C) e BNCT (D) pelo programa Cell-Quest e analisado pelo programa de análise MOD-Fit.

Na linhagem de fibroblastos murinos normais L929 tratados com o quimioterápico DTIC houve um aumento na população de células em sub-G1 (DNA fragmentado), enquanto este fato não foi encontrado nos demais protocolos. Além disso, o quimioterápico induziu diminuição nas fases seguintes do ciclo (G0/G1, S e G2/M). O composto DM-1 e a BNCT não alteraram significativamente nenhuma das fases (Figura 56).

Figura 56 – Histogramas representativos das aquisições em citometria de fluxo da distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos L929 do grupo controle (A), DTIC (B), DM-1 (C) e BNCT (D) pelo programa Cell-Quest e analisado pelo programa de análise MOD-Fit.

Os fibroblastos humanos normais FN1 não apresentaram modificações significativas na população em sub-G1 (DNA fragmentado). A fase G0/G1 foi diminuída em todos os protocolos, porém com menor efeito nos tratamentos com o composto DM-1 e a BNCT. Não houve alterações na fase de síntese em todos os protocolos, enquanto que na fase G2/M todos induziram expressivo aumento (Figura 57).

Figura 57 – Histogramas representativos das aquisições em citometria de fluxo da distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos FN1 do grupo controle (A), DTIC (B), DM-1 (C) e BNCT (D) pelo programa Cell-Quest e analisado pelo programa de análise MOD-Fit.

Os dados das proporções das populações celulares em cada fase do ciclo celular de todas as linhagens estudadas estão presentes nas figuras 58, 59, 60 e 61.

Figura 58 – Gráfico de barras das médias $\pm$ dp das células das linhagens de melanoma B16F10 (A), MEWO (B), IPC-298 (C), SKMEL-28 (D), melanócitos normais (E), fibroblastos normais L929 (F) e fibroblastos normais FN1 (G) em fase sub-G1 (DNA fragmentado), comparando-se o grupo controle com os demais grupos de tratamento. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

Figura 59 – Gráfico de barras das médias $\pm$ dp das células das linhagens de melanoma B16F10 (A), MEWO (B), IPC-298 (C), SKMEL-28 (D), melanócitos normais (E), fibroblastos normais L929 (F) e fibroblastos normais FN1 (G) na fase quiescente G0/G1, comparando-se o grupo controle com os demais grupos de tratamento. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

Figura 60 – Gráfico de barras das médias $\pm$ dp das células das linhagens de melanoma B16F10 (A), MEWO (B), IPC-298 (C), SKMEL-28 (D), melanócitos normais (E), fibroblastos normais L929 (F) e fibroblastos normais FN1 (G) na fase de síntese de DNA - S, comparando-se o grupo controle com os demais grupos de tratamento. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

Figura 61 – Gráfico de barras das médias $\pm$ dp das células das linhagens de melanoma B16F10 (A), MEWO (B), IPC-298 (C), SKMEL-28 (D), melanócitos normais (E), fibroblastos normais L929 (F) e fibroblastos normais FN1 (G) na fase G2/M, comparando-se o grupo controle com os demais grupos de tratamento. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

4.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO DAS LINHAGENS DE MELANOMA B16F10 E MELANÓCITOS HUMANOS NORMAIS

Os mecanismos envolvidos nas alterações celulares causadas pelas diversas modalidades de tratamento foram estudados pela expressão de marcadores que controlam a progressão do ciclo celular (p27, p21 e ciclina D1), morte celular (Bcl-2, Bax, Bad, caspase 3 clivada, caspase 8 clivada e citocromo c), proliferação (Ki67), expressão de outros marcadores como TNF-R1, relacionado à inibição do crescimento tumoral, e Hsp-47, proteína de choque térmico envolvida com a síntese de colágeno tipo I.

No tratamento da linhagem de melanoma B16F10 com o quimioterápico DTIC há aumento de p21, com diminuição da expressão dos marcadores p27 e ciclina D1. Os melanócitos normais tratados com este quimioterápico também apresentaram aumento na expressão de p21 e ciclina D1.

O composto DM-1 induziu diminuição da expressão de p27 e ciclina D1 em células de melanoma B16F10. Assim como o quimioterápico DTIC, apresentou aumento da expressão de p21 e ciclina D1 em melanócitos normais, além de não apresentar modificações significativas na expressão de p27.

A BNCT induziu diminuição da expressão de p27 em ambas as linhagens. Apresentou aumento da expressão de p21 e ciclina D1 apenas na linhagem normal, não apresentando modificações significativas na expressão de p21 em células tumorais.

Os histogramas representativos e a quantificação expressa em média $\pm$ dp da expressão de p27, p21 e ciclina D1 das linhagens de melanoma B16F10 e melanócitos normais estão representados nas figuras 62, 63 e 64.

Figura 62 – Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de p27 em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos. Detalhe da aquisição dos gráficos tipo *dot-plot*, adquiridos em citometria de fluxo e analisados pelo programa ModFIT, acima de cada respectivo tratamento. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

Figura 63 – Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de p21 em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos. Detalhe da aquisição dos gráficos tipo *dot-plot*, adquiridos em citometria de fluxo e analisados pelo programa ModFIT, acima de cada respectivo tratamento. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

Figura 64 – Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de ciclina D1 em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos. Detalhe da aquisição dos gráficos tipo *dot-plot*, adquiridos em citometria de fluxo e analisados pelo programa ModFIT, acima de cada respectivo tratamento. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

Todos os protocolos de tratamento induziram diminuição significativa da expressão dos valores da proteína antiapoptótica Bcl-2 na linhagem de melanoma B16F10. O tratamento com o composto DM-1 e o quimioterápico DTIC não apresentaram modificações notórias em melanócitos normais, enquanto houve aumento deste marcador no tratamento com a terapia de BNCT.

A proteína próapoptótica Bax apresentou aumento em todos os protocolos de tratamento nas duas linhagens estudadas, enquanto a proteína próapoptótica Bad só apresentou diminuição na linhagem de melanoma B16F10 tratada com DTIC. Houve aumento desta proteína em melanócitos normais tratados com DTIC e BNCT.

A linhagem de melanoma B16F10 demonstrou aumento da liberação de citocromo c em todos os protocolos de tratamento, com maior elevação na terapia de BNCT (que apresentou aumento discreto em melanócitos normais). Os melanócitos normais tratados com DTIC apresentaram discreta diminuição na liberação de citocromo c, enquanto o composto DM-1 não induziu modificações significativas neste marcador na linhagem normal.

Um dos marcadores da ativação da via extrínseca da apoptose, caspase 8 clivada, apresentou aumento significativo no tratamento com DM-1 e BNCT, além de discreto aumento no tratamento com DTIC. Houve diminuição na expressão deste marcador na linhagem de melanócitos normais tratadas com DM-1 e DTIC, com moderado aumento na terapia de BNCT.

A expressão de caspase 3 clivada é comum as duas vias de ativação da apoptose, e foi significativamente aumentada nos três protocolos de tratamento da linhagem de melanoma B16F10. O composto DM-1 induziu aumento deste marcador também na linhagem de melanócitos normais, enquanto a terapia de BNCT e o quimioterápico DTIC provocaram a diminuição da expressão de caspase 3. Os histogramas representativos e os valores da expressão de Bcl-2, Bax, Bad, caspase 3, caspase-8 e citocromo c das linhagens de melanoma B16F10 e melanócitos normais estão representados nas figuras 65, 66, 67, 68, 69 e 70.

Figura 65 – Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de Bcl-2 em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos. Detalhe da aquisição dos gráficos tipo *dot-plot*, adquiridos em citometria de fluxo e analisados pelo programa ModFIT, acima de cada respectivo tratamento. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

Figura 66 – Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de Bax em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos. Detalhe da aquisição dos gráficos tipo *dot-plot*, adquiridos em citometria de fluxo e analisados pelo programa ModFIT, acima de cada respectivo tratamento. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

Figura 67 – Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de Bad em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos. Detalhe da aquisição dos gráficos tipo *dot-plot*, adquiridos em citometria de fluxo e analisados pelo programa ModFIT, acima de cada respectivo tratamento. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

Figura 68 – Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de caspase 3 clivada em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos. Detalhe da aquisição dos gráficos tipo *dot-plot*, adquiridos em citometria de fluxo e analisados pelo programa ModFIT, acima de cada respectivo tratamento. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

Figura 69 – Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de caspase 8 clivada em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos. Detalhe da aquisição dos gráficos tipo *dot-plot*, adquiridos em citometria de fluxo e analisados pelo programa ModFIT, acima de cada respectivo tratamento. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

Figura 70 – Gráfico do tipo dot-plot e de barras dos valores da expressão de citocromo c em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos. Detalhe da aquisição dos gráficos tipo *dot-plot*, adquiridos em citometria de fluxo e analisados pelo programa ModFIT, acima de cada respectivo tratamento. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** p<0.001; ** p<0.01 e * p<0.05.

Os valores na expressão do marcador de proliferação Ki67 foram diminuídos em todos os protocolos de tratamento na linhagem de melanoma B16F10, com especial atenção ao quimioterápico DTIC que foi o único agente capaz de induzir efeito antiproliferativo significativo em melanócitos normais.

Houve aumento significativo da expressão de TNF-R1 na linhagem de melanoma B16F10 em todos os protocolos de tratamento, sem aumento em melanócitos normais.

O composto DM-1 e a terapia de BNCT induziram aumento da histona relacionada à produção de colágeno do tipo I Hsp-47 em melanócitos normais, enquanto o quimioterápico DTIC diminuiu significativamente este marcador. Entretanto, houve aumento deste marcador no tratamento de melanoma B16F10 com DTIC e DM-1.

Os histogramas representativos e os valores da expressão em média $\pm$ dp da expressão de Ki67, TNF-R1 e Hsp-47 em linhagens de melanoma B16F10 e melanócitos normais estão representados nas figuras 71, 72 e 73.

Figura 71 – Análise comparativa da expressão média±dp de Ki67 em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos. Detalhe da aquisição dos gráficos tipo *dot-plot*, adquiridos em citometria de fluxo e analisados pelo programa ModFIT, acima de cada respectivo tratamento. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

Figura 72 – Análise comparativa da expressão média $\pm$ dp de TNF-R1 em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos. Detalhe da aquisição dos gráficos tipo *dot-plot*, adquiridos em citometria de fluxo e analisados pelo programa ModFIT, acima de cada respectivo tratamento. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

Figura 73 – Análise comparativa da expressão média±dp de Hsp-47 em células de melanoma B16F10 (A) e melanócitos normais (B) entre o grupo Controle e os diversos tratamentos. Detalhe da aquisição dos gráficos tipo *dot-plot*, adquiridos em citometria de fluxo e analisados pelo programa ModFIT, acima de cada respectivo tratamento. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

4.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DAS LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO SKMEL-5 E A375 POR WESTERN BLOT

Os mecanismos envolvidos nas alterações celulares causadas pelos tratamentos com o composto DM-1 foram estudados pela expressão de marcadores antiapoptóticos (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL e a forma inativa de Bid), além dos marcadores próapoptóticos (Bax e Bak) por western blot.

O tratamento da linhagem de melanoma SKMEL-5 com o composto DM-1 induziu moderada diminuição de Bcl-2 durante todos os períodos de incubação, enquanto na linhagem de melanoma A375 houve uma diminuição acentuada apenas após 24 horas de tratamento. O marcador próapoptótico Bax foi aumentado em todos os períodos de tratamento com o composto DM-1 na linhagem de SKMEL-5 e não houve modificação na linhagem A375.

Assim como Bax, a expressão de Bak não sofreu modificações na linhagem A375. A linhagem SKMEL-5 também não apresentou alterações significativas de marcador.

A expressão da proteína Mcl-1 e da forma inativa de Bid apresentaram as mesmas características no tratamento das duas linhagens de melanoma. Na linhagem SKMEL-5 houve diminuição moderada apenas após 24 horas de tratamento, enquanto na linhagem A375 houve diminuição em todos os períodos de tratamento.

Apenas a linhagem de melanoma A375 apresentou diminuição significativa de Bcl-xL após 24 horas de tratamento com o composto DM-1. Os blots estão representados na figura 74 e a densitometria dos blots está representada na figura 75.

Figura 74 – Fotomicrografia da expressão proteica analisada por western blot dos marcadores antiapoptóticos (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL e a forma inativa de Bid) e marcadores próapoptóticos (Bax e Bak) nas linhagens de melanoma SKMEL-5 e A375 após 0, 3, 6 ou 24 horas de tratamento com o composto DM-1.

Figura 75 – Gráfico de barras das médias $\pm$ dp da expressão dos marcadores antiapoptóticos (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL e a forma inativa de Bid) e marcadores próapoptóticos (Bax e Bak) nas linhagens de melanoma SKMEL-5 e A375 após 0, 3, 6 ou 24 horas de tratamento com o composto DM-1. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

A via apoptótica foi analisada por meio da expressão dos marcadores caspase 9, 3 e Parp após tratamento com o composto DM-1.

Ambas as linhagens de melanoma humano SKMEL-5 e A375 apresentaram acentuado aumento na expressão da forma clivada de caspase 9, após 24 horas de tratamento.

A linhagem de melanoma SKMEL-5 apresentou diminuição de prócaspase 3 apenas após 24 horas, enquanto na linhagem de melanoma A375 houve diminuição desde o período de 6 horas de tratamento com o composto DM-1.

Ainda, a forma clivada de Parp foi encontrada em todos os tempos de tratamento com o composto DM-1 na linhagem de melanoma SKMEL-5, enquanto na linhagem de melanoma A375 apenas após 24 horas. Os blots estão representados na figura 76 e a densitometria dos blots está representada na figura 77.

Figura 76 – Fotomicrografia da expressão proteica analisada por western blot dos marcadores de apoptose (caspase 9, caspase 3 e Parp) nas linhagens de melanoma SKMEL-5 e A375 após 0, 3, 6 ou 24 horas de tratamento com o composto DM-1.

Figura 77 – Gráfico de barras das médias $\pm$ dp da expressão dos marcadores de apoptose (caspase 9, caspase 3 e Parp) nas linhagens de melanoma SKMEL-5 e A375 após 0, 3, 6 ou 24 horas de tratamento com o composto DM-1. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER. ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

4.11 ANÁLISE DE INTEGRIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE MELANOMA A375

A condensação e/ou fragmentação nuclear foi avaliada por meio do ensaio de Hoechst 33342 para confirmar a morte por apoptose. As células de melanoma humano A375 foram tratadas com os valores de IC_{50} do quimioterápico DTIC (548 μM) ou do composto DM-1 (65 μM). Ainda, para avaliar o efeito sinérgico de ambas as terapias, as células foram tratadas valores baixos de DTIC (5 μM) e DM-1 (5 μM) por 24 horas.

As células de melanoma A375 do grupo controle apresentaram núcleos intactos e uniformemente corados. O tratamento com o quimioterápico DTIC apresentou raras modificações comparadas ao controle, como alterações morfológicas nucleares do tipo 'bean-shape' (Figuras 78 e 79).

O tratamento das células de melanoma com a IC_{50} do composto DM-1 apresentou modificações significativas, como a formação de corpos apoptóticos e condensação nuclear (Figura 80).

O efeito sinérgico dos tratamentos com o quimioterápico DTIC+DM-1 em baixas concentrações foi extremamente eficaz, com a presença de injúria celular pela formação 'bean-shape' em algumas células, além de condensação nuclear e formação de corpos apoptóticos (Figura 81).

Figura 78 – Fotomicrografia obtida em microscópio de fluorescência das células da linhagem de melanoma humano A375 do grupo controle coradas por Hoechst 33342. Aumento de 400x com *inset* da confluência celular (100x).

Figura 79 – Fotomicrografia obtida em microscópio de fluorescência das células da linhagem de melanoma humano A375 do grupo tratado com o valor de IC_{50} do quimioterápico DTIC (548 μ M) coradas por Hoechst 33342. Aumento de 400x com *inset* da confluência celular (100x).

Figura 80 – Fotomicrografia obtida em microscópio de fluorescência das células da linhagem de melanoma humano A375 do grupo tratado com o valor de IC_{50} do composto DM-1 ($65\mu M$) coradas por Hoechst 33342. Aumento de 400x com *inset* da confluência celular (100x).

Figura 81 – Fotomicrografia obtida em microscópio de fluorescência das células da linhagem de melanoma humano A375 do grupo tratado com o quimioterápico DTIC (5 μ M) e com o composto DM-1 (5 μ M) coradas por Hoechst 33342. Aumento de 400x com *inset* da confluência celular (100x).

4.12 ANÁLISE DO CITOESQUELETO COM ACTINA E VINCULINA

As células de melanoma SKMEL-5 foram tratadas por 90 minutos com os valores de IC_{50} do composto DM-1 (75 μ M) ou com 100 μ M do quimioterápico DTIC. Após o tratamento, as células foram incubadas com actina para a visualização dos filamentos e organização do citoesqueleto e com vinculina para a visualização dos contatos/adesões focais entre a célula e o substrato.

O grupo controle apresentou visível organização do citoesqueleto com alinhamento dos filamentos de actina. Além disso, há uma grande quantidade de contatos focais entre as células e o substrato.

O tratamento com o quimioterápico DTIC apresentou desorganização acentuada no citoesqueleto, com a formação de grânulos ou espículos nos filamentos de actina. Entretanto, não houve diminuição significativa na quantidade de contatos focais entre as células e o substrato.

O composto DM-1 induziu significativa desorganização no citoesqueleto, também com a formação de grânulos ou espículos nos filamentos de actina. A quantidade de contatos focais foi diminuída e os poucos contatos restantes foram localizados apenas nas extremidades citoplasmáticas.

A confluência das células de melanoma SKMEL-5 está representada na figura 82 com o aumento de 20x. A quantidade de contatos focais (representadas pelos pontos vermelhos) está bem representada na figura 83 com o aumento de 40x., assim como organização dos filamentos de actina está bem representada na figura 84 com o aumento de 100x.

A avaliação estatística da quantidade de contatos focais por célula está representada na figura 85.

Figura 82 – Fotomicrografia da morfologia do citoesqueleto das células de melanoma SKMEL-5 do grupo controle e com o quimioterápico DTIC ou com o composto DM-1 após 90 minutos de tratamento (aumento de 20x). A marcação em verde corresponde à actina, a vermelha corresponde à vinculina e a última coluna representa *merge* ou a mescla das duas imuno-marcações.

Figura 83 – Fotomicrografia da morfologia do citoesqueleto das células de melanoma SKMEL-5 do grupo controle e com o quimioterápico DTIC ou com o composto DM-1 após 90 minutos de tratamento (aumento de 40x). A marcação em verde corresponde à actina, a vermelha corresponde à vinculina e a última coluna representa *merge* ou a mescla das duas imuno-marcações.

Figura 84 – Fotomicrografia da morfologia do citoesqueleto das células de melanoma SKMEL-5 do grupo controle e com o quimioterápico DTIC ou com o composto DM-1 após 90 minutos de tratamento (aumento de 100x). A marcação em verde corresponde à actina, a vermelha corresponde à vinculina e a última coluna representa *merge* ou a mescla das duas imuno-marcações.

Figura 85 – Gráfico de barras da média $\pm$ dp dos contatos focais em células de melanoma humano SKMEL-5 do grupo controle, com o quimioterápico DTIC ou com o composto DM-1 após 90 minutos de tratamento. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER.

ns – não significativo.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

4.13 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DE MELANOMA SKMEL-5 POR MICROSCOPIA ÓPTICA

As células de melanoma SKMEL-5 foram fotodocumentadas no mesmo campo no tempo 0 e após 90 minutos de tratamento no grupo controle, com o quimioterápico DTIC ou com o composto DM-1. As imagens foram utilizadas para a visualização da diminuição ou retração completa dos filopódios e lamelipódios do citoesqueleto devido à injúria provocada pela toxicidade dos tratamentos.

Os grupos tratados com DTIC ou com DM-1 apresentaram diminuições expressivas, além de apresentar algumas células com retração total dos filopódios e lamelipódios. O grupo controle não apresentou alterações significativas na morfologia celular (figura 86).

Figura 86 – Fotomicrografias obtidas em microscópio de contraste de fases para análise da retração dos filopódios do citoesqueleto das células de melanoma humano SKMEL-5 do grupo controle, com o quimioterápico DTIC ou com o composto DM-1 após 0 e 90 minutos de tratamento. As setas vermelhas indicam os filopódios que sofreram diminuição ou retração completa após 90 minutos de tratamento (aumento de 20x).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo comparou o tratamento do melanoma com o agente quimioterápico DTIC em relação às novas modalidades terapêuticas, como o uso do fenolato sintético análogo da curcumina, DM-1, e a terapia de captura de nêutrons pelo Boro, BNCT. O composto DM-1 e a BNCT induziram morte celular seletiva para o melanoma, com poucos efeitos em células normais.

Segundo a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (World Cancer Report), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo. Neste cenário, torna-se fundamental que os recursos e esforços sejam direcionados no sentido de orientar as estratégias de prevenção, controle de câncer e no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas alvo específicas. Os dados desestimulantes dos agentes citotóxicos utilizados em quimioterapia descritos na literatura favorecem a pesquisa com novas modalidades terapêuticas.

A incidência de melanoma estimada em 2012 aumentará 27% de acordo com Siegel e colaboradores (2012) e no Brasil, está estimada em mais de 6000 novos casos (INCA, 2012).

A imunoterapia é uma das possibilidades terapêuticas adjuvante para o tratamento do melanoma. Alguns trabalhos relacionados com o tratamento das linhagens celulares de melanoma, como B16F10, MEWO e SKMEL-28 com imunoterapia (Yoshimoto et al., 2008) relatam a indução de citotoxicidade dose-dependente. Entretanto, os resultados obtidos são pouco significantes em relação ao tratamento com o composto DM-1 e a BNCT.

Outros compostos foram utilizados para o tratamento de células de melanoma, com significativo potencial citotóxico como o Antrax, porém com elevada toxicidade para linhagens celulares normais (Abi-Habib et al., 2005).

Neste trabalho, a citotoxicidade dos diversos protocolos experimentais foi avaliada pelo método do MTT, para determinar o número de células metabolicamente ativas.

Como controle normal, foram utilizadas linhagens de células endoteliais, fibroblastos e culturas primárias de melanócitos. Apesar de não ser a melhor maneira de análise comparativa com as células de melanoma, a utilização de fibroblastos normais como controle positivo é extensamente empregada (Carey et al., 1976). Entretanto, culturas primárias são fundamentais para a obtenção de informações sobre os efeitos de compostos quimioterápicos que alteram a cinética de proliferação celular.

A linhagem de melanoma humano MEWO foi estabelecida da cultura de metástase de linfonodo de um paciente com melanoma maligno (Luca et al., 1997). O tratamento desta linhagem com o quimioterápico DTIC ($IC_{50}=437 \mu\text{g/mL}$) resultou em dados similares aos encontrados na literatura, após o mesmo período de tratamento ($IC_{50}=380 \mu\text{g/mL}$) (Lev et al., 2004).

O tratamento de outra linhagem de melanoma humano HTB140, com o quimioterápico DTIC por 24 horas indicou citotoxicidade a partir de 2mM (Ristic-Fira et al., 2008), corroborando com os valores de IC_{50} encontrados neste trabalho ($IC_{50}=3221 \mu\text{M} \sim 3,2\text{mM}$).

Diversos estudos demonstraram o potencial antitumoral da curcumina e análogos em células de melanoma (Marin et al., 2007; Shishodia et al., 2007). Além disso, Baskota et al. (2002) estudaram compostos derivados da própolis no tratamento de células da linhagem de melanoma B16 e encontraram valores de IC_{50} maiores que 200 μM .

Yáñez et al. (2004) demonstraram que a utilização de 13 compostos fenólicos em ensaios de citotoxicidade em linhagens melanoma (B16F10 e SKMEL) não induziram efeitos inibitórios significantes com baixas concentrações dos mesmos. Em ensaios proliferativos do mesmo trabalho, não foram encontrados fenóis com efeitos antiproliferativos em células de melanoma da linhagem SKMEL, além de demonstrar que a linhagem B16F10 é mais sensível ao tratamento com compostos fenólicos. A baixa resistência de algumas linhagens celulares e a grande resistência da linhagem SKMEL pode ser devida às características específicas de cada linhagem, assim como a forma de resposta, o sítio primário da localização do

tumor, a ocorrência de metástases e o perfil genético de mutações em genes resistentes à múltiplas drogas (Yáñez et al., 2004).

No tratamento *in vitro* da linhagem tumoral de gliosarcoma, a BPA obteve um valor de IC₅₀ inferior comparada às linhagens de melanoma, sugerindo que a maior parte da captura deste composto deve-se à expressão do transportador de aminoácidos e em menor parte pela síntese de melanina (Takagaki et al., 2001). Por meio do transportador de aminoácidos LAT a BPA é captada pelas células tumorais com base na maior necessidade de síntese de proteínas em células tumorais. Além disso, a BPA é análoga da tirosina que por sua vez é um dos constituintes da melanina (Wittig et al., 2000).

No estudo de citotoxicidade de células de melanoma humano SKMEL tratadas com polifenóis de uva (Larrosa et al., 2003) foi necessária elevada concentração do composto fenólico em comparação às concentrações utilizadas neste trabalho com o composto DM-1 para indução de efeito antiproliferativo mediano: redução de 40% da viabilidade utilizando-se 200 µM do polifenol da uva em comparação à redução de 50% da viabilidade da linhagem celular com 83 µM do composto DM-1.

O tratamento com o DM-1 apresentou citotoxicidade extremamente significativa em todas as linhagens de melanoma, com quantidades efetivamente menores em relação a todos os trabalhos aqui citados, sem apresentar efeito inibitório sobre fibroblastos, células endoteliais e melanócitos normais. Em melanócitos, utiliza-se maior quantidade de massa do composto DM-1 em relação ao equivalente molar, quando comparado ao quimioterápico DTIC para a obtenção da IC₅₀. Este fato deve-se ao peso molecular da DTIC que é 1,9x menor do que o composto DM-1 (DM-1: 348 g/mol; DTIC: 182,18 g/mol). A BNCT também foi eficaz no tratamento deste tipo de célula tumoral, sendo necessárias baixas quantidades de ¹⁰B para induzir a morte celular em IC₅₀ (Faião-Flores et al., 2011a; Faião-Flores et al., 2011b). Em células normais seria necessário quantidades superiores à 2700 µg/mL de ¹⁰Boro para determinar os mesmos efeitos. Ambas as terapias foram superiores ao uso do quimioterápico DTIC, apresentando

elevados potenciais citotóxicos nas células de melanoma e induzindo menores efeitos tóxicos em células normais.

É de considerável interesse o desenvolvimento de substâncias químicas, principalmente análogos de compostos naturais, que possam proteger as células normais de espécies reativas de oxigênio (EROs) e induzir sua produção em células tumorais (Surh; Ferguson, 2003). Os radicais livres então, podem ser definidos como qualquer espécie química com existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, sendo assim, altamente reativos. A formação destes compostos é determinada pela perda ou ganho de um elétron (Marroni N; Marroni C, 2002).

O oxigênio pode resultar em danos reversíveis ou até irreversíveis quando os seres vivos são expostos a ele em concentrações superiores a encontrada na atmosfera e quando eles sofrem modificações, podendo inclusive levar a morte celular (Manson, 2003). A mensuração direta da oxidação nos componentes celulares é complexa devido a sua alta reatividade, porém é possível realizar determinações indiretas pelos efeitos por ele causados, por meio da oxidação dos lipídios ou das bases púricas e pirimídicas, o que acarreta em alterações e quebras no DNA (Basu et al., 1999).

O teste de TBARs quantifica o malondialdeído, um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo. A reação destas espécies com os ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas iniciam um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO). A LPO pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (Benzie, 1996). A LPO pode ser indicada com um dos eventos citotóxicos primários que desencadeia seqüência de lesões na célula.

Woiniak et al. (2005) relatam a elevação na produção de TBARs em células de melanoma B16 tratadas com o quimioterápico DTIC. Ainda, Lazze et al. (2009) comprovam a capacidade de compostos fenólicos em induzir aumento na peroxidação lipídica em células de adenocarcinoma de cólon. Há também a comprovação da capacidade da radiação ionizante em produzir alterações significativas na atividade oxidante em diferentes tecidos (Hui et al., 1996).

A curcumina é conhecida por suas propriedades antioxidantes e atua como um inibidor da formação de radicais livres, inibindo a peroxidação lipídica e danos oxidativos do DNA. Entretanto, diversos estudos *in vitro* sugerem que a indução de apoptose está associada com a produção de ROS e/ou estresse oxidativo em células tumorais (Reuter et al., 2008). Nos últimos anos, alguns alvos da curcumina foram descobertos correlacionando a morte celular com a via intrínseca da apoptose e produção de ROS (Su et al., 2006; Tan et al., 2006).

A indução de peroxidação dos ácidos graxos da membrana nas linhagens de melanomas murino e humano foi extremamente significativa no tratamento com o composto DM-1, sendo a linhagem murina B16F10 a mais sensível a este tipo de tratamento. Com a terapia de BNCT obtivemos resultados similares e em ambas as modalidades terapêuticas não houve aumento significativo na peroxidação lipídica das células endoteliais, melanócitos e fibroblastos normais.

O quimioterápico DTIC ocasionou danos oxidativos nas linhagens tumorais, porém com elevada produção de substâncias reativas nas células normais, ocasionando destruição da membrana citoplasmática, danos metabólicos e morte celular. Ainda, a DTIC induziu, na maior concentração, aumento de 52x na quantidade de radicais livres peroxidados formados a partir da membrana de células endoteliais normais. Alguns trabalhos demonstram que o tratamento com temozolomida (análogo estrutural da DTIC) a partir da concentração de 2,5 μ M induz diminuição na taxa de crescimento e proliferação em células endoteliais. A mesma concentração praticamente não induz diferenças significativas no crescimento do

melanoma (Lam et al., 2007). Ainda, este trabalho indica que a temozolomida possui IC₅₀ de 6,6 µM para a linhagem HUVEC após tratamento por 96 horas, confirmando o potencial tóxico da DTIC frente a algumas células normais. Neste trabalho também foram corroborados os resultados encontrados por nosso grupo em que há maior sensibilidade em células endoteliais comparadas aos fibroblastos no tratamento com este agente análogo a DTIC. Ambas as linhagens testadas nas mesmas concentrações mostraram inibição na taxa proliferativa a partir de 2,5 µM em células endoteliais e 100 µM em fibroblastos normais.

O tratamento das linhagens normais HUVEC e melanócitos humanos com o composto DM-1 e a BNCT não mostraram aumento significativo na quantidade de danos à membrana celular até mesmo nas maiores concentrações.

O aspecto morfológico das linhagens celulares tratadas com as diferentes modalidades terapêuticas evidenciou a formação de debris, corpos apoptóticos, cariomegalia, condensação da cromatina e vacuolização do citoplasma das células tumorais. As linhagens de células endoteliais e melanócitos normais apresentaram formação de debris, cariomegalia e vacuolização do citoplasma no tratamento com DTIC.

Entretanto, estes efeitos não foram observados nas linhagens de fibroblastos, células endoteliais e melanócitos tratadas com o composto DM-1 e a terapia de BNCT, confirmando o potencial citoprotetor em células normais.

A MEC é uma rede complexa composta por quatro grandes classes de macromoléculas: colágenos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas adesivas. As interações entre as células e a MEC são cruciais para determinar os padrões de comportamento celular, tais como crescimento, morte, diferenciação e motilidade (Wunrau et al., 2009). A sobrevivência de células aderentes é dependente da contínua ligação das integrinas com a MEC (Meredith et al., 1993; Ruoslahti, Reed, 1994).

O descolamento das células aderentes da MEC induz apoptose quase imediatamente, sendo designado como “Anoikis” ou “perda do lar”

(Grossman et al., 2001; Frisch, Francis, 1994). Anoikis possui extrema relevância no desenvolvimento fisiológico dos tecidos (Frisch, Screaton, 2001; Danial, Korsmeyer, 2004). Sem este fenômeno, células tumorais que se despreendem da MEC poderiam migrar à outros sítios, continuar o crescimento e contribuir para a formação de metástases (Frisch, Screaton, 2001; Lance, Kohn, 2004; Douma et al., 2004). A apoptose decorrente de células desconectadas da MEC proporciona um controle rigoroso do número adequado de células para a organização dos tecidos. Deste modo, a anoikis é uma forma de apoptose pertinente a homeostase dos tecidos normais (Frisch, Screaton, 2001).

A maioria das técnicas de quantificação da apoptose é eficaz para a análise de células em suspensão, mas não tão adequada para células aderentes por causa da ocorrência de anoikis (van England et al., 1996). A metodologia da ligação de anexina V é usada extensivamente para analisar apoptose (Vermes et al., 1995). Esta técnica baseia-se na alta afinidade cálcio-dependente da anexina V à fosfatidilserina. Células em condições viáveis mantêm a assimetria fosfolipídica dos dois folhetos da membrana plasmática com a fosfatidilserina, localizada principalmente no interior da célula. Durante a apoptose a fosfatidilserina é translocada para o folheto externo da membrana plasmática, podendo então ser reconhecido pela anexina V. Sendo marcada com fluorescência, a anexina V é utilizada para analisar a apoptose por meio da citometria de fluxo (Vermes et al., 2000). Desta forma, as células que estão em processo de apoptose ou anoikis acabam não tendo uma perfeita distinção com a metodologia de anexina V por citometria de fluxo (Micoud et al., 2001).

Todos os protocolos de tratamento induziram redução na quantidade de células de melanoma viáveis. Nas linhagens de melanoma B16F10, MEWO e SKMEL-28 encontramos aumento de células em processo de necrose nos tratamentos com DTIC e BNCT, enquanto o composto DM-1 induziu apoptose tardia após 6 horas de tratamento. Na linhagem MEWO tratadas com DTIC houve um discreto aumento na população de células que sofreram apoptose. Na linhagem SKMEL-28 tratada com DM-1 foi

evidenciado aproximadamente 70% da população celular em processo de apoptose.

Oliveira et al., (2010) relataram que no tratamento *in vivo* de camundongos portadores de melanoma B16F10 com DTIC há ausência de apoptose mediada pela clivagem de caspase-3. Estes achados corroboram com os resultados *in vitro* encontrados pelo nosso grupo, onde há diminuição de células em apoptose e aumento de necrose em células B16F10 tratadas com este quimioterápico.

Os tratamentos na linhagem de melanoma IPC-298 confirmaram o potencial do composto DM-1 em induzir apoptose e revelaram vias diferentes de morte para o tratamento com o quimioterápico DTIC e a terapia de BNCT, pois ambos também demonstraram aumento na quantidade de células em apoptose. Todos os protocolos de tratamento não induziram modificações significativas de melanócitos humanos normais viáveis e em processo necrose e apoptose.

Estudos genéticos e bioquímicos sugerem que as células de melanoma tornam-se “à prova de bala” contra uma grande variedade de medicamentos quimioterápicos, explorando sua resistência intrínseca a apoptose, durante a progressão do melanoma. A resistência pode estar associada à hiperativação dos mecanismos de reparação do DNA por meio do aumento na expressão de genes de reparo ou pela potencialização de enzimas que removem os danos da alquilação do DNA. (Soengas; Lowe, 2003)

Desde o surgimento do emprego da quimioterapia para o câncer na década de 40, foram identificados muitos de caminhos pelos quais as células tumorais “escapam” do agente químico. No momento em que as células desenvolvem resistência a uma droga, elas podem também desenvolver resistência cruzada a outras drogas, química e mecanicamente não relacionadas, em um fenômeno conhecido como resistência a múltiplas drogas (MDR) (Nygren; Larsson, 2003).

A MEC oferece suporte físico, ancoragem das células e um meio para difusão de moléculas sinalizadoras, incluindo as enzimas que regulam a síntese e degradação da própria matriz (Yarnold; Brotons, 2010).

A produção de colágeno em cultura celular pode ser estimulada (Jalkanen; Penttinen, 1982), diminuída (Whiteside et al., 1984; Jimenez et al., 1979; Aalto et al., 1976), ou pode não sofrer modificações (Aalto et al., 1976) por alguns fatores presentes no meio, nas células ou na interação entre a célula e a matriz.

A técnica de coloração citoquímica de Picrosirius-Sirius Red avalia as variações referente a quantidade e características do colágeno (Koren et al., 2001). Este corante é aniônico e específico para reagir com os agrupamentos básicos na molécula de colágeno (Junqueira et al., 1979; Pickring, Boughner, 1991). Fibras coradas mostram um espectro de cores quando vistas com luz polarizada, dependendo do tamanho das fibras (Junqueira et al., 1982), da densidade e da quantidade do colágeno (Dayan et al., 1989).

Em análises em microscopia de luz polarizada, o colágeno apresenta-se com coloração vermelho brilhante até um amarelo pálido. Os núcleos encontram-se pretos, mas muitas vezes podem ser cinza ou marrom. Quando examinado por luz polarizada, como realizada neste trabalho, o colágeno apresenta-se como fibras maiores amarelas, vermelhas ou laranja. A birrefringência é altamente específica para colágeno (Junqueira et al., 1979).

A produção de colágeno nas culturas celulares de melanoma murino B16F10 e humano SKMEL-28 tratadas com o quimioterápico DTIC foi significativamente diminuída. A terapia de BNCT, assim como o composto DM-1 também contribuíram significativamente para a diminuição da síntese de colágeno, sendo este último extremamente eficaz na diminuição do colágeno no melanoma humano.

Alguns estudos demonstram redução significativa na quantidade de colágeno em amostras *in vivo* de leiomiomatose, neoplasia benigna da musculatura uterina. Barduki e colaboradores demonstram que o leiomioma se desenvolve não apenas pela hiperplasia e hipertrofia de células miométriais, mas também pelo aumento da matriz extracelular. Neste trabalho há a indicação de que a redução do colágeno evidencia a eficiência

do tratamento proposto em reduzir a massa tumoral, ou seja, em amostras *in vitro*, essa diminuição de colágeno leva a uma diminuição efetiva da capacidade de troca de metabólitos por meio da matriz extracelular (Bonduki et al., 2009).

Entre as terapias, o quimioterápico DTIC foi o único com o potencial extremamente significativo em diminuir a síntese de colágeno em fibroblastos normais, indicando mais uma vez seu efeito citotóxico em tecidos saudáveis.

A BNCT não induziu alterações significativas na síntese de colágeno solúvel da linhagem de melanócitos normais, enquanto o tratamento com o composto DM-1 e o quimioterápico DTIC apresentaram discreto aumento na síntese de colágeno tipo I e III. A proporção de colágeno presente na MEC não apresentou modificações em nenhuma das modalidades de tratamento.

Confirmando estes resultados, a análise da proporção de colágeno na MEC na placa de cultura celular indicou modificações severas nas linhagens de melanoma e fibroblastos normais tratadas com DTIC.

Proteínas de choque térmico (HSPs) são expressas em todos os organismos. Hsp 47 é expressa constitutivamente nas células que sintetizam colágeno e está envolvida na biossíntese do colágeno tipo I. A Hsp reside no retículo endoplasmático e é essencial para a secreção de pró-colágeno. Depois da injúria, ela age como uma molécula de resposta ao estresse para seqüestrar pró-colágeno anormal (Keagle et al., 2001).

O quimioterápico DTIC e o composto DM-1 induziram aumento de Hsp 47 em células de melanoma B16F10. Este aumento deve estar relacionado à uma resposta à injúria causada por estes tipos de tratamento, pois não houve aumento na síntese de colágeno e da proporção de matriz extracelular nesta linhagem tumoral, analisados pela metodologia de Picrosirius.

As três modalidades terapêuticas (DTIC, DM-1 e BNCT) podem induzir a produção de radicais livres em tecidos normais e tumorais em conjunto com as alterações da MEC. Estes estímulos podem gerar danos oxidativos nas membranas lipídicas, no DNA ou em proteínas. Além disso, há a

possível perda de resposta da via de sinalização dependente de TGF- β com consequente diminuição da síntese de colágeno, além de desorganização e destruição das fibras de colágenos existentes com a ativação e síntese de metaloproteases que degradam a MEC (Zouboulis; Makrantonaki, 2011).

A mitocôndria é responsável pelo metabolismo oxidativo e, desta forma, os estudos dos efeitos de vários compostos sobre essa organela têm auxiliado na compreensão de seus mecanismos de ação, assim como estabelecer o potencial citotóxico (Guo et al., 1991; Wallace, Starkov, 2000).

Lenaz (1998) demonstrou que as mitocôndrias são susceptíveis a danos induzidos por peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e mutações no DNA mitocondrial. O principal efeito do estresse oxidativo causado por ROS na função mitocondrial é a ativação da transição da permeabilidade mitocondrial, 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 resultam na resposta apoptótica (Hengartner, 2000).

O efeito de diferentes compostos sobre as vias mitocondriais pode justificar alterações celulares e de citotoxicidade de células sem injúrias. Portanto, o monitoramento da bioenergética mitocondrial, dentre outros parâmetros, é importante para o estabelecimento dos mecanismos pelos quais um composto pode causar a morte celular (Wallace; Starkov, 2000).

O gradiente eletrônico entre o espaço das membranas mitocondriais durante a respiração normal é chamado de potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (Chen et al., 2001). O $\Delta\psi$ mitocondrial é reduzido quando o metabolismo energético é rompido, notoriamente, durante o processo de apoptose (Fuller; Arriaga, 2003).

A rodamina 123 é um fluorocromo lipofílico catiônico que se acumula especificamente em mitocôndrias de células viáveis (Johnson et al., 1980; Chen et al., 1982; Darzynkiewicz et al., 1982). A captação de rodamina 123 pelas mitocôndrias depende do elevado potencial elétrico mitocondrial e transmembrânico (Davis et al., 1985; Martinez et al., 1987). O fluorocromo liga-se à membrana interna e externa das mitocôndrias e emite fluorescência

vermelha proporcional a quantidade absoluta de rodamina 123 durante a despolarização da membrana (Scaduto et al., 1999). Assim, a redução na intensidade de fluorescência está relacionada com a despolarização, ou seja, a perda do potencial da membrana mitocondrial interna (Saris et al., 2004; Lecoeur et al., 2004).

Células com potencial mitocondrial transmembrânico inalterado captam a rodamina e emitem fluorescência quando atingidas pelo laser emitido pelo citômetro. Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina de dentro da mitocôndria, gerando eventos que emitem menor intensidade de fluorescência. Assim, a diminuição da intensidade da fluorescência reflete o colapso do $\Delta\psi_m$, o qual define um estágio inicial e irreversível da apoptose (Kroemer et al., 1998).

O ensaio da captação de rodamina 123 por citometria de fluxo avaliou o potencial elétrico da membrana mitocondrial das linhagens celulares de melanoma, melanócitos e fibroblastos normais tratadas com o quimioterápico DTIC, o composto DM-1 e a BNCT. A DTIC diminuiu consideravelmente o potencial da membrana mitocondrial de todas as linhagens tumorais e normais, em menor proporção na linhagem de melanócitos e danos extremamente significativos na linhagem de fibroblastos murinos L929. Entretanto, o tratamento com o composto DM-1 e a BNCT diminuíram significativamente o potencial mitocondrial das linhagens de melanoma, indicando severos danos desta organela com conseqüente morte da célula. Não foram observadas injúrias nas células normais com estes dois tratamentos.

A cinética da progressão do ciclo celular e de morte depende do tipo celular (Wolbers et al., 2004; Engbers-Buijtenhuijs et al., 2005). Portanto é necessário estudar esses detalhes dos mecanismos de morte celular em células diferentes, como o estudo proposto neste trabalho com linhagens de células tumorais e normais.

A ação citotóxica da BNCT está relacionada diretamente à captação de BPA. Morita et al., (2006) relataram que no melanoma, o acúmulo de BPA é proporcional à atividade de produção de melanina da célula (Morita et al.,

2006). Assim, o acúmulo de BPA e atividade de produção de melanina das células tumorais são correlacionados, pois a BPA é um análogo da tirosina, um precursor da melanina (Coderre et al., 1990; Hiratsuka et al., 2000). A conversão da L-tirosina à melanina é mediada pela atividade enzimática das proteínas da família das tirosinases (Hearing, 1991).

Os melanoblastos são células precursoras dos melanócitos, que são células diferenciadas que contêm uma organela especializada para síntese, transporte e armazenamento de melanina, denominada melanossoma. No início da vida embrionária, essas células migram para outras posições do corpo, principalmente a pele, onde irão produzir melanina. Esse pigmento pode penetrar em células de outros tecidos como derme, epiderme, coróide, retina, processos ciliares e meninges que são adjacentes aos melanoblastos e por este motivo, podemos encontrar os tumores relacionados à melanina na pele ou em várias localizações (Pulley et al., 1990).

Ito et al. (2003) comprovam que os melanomas possuem uma maior quantidade de melanina do que os melanócitos de pele normal. A quantidade de melanina das células de melanoma podem ser até 10 vezes maiores que melanócitos normais. Sendo assim, haveria maior captação de BPA pelas células tumorais. (Morishima, Fukuda, 1985; del Marmol et al., 1993).

Para avaliar um dos possíveis processos pelo qual o composto BPA é captado pelas células tumorais, a melanina presente no meio intracelular de cada linhagem de melanoma foi quantificada. Os dados da quantidade de células em sub-G1 (DNA fragmentado) são proporcionais à quantidade de melanina da linhagem, pois encontrou-se 7,27; 1,92; 1,85 e 1,84 vezes mais DNA fragmentado, em relação ao controle de cada linhagem, nas células de melanoma B16F10, MEWO, IPC-298 e SKMEL-28, respectivamente, confirmando que a linhagem que mais sofreu danos celulares foi a que possuía a maior quantidade de melanina.

Brown e colaboradores (1989) relataram elevado índice de morte celular no tratamento com a terapia de BNCT nas linhagens de melanoma humano melanóticos comparados aos amelanóticos. Porém a BPA também

se acumula em melanomas que não possuem quantidade significativa de melanina (Fukuda et al., 1987). Isto implica na hipótese de que a captação de BPA também é dependente do transporte de aminoácidos e não somente da síntese de melanina (Coderre et al., 1988). As metástases de melanomas humanos variam demasiadamente na pigmentação (Watts et al., 1981), sendo assim, BPA pode se acumular em locais metastáticos pigmentados e não pigmentados, aumentando as chances de sucesso do BNCT no tratamento desta neoplasia (Coderre et al., 1988).

Para a realização de ensaios *in vivo* com a BNCT é extremamente necessário o estudo de biodistribuição de BPA em órgãos normais e no tumor em animais portadores de melanoma (Faião-Flores et al., 2012b). Aliados aos estudos *in vitro* aqui apresentados é possível desenvolver estudos *in vivo* mais aprimorados, com a compreensão da concentração e de quanto tempo após a administração a BPA estará localizada no tumor, além de entender com mais clareza, os efeitos antiproliferativos e citotóxicos da BNCT. Estes dados de biodistribuição de BPA em camundongos portadores de melanoma B16F10 confirmam a predileção da BPA pelo tumor em relação aos demais órgãos.

De acordo com a quantidade e a qualidade do DNA celular, a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular foi avaliada. A primeira fase é conhecida como G1 (gap 1), em que a célula passa por modificações para se preparar para entrar na fase S, na qual o DNA é sintetizado. Na fase S ocorre gradativamente a cópia do material genético. A seguir, na fase G2 (gap 2), a célula se prepara para entrar na fase M (mitose). Nessa fase o DNA replicado é organizado para a divisão entre as células-filhas. Após a divisão completa das células, cada uma entra na fase G0, ou então células proliferativas entram em G1 para a preparação para uma próxima replicação. Ainda, as células podem ser encontradas em fase sub-G1 (DNA fragmentado) (Otake, 2005).

A avaliação da distribuição das fases das células ao longo ciclo foi realizada pela incorporação de iodeto de propídio, um fluorocromo que se

intercala estequiometricamente a cada 4 pares de bases do DNA (Otake, 2005).

A apoptose pode iniciar-se no terço final da fase G1 para impedir que uma célula que possua danos ingresse na fase de síntese, de maneira que as mutações não se reproduzam durante a replicação do DNA; e na fase G2 para impedir que as células que não tenham chegado à maturidade entrem em mitose (Danial; Korsmeyer, 2004). Entretanto, as células tumorais enganam os pontos de checagem e prosseguem para a fase de mitose, tornando o estudo da regulação do ciclo celular dos tumores uma maneira de impedir esta proliferação demasiada.

Agentes alquilantes possuem grande afinidade pelo DNA e proteínas, a que os adicionam seus radicais altamente reativos. Assim, produzem enlaces entre as cadeias de DNA, impedindo sua replicação e transcrição do RNA. Sua ação ocorre em todas as fases do ciclo celular (Urano, Ling, 2002; Sedletska et al., 2005). Mhaidat e colaboradores (2007) indicam a maior indução de senescência e menor proporção de células de melanoma em apoptose pelo tratamento com a temozolomida, análogo estrutural e funcional da DTIC (Mhaidat et al., 2007). Além disso, no tratamento de células das linhagens de melanoma HTB140 (Ristic-Fira et al., 2009) e SKMEL (Chen et al., 2009) com DTIC não há mudanças significativas nas fases do ciclo celular.

Fenóis podem inibir o ciclo celular e induzir apoptose em linhagens de células tumorais, devido à desestruturação nos pontos de checagem G1/S e G2/M (Williams et al., 2004). Alguns artigos relatam o potencial dos fenóis em afetar a sinalização e a progressão do ciclo celular (Reddy et al., 2003; le Marchand, 2002).

Chen et al. (2007) demonstraram a indução de apoptose e ativação de caspase 3 após o tratamento de células de melanoma com polifenóis derivados da própolis em concentrações e tempo de incubação semelhantes ao tratamento com o composto DM-1, porém com população de células em sub-G1 (DNA fragmentado) em menor proporção (26% no tratamento com os polifenóis e média de 47% no tratamento com o composto DM-1). Ainda,

no mesmo trabalho há relatos de efeitos pró-oxidantes em culturas celulares tumorais.

O quimioterápico DTIC induziu diminuição da proporção de células em G0/G1 e aumento na proporção de células em fase sub-G1 (DNA fragmentado). Porém, não apresentou especificidade para as outras fases do ciclo, além de induzir parada e morte celular em fibroblastos normais. Em contrapartida, a terapia de BNCT induziu diminuição da população celular em G0/G1, S e G2/M, aumentando consideravelmente a proporção de células em fase sub-G1 (DNA fragmentado) nas células tumorais.

O composto DM-1 induziu aumento significativo de morte celular, diminuindo a população de células em G0/G1 e fase S, sem alterar a proporção de células na fase G2/M. Ambas as terapias, DM-1 e BNCT não causaram efeitos citotóxicos ou quiescência em células normais, além de induzir um pequeno aumento da população de fibroblastos normais na fase G2/M.

Todas as modalidades de tratamento não modificaram a quantidade de células em fase sub-G1 (DNA fragmentado) dos melanócitos humanos normais. A fase G0/G1 apresentou aumento moderado no tratamento com DTIC, podendo indicar parada na proliferação ou quiescência desta linhagem normal.

A desregulação do ciclo celular em conjunto com outras aberrações das vias de sinalizações possui um importante papel na resistência terapêutica das células tumorais (Bhatt et al., 2007; Smalley et al., 2008a; Smalley et al., 2008b).

As ciclinas dependentes de quinases (CDKs) são as reguladoras positivas do ciclo celular, por meio da interação das quinases com suas respectivas ciclinas que permitem a progressão do ciclo. CDK4/6 seguido por CDK2 facilita a progressão do ciclo celular da fase G1 à fase S por suas interações com a ciclina D e ciclina E, respectivamente (Schwartz; Shah, 2005).

As ciclinas do tipo D (D1, D2, D3 e D4) e ciclina E intervém regulando o ponto de controle G1/S. Ambas são sintetizadas durante a fase G1 e o

balanço entre a síntese e degradação faz com que apareçam na célula no final da fase G1 e desapareçam durante a fase S ou ao final desta (Zarzov et al., 2002). A ciclina D1 é expressa, em níveis elevados, no meio e fim da fase G1 do ciclo celular. A ciclina D1 não é apenas um promotor de crescimento da célula tumoral, mas também atua como fator de sobrevivência para estas células. A baixa regulação de ciclina D1 pode resultar em morte celular por apoptose (Baker et al., 2005; Sauter et al., 2002).

As condições experimentais de tratamento induziram diminuição expressiva nos valores de ciclina D1 em todos os protocolos terapêuticos na linhagem de melanoma B16F10 e moderado aumento em melanócitos normais. Com essa diminuição nas células de melanoma, há consequente parada do ciclo celular destas linhagens tumorais que possuem característica extremamente proliferativa.

No melanoma, a progressão do ciclo celular e seus mecanismos de controle são regulados por uma série de moléculas regulatórias essenciais (Quatresooz et al., 2009). Da mesma forma que muitos outros tumores malignos, as células de melanoma proliferam-se através da desregulação dos mecanismos de controle de crescimento e escapam da morte celular programada (Malumbres; Barbacid, 2001). Cada etapa do ciclo celular de proliferação é normalmente controlada pela expressão de um conjunto preciso de proteínas. As ciclinas ligam-se e ativam ciclinas dependentes de quinases conduzindo-as para as diversas fases do ciclo celular. As diversas ciclinas C, D1, D2, D3 e E, bem como CDK2, p16INK4a, p21CIP1 e p27KIP1 que conduzem a progressão do ciclo celular de G1 para fase S. A ciclina A normalmente regula a passagem da fase S para G2, e a ciclina B da fase G2 para a mitose (Georgieva et al., 2001).

A progressão do ciclo celular é regulado por subunidades catalíticas, ciclinas dependentes de quinases, designadas CDKs, bem como subunidades de ativação, designadas ciclinas. A progressão ordenada através do ciclo celular requer a ativação e inativação de diferentes complexos ciclina-CDKs em momentos apropriados. Uma série de proteínas

foi descrito como inibidoras de mitose, como a p21, p16 e p15. Uma proteína relacionada com a p21, a p27, foi descrita como um regulador negativo da progressão da fase G1. A p27 interage fortemente com ciclinas do tipo D e CDK4 *in vitro* e, em menor grau, com ciclinas do tipo E e CDK2 (Hengst et al., 1994).

Apesar da p21 e p27 serem inibidores do complexo ciclina E/cdk2, elas também podem funcionar na montagem e ativação dos complexos ciclina D/cdk4 e cdk6 (Zhang et al., 1994; LaBaer et al., 1997; Cheng et al., 1999). Estudos sugerem que a p27 e p21 podem ser seqüestradas em complexos de ciclina D. Em alguns tipos celulares, a p27 foi recrutada para o complexo ciclina D1/Cdk4 (Cheng et al., 1998). Em outros estudos, Myc foi capaz de ativar o complexo ciclina E/Cdk2, em parte, pela indução de expressão de ciclina D1 e ciclina D2, que estão associadas com o sequestro de p27 e p21 em células em proliferação (Perez-Roger et al., 1999; Bourchard et al., 1999).

Os protocolos de tratamento induziram diminuição de p27 em células de melanoma e apenas o quimioterápico DTIC induziu aumento discreto de p21 nesta linhagem tumoral. O seu aumento está relacionado com a inibição da apoptose, por meio da interação com moléculas como a pró-caspase 3, caspase-8, entre outras (Gartel; Tyner, 2002). Estes dados também podem indicar que a parada do ciclo celular da linhagem de melanoma tratada com o composto DM-1 e BNCT foi realizada exclusivamente por mecanismos relacionados com a ciclina D1, independentes de p21 e p27. Ainda, o aumento de p21 em melanócitos normais pode estar relacionado ao aumento expressivo de ciclina D1 nesta linhagem, indicando o sequestro de p21 pelo complexo ciclina D1/CDK4 capaz de induzir aumento na proliferação.

A proteína nuclear Ki67 é expressa nas células em proliferação e pode ser necessária para manter a proliferação celular. Ki67 tem sido usado como um marcador de proliferação celular de tumores sólidos e algumas doenças hematológicas (Schluter et al., 1993). O nível de expressão de Ki67 correlaciona-se com a progressão do melanoma e seu potencial metastático,

diminuindo a taxa de sobrevivência global. Desta forma, este marcador está intimamente ligado à proliferação celular (Straume et al., 2000; Moretti et al., 2001; Limonen et al., 2005; Ladstein et al., 2010).

A diminuição da proteína Ki67 em todos os protocolos de tratamento indica diminuição da proliferação das células de melanoma B16F10. Somente o quimioterápico DTIC induziu aumento deste marcador em melanócitos normais, corroborando com os dados das proporções das fases do ciclo celular.

A apoptose é uma série complexa de alterações morfológicas que incluem a condensação nuclear e ruptura da membrana com empacotamento do conteúdo intracelular, que é cuidadosamente embalado em pequenos fragmentos da membrana, denominados corpos apoptóticos. Estes são posteriormente fagocitados por células adjacentes sem provocar uma resposta inflamatória ou lesão tecidual (Ameisen, 2002; Fink, Cookson, 2005). O intervalo de tempo entre a exposição do agente que desencadeia esta série de eventos e o desenvolvimento de sinais morfológicos observáveis da apoptose varia muito, dependendo do tipo celular, tipo de intensidade dos fatores que desencadearam a apoptose, a duração da exposição e as condições ambientais da célula (Blankenberg; Norfray, 2011).

Muitas vias apoptóticas convergem na família de cisteíno-proteases aspartato específicas, conhecidas como caspases (Huerta et al., 2007). As caspase iniciadoras 8, 9 e 10 ou executoras 3, 6 e 7 participam de ligações cruzadas, com clivagem e ativação de outras caspases e outras proteínas apoptóticas que constituem as vias extrínseca e intrínseca da apoptose. A via extrínseca é iniciada por moléculas específicas indutoras de morte celular, como o fator de necrose tumoral (TNF), o receptor de TNF (TNF-R), o ligante de indução de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL), o Fas ligante (FasL), liberado no meio extracelular na ligação aos seus receptores cognatos que recrutam moléculas adaptadoras especializada oriundas do citoplasma dos domínios de morte associado ao Fas (FADD), domínio de morte relacionado ao receptor de TNF (TRADD), juntamente com caspase 8

para formar um complexo de sinalização de indução de morte (Disc). O Disc propaga o sinal de morte por via extrínseca pela ativação proteolítica da caspase 10, que cliva e ativa as caspases executoras até atingir a caspase 3. Uma vez ativada, a caspase 3 dirige-se ao núcleo, ativa a polimerase poli-ADP ribose do tipo 1 (Parp-1), uma enzima de reparo de DNA, e facilita a degradação do DNA nuclear. O Disc pode provocar a translocação do domínio de interação Bcl (Bid), uma proteína próapoptótica da família Bcl-2, para a mitocôndria. Esta proteína induz oligomerização das proteínas próapoptóticas antagonistas de Bcl-2, causadora de morte (Bak) e proteína X associada à Bcl (Bax). Estas proteínas são necessárias para formar canais na membrana mitocondrial externa em um processo conhecido como permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP). Estes canais permitem a liberação de várias proteínas, incluindo o citocromo c, a partir do espaço entre membranas da mitocôndria para o citoplasma. A liberação de citocromo c no citoplasma é a marca registrada da via apoptótica intrínseca, ou mitocondrial. Este processo é acompanhado de perda do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (Blankenberg; Norfray, 2011). O citocromo c interage com o fator de ativação da apoptose (Apaf-1), com a adenosina trifosfato (ATP), e pró-caspase 9 para formar uma estrutura conhecida como apoptossomo. A clivagem do apoptossomo causa ativação da caspase 9, que leva à ativação das caspases 3, 6, e 7. Após a ativação da caspase 3, ocorre uma rápida redistribuição, e o fosfolípido aniônico fosfatidilserina é exposto na superfície celular (Zwaal, Schroit, 2007; Zwaal, Comfurius, 2005). A fosfatidilserina normalmente é restrita à superfície interna da bicamada lipídica por uma enzima dependente de ATP denominada flipase (translocase). A flipase em conjunto com uma segunda enzima dependente de ATP, flopase, bombeia fosfolípeos catiônicos, como a fosfatidilcolina e esfingomiéline, à superfície da célula mantendo uma distribuição assimétrica dos diferentes fosfolípidos entre o interior e o exterior dos folhetos da membrana plasmática (Wood et al., 1996).

O quimioterápico DTIC, o composto DM-1 e a BNCT induziram aumento expressivo da proteína Bax, e diminuição significativa de Bcl-2 em

células de melanoma B16F10, indicando apoptose via intrínseca. Ainda, houve aumento na liberação de citocromo c e clivagem das caspases 3 e 8, em todos os protocolos de tratamento, com foco na terapia de BNCT que induziu aumento significativo nestes três marcadores na linhagem de melanoma B16F10. O composto DM-1 apresentou o mesmo aumento significativo na clivagem das caspases, enquanto o quimioterápico DTIC apresentou aumento moderado na liberação de caspase 8 e na liberação de citocromo c desta linhagem tumoral.

O poro de permeabilização da membrana externa mitocondrial (MAC) é regulado por diversas proteínas, tais como aquelas codificadas pela família de genes antiapoptóticos Bcl-2 (Dejean et al., 2006). Estas proteínas são capazes de promover ou inibir a apoptose pela ação direta sobre MAC/MOMP. Bax e/ou Bak formam o poro, enquanto Bcl-2, Bcl-xL ou Mcl-1 atuam inibindo a sua formação. Em células de melanoma humano SKMEL-5 e A375 houve diminuição de Bcl-2, além de Mcl-1 e Bid inativo.

Em alguns casos, a quantidade de caspase 8 ativa não é suficiente, de modo a ser necessário uma amplificação do sinal apoptótico da mitocôndria. Esta ligação cruzada é mediada pela clivagem de Bid por ativação de caspase-8. Posteriormente, Bid transloca-se para a mitocôndria onde induz oligomerização de Bax/Bak e a formação dos poros com a liberação de proteínas apoptóticas como citocromo c (Arnold et al., 2006).

A atividade próapoptótica de Bax e Bak é inibida por meio de associação com as proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Mcl-1, respectivamente (Samuel et al., 2010). O composto DM-1 interagiu com Bcl-2 e Mcl-1, desligando os complexos Bcl-2/Bax e Mcl-1/Bak, restaurando assim a capacidade de induzir morte pela via intrínseca da apoptose. O tratamento com DM-1 induziu a ativação e oligomerização de Bax e Bak e, portanto, permeabilização da membrana, liberação de citocromo c, formação do apoptossomo e ativação da cascata das caspases.

Bcl-2 e Bcl-xL funcionam na mesma via apoptótica, e ambos conferem resistência a múltiplos agentes quimioterápicos. A expressão acentuada destas proteínas geralmente é associada a um mau prognóstico em muitos

tumores humanos (Fiebig et al., 2006). Apenas a linhagem de melanoma humano A375 tratada com DM-1 mostrou diminuição de Bcl-xL, indicando que o composto DM-1 pode induzir apoptose atuando por vias diferentes e regulando diferentes proteínas no tratamento do melanoma.

A capacidade para migrar e atravessar a barreira epitelial-mesenquimatosa, permite que as células tumorais possam alcançar e invadir outros tecidos. No movimento celular há participação direta de um conjunto de microfilamentos envolvidos na organização do citoesqueleto. Estes microfilamentos são constituídos por actina e outras proteínas associadas, como vinculina ou paxilina. Para que os microfilamentos possam desenvolver atividade contrátil, há a necessidade de uma outra proteína filamentosa denominada miosina, que permite a reorganização do citoesqueleto e movimento celular. Esta rede de microfilamentos de actina situados abaixo da membrana plasmática permite que as células emitam projeções laminares (lamelipódios) que permitem o movimento. Da superfície são emitidas temporariamente extensões numerosas muito finas, denominadas filopódios. Os lamelipódios estabelecem contato com o substrato ao qual aderem, enquanto os filopódios não se aderem ao substrato e se retraem de volta para o citoplasma.

Durante o movimento celular, a formação e o desaparecimento de contatos focais permitem a motilidade das células. Os contatos focais formam uma ligação dinâmica entre a actina do citoesqueleto e as proteínas da MEC por meio de proteínas, como α -actina, vinculina, paxilina, talina e integrinas. Na adesão e remodelagem do citoesqueleto, necessárias para a movimentação das células, as integrinas possuem um papel fundamental. As integrinas mediam as interações físicas entre as proteínas da MEC (tais como laminina, fibronectina ou colágeno do tipo IV). Além disso, a um nível molecular, participam da ligação entre as diferentes vias de proliferação e sobrevivência, essenciais para a progressão tumoral (Hynes et al., 2002).

O quimioterápico DTIC apresentou desorganização dos filamentos de actina em células de melanoma SKMEL-5, sem a diminuição significativa dos contatos focais. O composto DM-1 também apresentou desorganização,

com formação de espículos nos filamentos do citoesqueleto, além de diminuição significativa na quantidade de contatos focais. Ainda, houve significativa diminuição/retração dos filopódios e lamelipódios durante os 90 minutos de tratamento. Estes dados, associados aos resultados de indução de apoptose podem sugerir morte celular via *anoikis*.

A acentuada quimio-resistência encontrada no melanoma sugere a inativação das vias que induzem a apoptose (Eberle et al., 2007), demonstrando o real valor dos resultados encontrados neste trabalho.

A Bad (promotor de morte associado à Bcl-2) é uma proteína próapoptótica, que desfosforilada forma heterodímeros com Bcl-2 e Bcl-xL, inativando-os e permitindo assim que as proteínas Bax/Bak desencadeiem a apoptose (Yang et al., 1995; Zha et al., 1996). Quando Bad é fosforilada por Akt/proteína quinase B, forma-se o homodímero com a proteína 14-3-3 (Zha et al., 1996). Isso deixa Bcl-2 livre para inibir a apoptose iniciada por Bax. Portanto, a fosforilação de Bad possui característica antiapoptótica e sua desfosforilação é próapoptótica.

Não foram encontradas diferenças significativas na expressão da proteína Bad nos protocolos de tratamento em relação ao grupo controle na linhagem de melanoma B16F10. Estes dados sugerem indução de apoptose por outras vias que independam da ação de Bad, como apoptose por via mitocondrial e outras vias extrínsecas.

TNF- α , um membro da superfamília de proteínas TNF (Fator de necrose tumoral) é uma proteína de membrana homotrimérica do tipo II (Aggarwal, 2003; Hehgans, Pfeffer, 2005). A resposta celular ao TNF- α é mediada através da interação com os receptores TNF-R1 e TNF-R2 e resulta em ativação de caminhos que favorecem a sobrevivência celular e apoptose, dependendo do tipo celular e contexto biológico. Ativação de vias quinase (incluindo JNK, ERK, p38 MAPK e NF- κ B) promove a sobrevivência de células, enquanto ativação de TNF- α mediada por caspase-8 leva à morte celular programada (Aggarwal, 2003; Hehgans, Pfeffer, 2005).

O composto DM-1 e a terapia de BNCT induziram aumento expressivo de TNF-R1 nas células de melanoma B16F10, enquanto o

quimioterápico DTIC não apresentou modificações significativas. As vias independentes de Bad e diminuição da expressão de Bcl-2 juntamente com aumento de caspase 8 clivada, indicam indução de apoptose por via extrínseca.

Estes achados corroboram com os resultados encontrados nas células de melanoma A375 coradas com Hoescht. O tratamento com o composto DM-1 isoladamente ou em associação à DTIC induziu a formação de corpos apoptóticos e mesmo com a redução da concentração do composto.

Com base nos dados obtidos, o composto DM-1 e a BNCT mostraram aumento de morte celular seletiva para as células tumorais com ativação e expressão de diversas vias de sinalização, tais quais necrose, apoptose e possivelmente anoikis. Diversos caminhos dentro das vias de sinalização, como regulação de genes por micro-RNAs, diminuição da proporção Bcl-2/Bax, ativação da cascata de caspases, regulação da expressão de p53, entre outros, podem ser ativadas pelo mesmo tratamento.

A terapia atual para o câncer depende de diversos fatores intrínsecos à biologia das células tumorais e extrínsecos pela combinação dos tratamentos, principalmente do uso de cirurgia, irradiação e poliquimioterapia.

Apesar da baixa resposta quimioterapêutica, a monoterapia é considerada o tratamento de escolha para o melanoma (Middleton et al., 2000). O poder efetivo da terapia de BNCT e do composto DM-1 faz com que a possibilidade de terapias combinatórias, provavelmente tenha resultados extremamente favoráveis na modulação da resposta proliferativa desses tumores.

6. CONCLUSÕES

- O composto DM-1 e a terapia de BNCT apresentaram potencial citotóxico seletivo, com valores de IC₅₀ significativos para as células tumorais de melanoma em relação às células normais, além da acentuada produção de radicais livres peroxidados;
- O quimioterápico DTIC apresentou elevada citotoxicidade em células normais, com aumento na quantidade de radicais livres peroxidados, aumento de DNA fragmentado, diminuição no potencial elétrico da membrana mitocondrial, além de modificação na MEC e no citoesqueleto. Em células de melanoma, apresentou morte celular principalmente por necrose e com ativação relativamente baixa de marcadores apoptóticos.
- Células de melanoma tratadas com o composto DM-1 apresentaram aumento na produção de radicais livres peroxidados, assim como aumento do DNA fragmentado e diminuição do potencial elétrico mitocondrial e na expressão ciclina D1. Além disso, foi possível identificar modificações na MEC, no citoesqueleto e nas adesões focais. Ainda, o composto DM-1 atuou de maneiras distintas nas diferentes linhagens de melanoma, como parada do ciclo celular e indução de apoptose por via intrínseca e extrínseca. Dentro da mesma via de sinalização, apresentou modulação na expressão dos diversos marcadores de maneira célula-dependente. Mesmo com todos esses efeitos deletérios às células tumorais, o composto DM-1 apresentou diminuição severa nos efeitos colaterais em células normais;
- A BNCT apresentou aumento na fração de células em necrose e apoptose, também indicando que a terapia possa atuar de maneiras distintas de acordo com o tipo celular. A inibição da atividade proliferativa foi realizada por diminuição de expressão de ki67 e de ciclina D1, assim como as modificações na MEC foram produzidas

pela diminuição do colágeno. A via apoptótica também foi ativada em células de melanoma B16F10, com diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e aumento de marcadores próapoptóticos Bax, citocromo c, caspase 3 e 8 clivadas;

Comparadas ao quimioterápico DTIC, as duas novas modalidades terapêuticas, fenolato de sódio DM-1 e a terapia de captura de nêutrons pelo Boro, foram capazes de atuar de maneira específica na população de células tumorais, com indução de morte ou parada do ciclo celular, ocasionando danos mínimos às células normais. Desta forma, as novas terapias apresentam um avanço no campo do tratamento desta neoplasia e de outros tumores, que ainda possuem resistência aos diversos tratamentos empregados clinicamente.

7. REFERENCIAS

Aalto M, Potila M, Kulonen E. The effect of silica-treated macrophages on the synthesis of collagen and other proteins in vitro. *Exp Cell Res*. 1976;97:193-202.

Abdel-Naser MB, 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. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2003;19:122-7.

Abi-Habib RJ, Urieto JO, Liu S, Leppla SH, Duesbery NS, Frankel AE. BRAF status and mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase 1/2 activity indicate sensitivity of melanoma cells to anthrax lethal toxin. *Mol Cancer Ther*. 2005;4:1303-10.

Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:745-56.

Ameisen JC. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ*. 2002;9:367-93.

Arnold R, Brenner D, Becker M, Frey CR, Krammer PH. How T lymphocytes switch between life and death. *Eur J Immunol*. 2006;36:1654-8.

Baker GL, Landis MW, Hinds PW. Multiple functions of D-type cyclins can antagonize pRv-mediated suppression of proliferation. *Cell Cycle*. 2005;4:330-8.

Balch CM, Reintgen DS, Kirkwood JM, Peters L, Ang KK. Cutaneous melanoma. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer, principles and practice of oncology*. 6a ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2001. p. 1947-94.

Bajetta E, Del Vecchio M, Bernard-Marty C, Vitali M, Buzzoni R, Rixe O, Nova P, Aglione S, Taillibert S, Khayat D. Metastatic melanoma: chemotherapy. *Semin Oncol*. 2002;29:427-45.

Baliga MS, Katiyar SK. Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. *Photochem Photobiol Sci*. 2006;5:243-53.

Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY, Tezuka Y, Awale S, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *J Ethnopharmacol*. 2002;80:67-73.

Barcellos-Hoff MH, Park C, Wright EG. Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:867-75.

Barth RF, Coderre JA, Vicente MG, Blue TE. Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects. *Clin Cancer Res*. 2005;11:3987-4002.

Barth RF, Soloway AH, Fairchild RO, Brugger RM. Boron neutron capture therapy for cancer: realities and prospects. *Cancer*. 1992;70:2995-3007.

Barth RF, Soloway AH, Goodman JH, Gahbauer RA, Gupta N, Blue TE, Yang W, Tjarks W. Boron neutron capture therapy of brain tumours – an emerging therapeutic modality. *Neurosurgery*. 1999;44:433–51.

Basu TK, Temple NJ, Garg ML. *Antioxidants in human health and disease*. London: British Library; 1999, 451p.

Benavente-García O, Castillo J, Marín FR, Ortuño A, and Del Rio JA: Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem*. 2008;56:6185-205.

Benzie IFF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. *Int J Food Sci Nut*. 1996;47:233-61.

Bernal SD, Lampidis TJ, Summerhayes IC, Chen LB. Rhodamine-123 selectively reduces clonal growth of carcinoma cells in vitro. *Science*. 1982;218:1117-9.

Bevona C, Sober AJ. Melanoma incidence trends. *Dermatol Clin*. 2002;20:589-95.

Bhatt KV, Hu R, Spofford LS, Aplin AE. Mutant B-RAF signaling and cyclin D1 regulate Cks1/S-phase kinase-associated protein 2-mediated degradation of p27Kip1 in human melanoma cells. *Oncogene*. 2007;26:1056–66.

Blankenberg FG, Norfray JF. Multimodality molecular imaging of apoptosis in oncology. *AJR Am J Roentgenol*. 2011;197:308-17.

Blaumann H, Gonzalez S, Longhino J, SantaCruz G, Calzetta-Larrieu O, Bonomi M, Roth B. Boron neutron capture therapy of skin melanomas at the RA-6 reactor: a procedural approach to beam setup and performance evaluation for up coming clinical trials. *Med.Phys*. 2004;31:70–80.

Bonduki CE, Dornelas Junior GO, Bernardo A, Simões MJ, Castro RA, Gomes MTV, Girão MJBC. Avaliação da proporção de colágeno no tecido uterino antes e após tratamento do leiomioma uterino pela embolização arterial. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009;31:598-603.

Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J., and Eilers, M. Direct induction of cyclin

D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J.* 1999;18:5321-33.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998;56:317-33.

Beddingfield FC. The melanoma epidemic: res ipsa loquitur. *Oncologist.* 2003;8: 459-65.

Brown K, Mountford MH, Allen BJ, Mishima Y, Ichihashi M, Parsons P. Neutron Irradiation of Human Melanoma Cells. *Pigment Cell Res.* 1989;2:319-24.

Busse P, Zamenhof R, Madoc-ones H, Solares G, Kiger S, Riley K, Chuang C, Rogers G, Harling O. Clinical follow-up of patients with melanoma of extremity treated in phase I boron neutron capture therapy protocol. In: Larson B, Crawford J, Weinreich R. *Advances in Neutron Capture Therapy.* Zurich: Elsevier; 1997. p. 60-4.

Calabresi P, Chabner BA. Chemotherapy of neoplastic diseases. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.* 10a ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1381-459.

Campos TPR. Considerações sobre a terapia de captura de nêutrons pelo boro. *Rev Bras Cancer.* 2000;46:283-92.

Carey TE, Takahashi T, Resnick LA, Oettgen HF, Old LJ. Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976;73:3278-82.

Chapman PB, Einhorn LH, Meyers MH, Saxman S, Destro AN, Panageas KS, Begg CB, Agerwala SS, Schuchter LM, Ernstoff MS, Houghton AN, Kirkwood JM. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus Dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1999;17:2745-51.

Chen BG, Zhang MY, Zhao YY, Zhang J, Sun CC. Structural and electronic properties of BPA-fructose complex used in boron neutron capture therapy. *J Mol Struct: THEOCHEM.* 2006;766:35-40.

Chen CN, Wu CL, Lin JK. Apoptosis of human melanoma cells induced by the novel compounds propolin A and propolin B from Taiwenese própolis. *Cancer Lett.* 2007;245:218-31.

Chen LB, Summerhayes IC, Johnson LV, Walsh ML, Bernal SD, Lampidis TJ. Probing mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1982;46:141-55.

Chen M, Osman I, Orlow SJ. Antifolate Activity of Pyrimethamine Enhances Temozolomide-Induced Cytotoxicity in Melanoma Cells. *Mol Cancer Res.* 2009;7:703-12.

Chen Y, Kramer DL, Diegelman P, Vujcic S, Porter CW. Apoptotic signaling in polyamine analogue-treated SKMEL-28 human melanoma cells. *Cancer Res.* 2001;61:6437-44.

Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, Sherr CJ. The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* 1999;18:1571-1583.

Cheng, M., Sexl, V., Sherr, C. J., and Roussel, M. F. Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogenactivated protein kinase kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:1091-6.

Civita V. *Medicina e Saúde.* São Paulo: Editora Abril; 1972.

Coderre JA, Glass JD, Fairchild RG, Micca PL, Fand I, Joel DD: Selective delivery of boron by the melanin precursor analogue p-boronophenylalanine to tumours other than melanoma. *Cancer Res.* 1990;50:138–41.

Coderre JA, Glass JD, Packer S, Micca P, Greenberg D. Experimental boron neutron capture therapy for melanoma: systemic delivery of boron to melanotic and amelanotic melanoma. *Pigment Cell Res.* 1990;3:310–8.

Coderre JA, Kalef-Ezra JA, Fairchild RG, Micca PL, Reinstein LE, Glass JD. Boron neutron capture therapy of a murine melanoma. *Cancer Res.* 1988;28:6313-6.

Crosby T, Fish R, Coles B, Mason MD. Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma. *Chocrane Database Syst. Rev.* 2000;CD001215.

Dandamudi S, Campbell RB. The drug loading, cytotoxicity and tumor vascular targeting characteristics of magnetite in magnetic drug targeting. *Biomaterials.* 2007;28:4673-83.

Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: Critical control points. *Cell* 2004;116:205-19.

Darzynkiewicz Z, Traganos F, Staiano-Coico L, Kapuscinski J, Melamed MR. Interactions of rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry. *Cancer Res.* 1982;42:799-806.

Davis S, Weiss MJ, Wong JR, Lampidis TJ, Chen LB. Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells. *J Biol Chem*. 1985;260:13844-50.

Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis JJ, Wolman M. Are the polarization colors of picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry*. 1989;93:27-9.

Dejean LM, Martinez-Caballero S, Manon S, Kinnally KW. Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762:191-201.

Del Marmol V, Ito S, Jackson I, Vachtenheim J, Berr P, Ghanem G, Morandini R, Wakamatsu K, Huez G. TRP-1 expression correlates with eumelanogenesis in human pigment cells in culture. *FEBS Lett*. 1993;327:307-10.

Delaney G, Barton M, Jacob S. Estimation of an optimal radiotherapy utilization rate for melanoma: a review of the evidence. *Cancer*. 2004;100:1293-1301.

Douma S, van LaarT, Zevenhoven J, Meuwissen R, Van Garderen E, Beeper DS. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature*. 2004;430:1034-9.

Eberle J, Kurbanov BM, Hossini AM, Trefzer U, Fecker LF. Overcoming apoptosis deficiency of melanoma—hope for new therapeutic approaches. *Drug Resist Updat*. 2007;10:218-34.

Engbers-Buijtenhuijs P, Kamphuis M, van der Sluijs Veer G, Haanen C, Poot AA, Feijen J, Vermes I. A novel time resolved fluorometric assay of anoikis using Europium-labelled Annexin V in cultured adherent cells. *Apoptosis*. 2005;10:429-37.

Faião-Flores F, Pardi PC, Santos RP, Rando DG, Quincoces, JAP, Maria DA. Antiproliferative and antimetastatic activity of DM-1, sodium 4-[5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-oxo-penta-1,4-dienyl]-2-methoxy-phenolate, in B16F10 melanoma. *Applied Cancer Res*. 2008; 28:72-9.

Faião-Flores F, Coelho PR, Arruda-Neto J, Maria DA. Boron Neutron Capture Therapy induces cell cycle arrest and DNA fragmentation in murine melanoma cells. *Appl Radiat Isot*. 2011a;69:1741-4.

Faião-Flores F, Coelho PR, Muniz RO, Souza GS, Arruda-Neto J, Maria DA. Antitumor potential induction and free radicals production in melanoma cells by Boron Neutron Capture Therapy. *Appl Radiat Isot*. 2011b;69:1748-51.

Faião-Flores F, Suarez JA, Pardi PC, Maria DA. DM-1, sodium 4-[5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-oxo-penta-1,4-dienyl]-2-methoxy-phenolate: a curcumin analog with a synergic effect in combination with paclitaxel in breast cancer treatment. *Tumour Biol* 2012a;33:775-785.

Faião-Flores F, Coelho PR, Arruda-Neto JD, Camillo MA, Maria-Engler SS, Rici RE, Sarkis JE, Maria DA. Boron uptake in normal melanocytes and melanoma cells and boron biodistribution study in mice bearing B16F10 melanoma for boron neutron capture therapy. *Radiat Environ Biophys*. 2012b. [Epub ahead of print].

Fiebig AA, Zhu W, Hollerbach C, Leber B, Andrews DW. Bcl-XL is qualitatively different from and ten times more effective than Bcl-2 when expressed in a breast cancer cell line. *BMC Cancer*. 2006;6:213.

Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*. 2005;73:1907-16.

Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*. 1994;124:619-26.

Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Cell Biol*. 2001;13:555-62.

Fukuda H, Honda C, Wadabayashi N, Kobayashi T, Yoshino K, Hiratsuka J, Takahashi J, Akaizawa T, Abe Y, Ichihashi M, Mishima Y. Pharmacokinetics of ^{10}B -p-boronophenylalanine in tumors, skin and blood of melanoma patients: a study of boron neutron capture therapy for malignant melanoma. *Melanoma Res*. 1999;9:75–83.

Fukuda H, Kobayashi T, Matsuzawa T, Kanda K, Ichihashi M, Mishima Y. RBE of a thermal neutron beam and the $^{10}\text{B}(\text{n},\alpha)^7\text{Li}$ reaction on cultured B-16 melanoma cells. *Int. J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1987;51:167-75.

Fuller KM, Arriaga EA. Advances in the analysis of single mitochondria. *Curr Opin Biotechnol*. 2003;14:35-41.

Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther*. 2002;1:639-49.

Georgieva J, Sinha P, Schadendorf D. Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. *J Clin Pathol*. 2001;54:229-35.

Gogas HJ, Kirkwood JM, Sondak VK. Chemotherapy for metastatic melanoma: time for a change? *Cancer*. 2007;109:455-64.

Gomez-Cordoves C, Bartolome B, Vieira W, Virador VM. Effects of wine phenolics and sorghum tannins on tyrosinase activity and growth of melanoma cells. *J Agric Food Chem*. 2001;49:1620–4.

González SJ, Bonomi MR, Santa Cruz GA, Blaumann HR, Calzetta-Larrieu OA, Menéndez P, Jiménez-Rebagliati R, Longhino J, Feld DB, Dagrosa MA, Argerich C, Castiglia SG, Batistoni DA, Liberman SJ, Roth BM. First BNCT treatment of a skin melanoma in Argentina: dosimetric analysis and clinical outcome. *Appl Radiat Isot*. 2004;61:1101-5.

Gordaliza M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin Transl Oncol*. 2007;9:767-76.

Grossman J, Walther K, Artinger M, Kiesslink S, Scholmerich J. Apoptotic signaling during initiation of detachment-induced apoptosis (“anoikis”) of primary human intestinal epithelial cells. *Cell Growth Differ*. 2001;12:147-55.

Guo A, Ze-Jian C, Miyoshi H, Komyoji T, Haga T, Fujita T. Uncoupling activity of a newly developed fungicide, fluazinam [3-chloro-N-(3-chloro-2,6-dinitro-4-trifluoromethylphenyl)-5-trifluoromethyl-2-pyridinamine]. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1056:89-92.

Hafner J, Schmid MH, Kempf W, Burg G, Künzi W, Meuli-Simmen C, Neff P, Meyer V, Mihic D, Garzoli E, Jungius KP, Seifert B, Dummer R, Steinert H. Baseline staging in cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol*. 2004;150:677-86.

Hall HI, Miller DR, Rogers JD, Bewerse B. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. *J Am Acad Dermatol*. 1999;40:35-42.

Harborne JB. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. London: Chapman Hall; 1993.

Hearing VJ, Tsukamoto K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J*. 1991;5:2902–9.

Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*. 2005;115:1-20.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407:770-6.

Hengst L, Dulic V, Slingerland JM, Lees E, Reed SI. A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:5291-5.

Hiratsuka J, Fukuda H, Kobayashi T, Yoshino K, Honda C, Ichihashi M, Mishima Y. Long term outcome of BNCT for malignant melanoma. *Proceedings of 9th International Symposium on Neutron Capture Therapy for Cancer*. Osaka;2000. p. 165–6.

Hiratsuka J, Kondoh H, Tsuboi T, Yoshino K, Imajo Y, Mishima Y. Selective uptake of para-boronophenylalanine increases in amelanotic melanoma cells transfected by the tyrosinase gene. *Melanoma Res*. 2000;10:297–302.

Ho RC. Medical management of stage IV malignant melanoma. Medical issues. *Cancer*. 1995;75:735-41.

Howe HL, Wingo PA, Thun MJ, Ries LA, Rosenberg HM, Feigal EG, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:824-42.

Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res*. 2007;139:143–56.

Hui Z, Naikum Z, Rang Z, Xiumin L, Huifang C. Effect of ionizing radiation on bio-oxidase activities in cytoplasm of mouse blood liver cells. *Chin J Radiat Med Prot*. 1996;16:179-82.

Hynes RO, Lively JC, McCarty JH, Taverna D, Francis SE, Hodivala-Dilke K, Xiao Q. The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2002;67:143-53.

Ilmonen S, Hernberg M, Pyrhönen S, Tarkkanen J, Asko-Sellavaara S. Ki-67, Bcl-2 and p53 expression in primary and metastatic melanoma. *Melanoma Res*. 2005;15:375-81.

Inca. Rio de Janeiro. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/tabelaestados.asp?UF=BR>>. Acesso em 18 de outubro de 2012.

Ito S, Wakamatsu K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. *Pigment Cell Res*. 2003;16:523-31.

Iwashita K, Kobori M, Yamaki K, Tsushida T. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000;64:1813–20.

Jalkanen M, Penttinen R. Enhanced fibroblast collagen production by a macrophage-derived factor (CEMF). *Biochem Biophys Res Commun*. 1982;108:447-53.

Jimenez SA, McArthur W, Rosenbloom J. Inhibition of collagen synthesis by mononuclear cell supernates. *J Exp Med*. 1979;150:1421-31.

Johnson LV, Walsh ML, Chen LB. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77:990-4.

Jones TC, Hunt RD, King NW. A pele e seus apêndices. In: Jones TC, Hunt RD, King NW. *Patologia veterinária*. 6a ed. São Paulo: Manole; 2000. p. 871-3.

Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization micro scopy, a specific method for collagen detection in tissue sections, *Histochem J*. 1979;11:447-55.

Junqueira LC, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collage by the picrosirius-polarization method. *Histochemistry* 1982;74:153-6.

Keagle JN, Welch WJ, Young DM. Expression of heat shock proteins in a linear rodent wound. *Wound Repair Regen*. 2001;9:378-85.

Koren R, Yaniv E, Kristt D, Shvero J, Veltman V, Grushko I, Feinmesser R, Sulkes J, Gal R. Capsular collagen staining of follicular thyroid neoplasms by picrosirius red: role in differential diagnosis. *Acta Histochem*. 2001;103:151-7.

Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:619-42.

Kullberg EB. *Tumor Cell Targeting of Stabilized Liposome Conjugates*. [Tese]. Uppsala County: Uppsala University; 2003.

LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev*. 1997;11:847-62.

Ladstein R, Bachmann I, Straume O, Akslen LA. Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitotin as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. *BMC Cancer*. 2010;10:140.

Lam T, Hetherington JW, Greenman J, Little S, Maraveyas A. Metronomic chemotherapy dosing-schedules with estramustine and temozolomide act synergistically with anti-VEGFR-2 antibody to cause inhibition of human umbilical venous endothelial cell growth. *Acta Oncol*. 2007;46:1169-77.

Lance A, Kohn E. Anoikis: cancer and the homeless cell. *Nature* 2004;430:973-4.

Larrosa M, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Grape polyphenol resveratrol and the related molecule 4-hydroxystilbene induce growth inhibition, apoptosis, S-phase arrest, and upregulation of cyclins A, E, and B1 in human SK-Mel-28 melanoma cells. *J Agric Food Chem*. 2003;51:4576-84.

Lazzè MC, Pizzala R, Gutiérrez Pecharromán FJ, Gatón Garnica P, Antolín Rodríguez JM, Fabris N, Bianchi L. Grape waste extract obtained by supercritical fluid extraction contains bioactive antioxidant molecules and induces antiproliferative effects in human colon adenocarcinoma cells. *J Med Food*. 2009;12:561-8.

Lecoeur H, Langonne A, Baux L, Rebouillat D, Rustin P, Prevost MC, Brenner C, Edelman L, Jacotot E. Real-time flow cytometry analysis of permeability transition in isolated mitochondria. *Exp. Cell Res*. 2004;294:106-17.

Le Marchand L. Cancer preventive effects of flavonóides -- a review. *Biomed Pharmacother*. 2002;56:296-301.

Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1366:53-67.

Lev DC, Onn A, Melinkova VO, Miller C, Stone V, Ruiz M, McGary EC, Ananthaswamy HN, Price JE, Bar-Eli M. Exposure of melanoma cells to dacarbazine results in enhanced tumor growth and metastasis in vivo. *J Clin Oncol*. 2004;22:2092-100.

Luca M, Huang S, Gershenwald JE, Singh RK, Reich R, Bar-Eli M. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells upregulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol*. 1997;151:1105-13.

Machado AT, Oliveira BRR, Padua CAJ, Wainstein AJ. Conduta para o melanoma cutâneo maligno. *Rev Med Minas Gerais*; 2004;14:173-9.

Majer M, Jensen RL, Shrieve DC, Watson GA, Wang M, Leachman SA, Boucher KM, Samlowski WE. Biochemotherapy of metastatic melanoma in patients with or without recently diagnosed brain metastases. *Cancer*. 2007;110:1329-37.

Malumbres M, Barbacid M: To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1:222-31.

Manson MM. Cancer prevention - the potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends Mol Med*. 2003;9:11-8.

Marin YE, Wall BA, Wang S, Namkoong J, Martino JJ, Suh J, Lee HJ, Rabson AB, Yang YS, Chen S, Ryu JH.. Curcumin downregulates the

constitutive activity of NF-kappaB and induces apoptosis in novel mouse melanoma cells. *Melanoma Res.* 2007;17:274–83.

Marroni NP, Marroni CA. *Estresse oxidativo e antioxidante*. Porto Alegre: Editora Ulbra; 2002.

Martinez AO, Vara C, Castro J. Increased uptake and retention of rhodamine 123 by mitochondria of old fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.* 1987;39:1-9.

Mendes PF, Xander P, Novaes e Brito RR, Mortara RA, Jasiulionis MG, Lopes JD. A cell surface 230 kDa protein from murine melanoma involved with tumor malignancy. *Cancer Lett.* 2008;262:276-85.

Menéndez PR, Roth BM, Pereira MD, Casal MR, González SJ, Feld DB, Santa Cruz GA, Kessler J, Longhino J, Blaumann H, Jiménez Rebagliati R, Calzetta Larrieu OA, Fernández C, Nievas SI, Liberman SJ. BNCT for skin melanoma in extremities: updated Argentine clinical results. *Appl Radiat Isot.* 2009;67:S50-3.

Menichetti L, Gaetano L, Zampolli A, Del Turco S, Ferrari C, Bortolussi S, Stella S, Altieri S, Salvadori PA, Cionini L. In vitro neutron irradiation of glioma and endothelial cultured cells. *Appl Radiat Isot.* 2009;67:S336-40.

Menon LG, Kuttan R, Kuttan G. Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. *Cancer Lett.* 1999;141:159-65.

Menon LG, Kuttan R, Kuttan G. Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds. *Cancer Lett.* 1995;95:221-5.

Meredith JE, Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* 1993;4:953-61.

Mhaidat NM, Zhang XD, Allen J, Avery-Kiejda KA, Scott RJ, Hersey P. Temozolomide induces senescence but not apoptosis in human melanoma cells. *Br J Cancer.* 2007;97:1225–33.

Micoud F, Mandrand B, Malcus-Vocanson C. Comparison of several techniques for the detection of apoptotic astrocytes in vitro. *Cell Prolif.* 2001;34:99-113.

Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000;52:673–751.

Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S, Gore M, Aamdal S, Cebon J, Coates A, Derano B, Schadendorf D, Kapp A, Weiss J, Fraass U, Statkevich P, Muller M, Thatcher, N. Randomized Phase III

study of Temozolomide *versus* Dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2000a;18:158–66.

Middleton MR, Lorigan P, Owen J, Ashcroft L, Lee SM, Harper P, Thatcher, N. A randomized Phase III study comparing Dacarbazine, BCNU, cisplatin and tamoxifen with Dacarbazine and interferon in advanced melanoma. *Br J Cancer.* 2000b;82:1158–62.

Mitev M, Ilieva K, Apostolov T. Building of scientific information system for sustainable development of BNCT in Bulgaria. *Appl Radiat Isot.* 2009;67:S296-8.

Mishima, Y, Ichihashi M, Hatta S, Honda C, Yamamura K, Nakagawa T. New thermal neutron capture therapy for malignant melanoma: melanogenesis - seeking 10B molecule-melanoma cell interaction from in vitro to first clinical trial. *Pigment Cell Res.* 1989;2:226–34.

Moretti S, Spallanzani A, Chiarugi A, et al. Correlation of Ki67 expression in cutaneous primary melanoma with prognosis in a prognostic study: different correlation according to thickness. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44:188-92.

Morishima T, Fukuda E. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in human malignant-melanoma tissues. *Arch Dermatol Res.* 1985;277:248-50.

Morita N, Hiratsuka J, Kondoh H, Uno M, Asano T, Niki Y, Sakurai Y, Ono K, Harada T, Imajo Y. Improvement of the tumor-suppressive effect of boron neutron capture therapy for amelanotic melanoma by intratumoral injection of the tyrosinase gene. *Cancer Res.* 2006;66:3747-53.

Moron M, Arruda-Neto, J, Segreto H, Maria DA, Batista L , Genofre G. Cancer cells jointly exposed to gamma-radiation and electric field develop S-phase arrest. *WebmedCentral Bbiology.* 2011;2:WMC001154.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.

Nygren P, Larsson R. Overview of the clinical efficacy of investigational anticancer drugs. *J Intern Med.* 2003;253:46-75.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351-8.

Ohno Y, Fukuda K, Takemura G, Toyota M, Watanabe M, Yasuda N, Xinbin Q, Maruyama R, Akao S, Gotou K, Fujiwara T, Fujiwara H. Induction of apoptosis by gallic acid in lung cancer cells. *Anticancer Drugs.* 1999;10:845-51.

Oliveira SI, Andrade LN, Onuchic AC, Nonogaki S, Fernandes PD, Pinheiro MC, Rohde CB, Chammass R, Jancar S. Platelet-activating factor receptor (PAF-R)-dependent pathways control tumour growth and tumour response to chemotherapy. *BMC Cancer*. 2010;10:200.

Otake AH. *Papel de dissialogangliosídeos na proliferação e morte celular induzida de melanócitos e melanoma in vitro*. [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2005.

Papasprou M, Feinendegen LE, Muller-Gartner HW. Preloading with L-tyrosine increases the uptake of boronophenylalanine in mouse melanoma cells. *Cancer Res*. 1994;54:6311–4.

Perez-Roger I, Kim SH, Griffiths B, Sewing A, Land H. Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *EMBO J*. 1999;18:5310-20.

Pickring JG, Boughner DR. Quantitative assessment of the age of fibrotic lesions using polarized light microscopy and digital image analysis. *Am J Pathol*. 1991;138:1225-31.

Pulley LT, Stannard AA. Skin and Soft Tissues. In: Moulton JE. *Tumor in Domestic Animals*. 3a ed. London: University of Califórnia; 1990. p.75-82.

Qiu X, Takemura G, Koshiji M, Hayakawa Y, Kanoh M, Maruyama R, Ohno Y, Minatoguchi S, Akao S, Fukuda K, Fujiwara T, Fujiwara H. Gallic acid induces vascular smooth muscle cell death via hydroxyl radical production. *Heart Vessels*. 2000;15:90–9.

Quatresooz P, Pierard GE, Pierard-Franchimont C; Mosan Study Group of Pigmented Tumors. Molecular pathways supporting the proliferation staging of malignant melanoma (review). *Int J Mol Med*. 2009;24:295-301.

Quincoces Suarez J, Rando DG, Maria DA, Pardi P, Martins C, De Souza P. Brazilian Patent PI 0602640-0. PCT/BR2007/000175. WO2008/003155. 2007 Jul 6.

Quincoces Suarez J, Rando DG, Santos RP, Gonçalves CP, Ferreira E, Carvalho J, Kohn L, Maria DA, Faião-Flores F, Michalik D, Marcucci MC, Vogel C. New antitumoral agents I: In vitro anticancer activity and in vivo acute toxicity of synthetic 1,5-bis(4-hydroxy- 3-methoxyphenyl)-1,4-pentadien-3-one and derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2010;18:6275-81.

Reddy L, Odhav B, Bhoola KD. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol Ther*. 2003;99:1-13.

Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB, Diederich M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2008;76:1340-51.

Ristic-Fira AM, Korićanac LB, Zakula JJ, Valastro LM, Iannolo G, Privitera G, Cuttone G, Petrović IM. Effects of fotemustine or dacarbazine on a melanoma cell line pretreated with therapeutic proton irradiation. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009;28:50.

Ristic-Fira AM, Petrovic IM, Koricanac LB, Valastro LM, Privitera G, Cuttone G. Assessment of the inhibitory effects of different radiation qualities or chemotherapeutic agents on a human melanoma cell line. *Phys Med.* 2008;24:187-95.

Rivers JK. Melanoma. *Lancet.* 1996;347:803-6.

Ruoslahti E, Reed JC. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 1994;77:477-8.

Samuel S, Tumilasci VF, Oliere S, Nguyễn TL, Shamy A, Bell J, Hiscott J. VSV oncolysis in combination with the BCL-2 inhibitor obatoclax overcomes apoptosis resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Ther.* 2010;18:2094-103.

Saris NE, Teplova VV, Odinokova IV, Azarashvily TS. Interference of calmidazolium with measurement of mitochondrial membrane potential using the tetraphenylphosphonium electrode or the fluorescent probe rhodamine 123. *Anal Biochem.* 2004;328:109-12.

Sauter ER, Yeo UC, von Stemm A, Zhu W, Litwin S, Tichansky DS, Pistritto G, Nesbit M, Pinkel D, Herlyn M, Bastian BC. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer Res.* 2002;62:3200-6.

Scaduto Jr RC, Grotyohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J.* 1999;76:469-77.

Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol.* 1993;123:513-22.

Schmaljohann J, Biersack HJ, Guhlke S. Production and therapeutic application of radiopharmaceuticals. Radiotherapeutics. *Pharm. Unserer Zeit.* 2005;34:498-504.

Schwartz GK, Shah MA. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol.* 2005;23:9408–21.

Sedletska Y, Giraud-Panis MJ, Malinge JM. Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2005;5:251-65.

Serrone L, Zeuli M, Sega FM, Cognetti F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res*. 2000;19:21-34.

Shishodia S, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Role of curcumin in cancer therapy. *Curr. Probl. Cancer*. 2007;31:243–305.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin*. 2012;62: 10-29.

Simões C, Schenkel E, Gosmann G; Mello J, Mentz L, Petrovick P. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 2a ed. Porto Alegre: Ed Universidade/UFRGS/Ed. Universidade/UFSC; 2000.

Sjoberg S, Carlsson J, Ghaneolhosseini H, Gedda L, Hartman T, Malmquist J, Naeslund C, Olsson P, Tjarks W. Chemistry and biology of some low molecular weight boron compounds for boron neutron capture therapy. *J Neurooncol*. 1997;33:41–52.

Slatkin DN. A history of Boron neutron capture therapy of brain tumors. *Brain*. 1991;114:1609-29.

Smalley KS, Contractor R, Nguyen TK, Xiao M, Edward R, Muthusamy V, King AJ, Flaherty KT, Bosenberg M, Herlyn M, Nathanson KL. Identification of a novel subgroup of melanomas with KIT/cyclin-dependent kinase-4 overexpression. *Cancer Res*. 2008a;68:5743–52.

Smalley KS, Lioni M, Dalla Palma M, Xiao M, Desai B, Egyhazi S, Hansson J, Wu H, King AJ, Van Belle P, Elder DE, Flaherty KT, Herlyn M, Nathanson KL. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol Cancer Ther*. 2008b;7:2876–83.

Sober AJ, Chuang TY, Duvic M, Farmer ER, Grichnik JM, Halpern AC, Ho V, Holloway V, Hood AF, Johnson TM, Lowery BJ. Guidelines of care for primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2001;45:579-86.

Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance, *Oncogene* 2003;22:3138-51.

Straume O, Sviland L, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumour cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res*. 2000;6:1845-53.

Su CC, Lin JG, Li TM, Chung JG, Yang JS, Ip SW, Lin WC, Chen GW. Curcumin-induced apoptosis of human colon cancer colo 205 cells through the production of ROS, Ca²⁺ and the activation of caspase-3. *Anticancer Res.* 2006;26:4379-89.

Surh YJ, Ferguson LR. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential--highlights of a symposium. *Mutat Res.* 2003;523-524:1-8.

Takagaki M, Powell W, Sood A, Spielvogel BF, Hosmane NS, Kirihata M, Ono K, Masunaga SI, Kinashi Y, Miyatake SI, Hashimoto N. Boronated dipeptide borotrimethylglycylphenylalanine as a potential boron carrier in boron neutron capture therapy for malignant brain tumors. *Radiat Res.* 2001;156:118-22.

Tan TW, Tsai HR, Lu HF, Lin HL, Tsou MF, Lin YT, Tsai HY, Chen YF, Chung JG. Curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells via MMP changes and caspase-3 activation. *Anticancer Res.* 2006;26:4361-71.

Tsuji M, Ichihashi M, Mishima Y. Selective affinity 10B 1-paraboronophenylalanine - HCl to malignant melanoma: thermal neutron capture therapy. *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi.* 1983;93:773-8.

Turriziani A, Mattiucci GC, Montoro C, Ferro M, Maurizi F, Smaniotto D, Cellini N. Radiotherapy-related fatigue: incidence and predictive factors. *Rays.* 2005;30:197-203.

Urano M, Ling CC. Thermal enhancement of melphalan and oxaliplatin cytotoxicity in vitro. *Int J Hyperthermia.* 2002;18:307-15.

van England M, Ramakers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry.* 1996;24:131-9.

Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 2000;243:167-90.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.

Wainstein AJ, Belfort FA. Conduta para o melanoma cutâneo. *Rev Col Bras Cir.* 2004;31:204-14.

Walker SJ. Boron neutron capture therapy: principles and prospects. *Radiography.* 1998;4:211- 9.

Wallace KB, Starkov AA. Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000; 40:353-88.

Wang HE, Liao AH, Deng WP, Chang PF, Chen JC, Chen FD, Liu RS, Lee JS, Hwang JJ. Evaluation of 4-borono-2-¹⁸F-fluoro-L-phenylalanine- fructose as a probe for boron neutron capture therapy in a glioma-bearing rat model. *J Nucl Med.* 2004;45:302-8.

Watts KP, Fairchild RG, Slatkin D, Greenberg D, Packer S, Atkins HL, Hannon SJ. Melanin content of hamster tissues, human tissues and various melanomas. *Cancer Res.* 1981;41:467-72.

Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med.* 2004;36:838-49.

Wittig A, Sauerwein WA, Coderre JA. Mechanisms of transport of p-borono-phenylalanine through the cell membrane in vitro. *Radiat Res.* 2000;153:173-80.

Whiteside TL, Buckingham RB, Prince RK, Rodnan GP. Products of activated mononuclear cells modulate accumulation of collagen by normal dermal and scleroderma fibroblasts in culture. *J Lab Clin Med.* 1984;104:355-69.

Woiniak A, Drewa G, Woźniak B, Schachtschabel DO, Mila-Kierzenkowska C, Drewa T, Olszewska-Słonina D, Sopońska M. The effect of antitumor drugs on oxidative stress in B16 and S91 melanoma cells in vitro. *Med Sci Monit.* 2005;11:BR22-9.

Wolbers F, Engbers-Buijtenhuijs P, Haanen C, Vermes I. Apoptotic cell death kinetics in vitro depend on the cell types and the inducers used. *Apoptosis.* 2004;9:385-92.

Wood BL, Gibson DF, Tait JF. Increased phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow cytometric measurement and clinical associations. *Blood.* 1996;88:1873-80

World Health Organization. *Handbook for Reporting Results of Cancer Treatment.* 48a ed. Geneva: WHO; 1979.

Wunrau C, Schnaeker EM, Frey K, Pundt N, Wendholt D, Neugebauer K, Hansen U, Pap T, Dankbar B. Establishment of a matrix-associated transepithelial resistance invasion assay to precisely measure the invasive potential of synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2009;60:2606-11.

Yamamoto T, Nakai K, Matsumura A. Boron neutron capture therapy for glioblastoma. *Cancer Lett.* 2008;262:143–52.

Yáñez J, Vicente V, Alcaraz M, Castillo J, Benavente-García O, Canteras M, Teruel JÁ. Cytotoxicity and Antiproliferative Activities of Several Phenolic Compounds Against Three Melanocytes Cell Lines: Relationship Between Structure and Activity. *Nutr Cancer*. 2004;49:191–9.

Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*. 1995 Jan 27;80:285-91.

Yarnold J, Brotons MC. Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. *Radiother Oncol*. 2010;97:149-61.

Yoshida F, Matsumura A, Shibata Y, Yamamoto T, Nakauchi H, Okumura M, Nose T. Cell cycle dependence of boron uptake from two boron compounds used clinical neutron capture therapy. *Cancer Lett*. 2002;187:135-41.

Yoshimoto T, Morishima N, Mizoguchi I, Shimizu M, Nagai H, Oniki S, Oka M, Nishigori C, Mizuguchi J. Antiproliferative activity of IL-27 on melanoma. *J Immunol*. 2008;180:6527-35.

Yoshino K, Suzuki A, Mori Y, Kakihana H, Honda C, Mishima Y, Kobayashi T, Kanda K. Improvement of solubility of p-boronophenylalanine by complex formation with monosaccharides. *Strahlenther Onkol*. 1989;165:127-9.

Zarzov P, Decottignies A, Baldacci G, Nurse P. G(1)/S CDK is inhibited to restrain mitotic onset when DNA replication is blocked in fission yeast. *EMBO J*. 2002;21:3370-6.

Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L) *Cell*. 1996;87:619-28.

Zhang H, Hannon G, Beach D. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev*. 1994;8:1750-8.

Zouboulis CC, Makrantonaki E. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. *Clin Dermatol*. 2011;29:3-14.

Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62:971-88.

Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*. 1997;89:1121-32.

Antitumor potential induction and free radicals production in melanoma cells by Boron Neutron Capture Therapy

F. Faião-Flores^{a,b}, P.R.P. Coelho^c, R.O.R. Muniz^c, G.S. Souza^c, J. Arruda-Neto^{d,e}, Durvanei A. Maria^{a,*}

^a Biochemical and Biophysical Laboratory, Butantan Institute, 1500 Vital Brasil Avenue, São Paulo, Brazil

^b Faculty of Medicine, University of São Paulo, 455 Doutor Arnaldo Avenue, São Paulo, Brazil

^c Institute for Nuclear and Energy Research, 2242 Lineu Prestes Avenue, São Paulo, Brazil

^d Physics Institute, University of São Paulo, 187 Matão Street, São Paulo, Brazil

^e FESP, São Paulo Engineering School, 5520 Nove de Julho Avenue, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Available online 20 May 2011

Keywords:

Melanoma

BNCT

Free radicals production

ABSTRACT

Antiproliferative and oxidative damage effects occurring in Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) in normal fibroblasts and melanoma cell lines were analyzed.

Melanoma cells and normal fibroblasts were treated with different concentrations of Boronophenylalanine and irradiated with thermal neutron flux. The cellular viability and the oxidative stress were determined.

BNCT induced free radicals production and proliferative potential inhibition in melanoma cells. Therefore, this therapeutic technique could be considered efficient to inhibit growth of melanoma with minimal effects on normal tissues.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Melanoma, a highly invasive and metastatic tumor type, has presented increasing incidence and mortality in recent years (Jemal et al., 2009). It is the most aggressive form and causes the majority of deaths from skin cancers (Mendes et al., 2008).

The disappointing results that have come from chemotherapy show 5-year survival rates for treated patients ranging from only 3% to 14% (Wolchok and Saenger, 2007). For this reason, the appropriate systemic treatment for disseminated malignant melanoma is still controversial and no defined standard exists.

BNCT is a binary treatment modality based on the use of low energy neutrons able to produce a lethal damage only to cells loaded with a sufficient number of boron-10 nuclei, while a tolerable damage occurs in cells where less boron influx occurs (Menichetti et al., 2009). This technique involves selective accumulation of ¹⁰B carriers in tumor cells and subsequent irradiation with a neutron beam. High linear energy transfer alpha particles and recoiling ⁷Li nuclei are emitted during the capture of thermal neutrons by ¹⁰B nuclei and deposit their energy in a 5–9 μm range with a high relative biological effectiveness (Coderre and Morris, 1999). Thus, BNCT can be used to eliminate tumor cells whose precise

location may not be fully known to prevent residual cancer cells from causing tumors to recur (Chou et al., 2009).

BNCT has been carried out in the USA, Japan, Netherlands, Argentina, Italy, Finland and Sweden among others. However, there is no specialized center for this modality in Brazil.

In this work we studied the antitumor potential and free radicals production in melanoma and normal fibroblasts cell lines induced by BNCT.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines

Tumor cell lines of murine melanoma (B16F10), human melanoma (IPC-298, SKMEL-28 and MEWO), murine normal fibroblasts (L929) and human normal fibroblasts (FN1) were cultivated in 75 cm² flasks with RPMI-1640 (Cultilab) medium supplemented with 10% inactive fetal bovine serum (Cultilab), 2 mM of L-glutamine (Sigma Chemical Company) and antibiotic streptomycin 0.1 mg/ml (FontouraWyeth AS).

Adherent cell suspensions were obtained by 5 min treatment of the culture flasks with trypsin 0.2%, then inactivated in 10% fetal bovine serum (FBS) enriched medium. The non-adherent cells, centrifuged twice and resuspended in a FBS supplemented RPMI-1640 medium, at the concentration of 5 × 10⁵ cells/ml, were seeded in 96 wells plates and allowed to grow for 24 h.

* Corresponding author. Tel.: +55 11 37267222x2364; fax: +55 11 37261505.
E-mail address: durvaneiaugusto@yahoo.com.br (D.A. Maria).

2.2. Boronophenylalanine (BPA)

^{10}B -enriched (>99%) BPA was purchased from KatChem (Prague, Czech Republic) and converted to a fructose complex to increase its solubility (Coderre et al., 1994).

2.3. Cells treatment and irradiation

Tumor and normal cells were treated with different concentrations of BPA from 8.36 to 0.52 mg/ml – corresponding from 440 to 27.5 $\mu\text{g } ^{10}\text{B}/\text{ml}$. After 90 min (the best time of boron-10 uptake for these cells) they were irradiated for 120 min, using the IEA-R1 nuclear reactor operating at a power of 3.5 MW, at the Nuclear and Energetic Research Institute (IPEN, Brazil) facilities. The thermal neutron flux, epithermal neutron flux and fast neutron flux at the position was 2.3×10^8 , 4.6×10^6 and $3.5 \times 10^7 \text{ n/cm}^2 \text{ s}$, respectively. The gamma dose rate in air at the irradiation location was $4.2 \pm 0.2 \text{ Gy h}^{-1}$. Before the irradiation, the BPA enriched incubation medium was removed and the cells were washed in 0.9% saline solution. Another cell group was irradiated without BPA and was denominated Irradiated Control. Furthermore, one group received BPA without irradiation and was denominated BPA only. A non-irradiated and without BPA was also studied and was denominated Control Group.

Images of the control and treated cells were taken by a camera (Sony Cyber-shot 7.2 mega pixels) coupled to an optic inverted microscope (Carl Zeiss), magnified at $40\times$.

2.4. Cellular viability assay – MTT

Cellular viability of tumor and normal cell lines were determined using colorimetric methodology MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma), based on MTT reduction of formazan by living cells (Mosmann, 1983). The yellow tetrazolium salts (MTT) are reduced in metabolically active cells to form insoluble purple formazan crystals, which are solubilized by the addition of a detergent. The color was quantified by spectrophotometric means. For each cell type a linear relationship between cell number and absorbance is established, enabling accurate, straightforward quantification of changes in proliferation. The cellular viability was determined by MTT colorimetric assay for calculation of the 50% Inhibitory Concentration ($\text{IC}_{50\%}$).

2.5. Lipid peroxidation (TBARS)

The oxidative stress over the unsaturated lipids in cell membranes was evaluated by determining the amount of malondialdehyde (MDA), which is the final product of fatty-acid peroxidation, which reacts with thiobarbituric acid (TBA) to form a colored complex. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) are quantified by spectrophotometric determination (Ohkawa et al., 1979).

2.6. Statistical analysis

The amount of produced MDA is expressed by its mean value. The data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) and significant mean differences were determined using multiple comparisons by the TUKEY-KRAMER test at the $p < 0.05$ level.

3. Results and discussion

3.1. BNCT induces selective tumor cell death

The results show that BNCT induces cell death mainly in tumor cell lines (see Fig. 1). The $\text{IC}_{50\%}$ values of these lines ranged from 3.31 to 6.93 mg/ml (see Table 1). This effect does not show up in normal fibroblast lines, which exhibited $\text{IC}_{50\%}$ values up to 53.06 mg/ml. All the $\text{IC}_{50\%}$ values of melanoma cell lines were smaller than those in normal fibroblast cell lines. The $\text{IC}_{50\%}$ values were calculated by straight line fittings where all R^2 values were higher than 0.95, indicating positive data correlation.

The cellular viability ($\text{IC}_{50\%}$ value) of the Irradiated Control Group does not present difference in comparison to Control Group.

These data suggest that, owing to their selective BPA uptake capability, a smaller amount of ^{10}B concentration treatment, if compared to that required by normal cells, is necessary to induce tumor cell death. In this context, the binary characteristic of BNCT could be an attractive tool to improve response better than standard radiotherapy treatment, by delivering high doses to tumor while reducing normal tissue effects, due to the different boron uptake in normal and tumor cells (Blaumann et al., 2004).

Other *in vitro* studies report intracellular accumulation of BPA in melanoma cells with concentrations around 110 $\mu\text{g } ^{10}\text{B}/\text{ml}$ (Capala et al., 1996).

3.2. Free radicals production in tumor cells by BNCT

Lipidic peroxidation can be defined as a resultant cascade of biochemical events of the action of free radicals on cellular membrane unsaturated lipids, leading to destruction of its structure and cell death (Benzie, 1996). This method constitutes one of the main mechanisms of cellular damage leading to cytotoxicity.

BNCT induces production of free radicals in melanoma cell lines. In B16F10, IPC-298 and SKMEL-28 melanomas this effect was more relevant than in MEWO cells.

In B16F10 melanoma, free radicals production was 28 times higher than that in the control group, which points to intense cytotoxicity in skin tumor cells (see Table 2).

FN1 and L929 normal cell lines did not present elevated production of free radical amounts, thus resulting in toxicity decrease in cells adjacent to the tumor.

The cells irradiated without BPA (Irradiated Control) did not produce significant amount of free radicals in all the cell lines.

3.3. Morphologic aspects of tumor and normal cells after BNCT

After incubation with BPA and thermal neutrons irradiation, the cells were photographed for morphologic analysis. It is possible to observe debris and evident cell death in the highest concentrations of BPA in B16F10 cell line. In MEWO cells there are a lack of regular morphologic characteristics, and presence of cellular fragments in supernatant. Nuclear disorder was evident in IPC-298 cells treated by BNCT and leading to cell death. SKMEL-28 cells treated by BNCT presented apoptotic bodies and cytoskeleton disarray with debris formation. (see Fig. 2)

In the L929 cell line these effects were not present, because BNCT did not induce alterations both in the cell population, in the amount of these cells and in morphologic aspects, as well. The same effects were observed in the FN1 cell line, showing, however, only a few structural modifications as decreasing confluence only at the highest BPA concentration.

The FN1 cell line showed a slight increase in cell confluence at lower BPA concentrations in relation to the control group cells. This effect may be due to stimulation by repair mechanism

Fig. 1. BNCT cytotoxic activity on normal and neoplastic cells. The percentage of viable cells is plotted against the different BPA concentrations checked. The straight line equation and linear regression curve were calculated at Graph Pad Prism Instat 3.

Table 1

Comparison among the $IC_{50\%}$ values in tumor and normal cell lines treated by BNCT.

Cell lines	$IC_{50\%}$		
	BPA (mg/ml)	BPA (mM)	^{10}B ($\mu g/ml$)
B16F10	3.31	15.83	172
MEWO	6.93	33.15	360
IPC-298	5.68	27.17	295
SKMEL-28	3.71	17.75	192
L929	103.60	495.67	5387
FN1	53.06	253.86	2759

Table 2

Free radicals production following BNCT at the different BPA checked concentrations and after the only neutron irradiation.

Cell lines	Irradiated control	BPA (mg/ml)				
		8.36	4.18	2.09	1.045	0.52
B16F10	1.03	28.65	25.08	20.28	14.87	2.79
MEWO	2.50	11.04	10.50	10.11	7.11	5.79
IPC-298	1.02	14.19	14.07	11.28	10.34	9.31
SKMEL-28	1.02	20.08	15.03	13.84	13.59	11.90
L929	1.13	2.32	2.00	1.71	1.68	1.39
FN1	1.13	2.90	2.69	2.36	1.73	1.16

activation of cells that received low BPA concentrations, inducing the factor growth production and cell survival.

Data show that melanoma cells are much more damaged than normal cells by the BNCT treatment. This is most likely due to the higher ^{10}B levels accumulated by the neoplastic cells with respect to the normal fibroblasts.

The cells of the Irradiated Control presented few alterations and small cell damage, explaining the presence of these findings in normal fibroblasts. Furthermore, there were no significant changes in the parameters studied in normal and tumor cells that received only BPA without irradiation with thermal neutrons with respect to the Control group.

Cell Lines	Treatment Groups						
	Control	Irradiated Control	BPA (mg/mL)				
			8.36	4.18	2.09	1.04	0.52
B16F10
MEWO
IPC-298
SKMEL-28
L929
FN1

Fig. 2. Morphological aspects of cell lines treated with BNCT at all concentrations. Apoptotic bodies and confluence decrease are evident only in the BNCT treated group. Irradiated control is similar to Control group.

4. Conclusions

BNCT induces cell death mainly in tumor cells, while preserving normal tissues. In melanoma cells it produces high amounts of free radicals leading to tumor membrane degeneration and destruction. This therapy damages tumor cells selectively, with minimum effects on normal adjacent tissue.

Acknowledgments

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp 2008/56397-8).

References

- Benzie, I.F., 1996. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 47 (3), 233–261.
- Blaumann, H.R., Gonzalez, S.J., Longhino, J., SantaCruz, G.A., Calzetta Larriue, O.A., Bonomi, M.R., Roth, B.M., 2004. Boron neutron capture therapy of skin melanomas at the RA-6 reactor: a procedural approach to beam set up and performance evaluation for upcoming clinical trials. *Med. Phys.* 31 (1), 70–80.

- Capala, J., Makar, M.S., Coderre, J.A., 1996. Accumulation of boron in malignant and normal cells incubated in vitro with boronophenylalanine, mercaptoborane or boric acid. *Radiat. Res.* 146 (5), 554–560.
- Chou, F.I., Chung, H.P., Liu, H.M., Chi, C.W., Lui, W.Y., 2009. Suitability of boron carriers for BNCT: accumulation of boron in malignant and normal liver cells after treatment with BPA, BSH and BA. *Appl. Radiat. Isot.* 67 (Suppl. 7–8), S105–S108.
- Coderre, J.A., Button, T.M., Micca, P.L., Fisher, C.D., Nawrocky, M.M., Liu, H.B., 1994. Neutron capture therapy of the 9L rat gliosarcoma using the p-boronophenylalanine–fructose complex. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 30, 643–652.
- Coderre, J.A., Morris, G.M., 1999. The radiation biology of boron neutron capture therapy. *Radiat. Res.* 151 (1), 1–18.
- Jemal, S.K., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, M.J., 2009. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J. Clin.* 59 (4), 225–249.
- Mendes, P.F., Xander, P., Novaes e Brito, R.R., Mortara, R.A., Jasiulionis, M.G., Lopes, J.D., 2008. A cell surface 230 kDa protein from murine melanoma involved with tumor malignancy. *Cancer Lett.* 262 (2), 276–285.
- Menichetti, L., Gaetano, L., Zampolli, A., Del Turco, S., Ferrari, C., Bortolussi, S., Stella, S., Altieri, S., Salvadori, P.A., Cionini, L., 2009. In vitro neutron irradiation of glioma and endothelial cultured cells. *Appl. Radiat. Isot.* 67 (Suppl. 7–8), S336–S340.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65 (1–2), 55–63.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95 (2), 351–358.
- Wolchok, J.D., Saenger, Y.M., 2007. Current topics in melanoma. *Curr. Opin. Oncol.* 19 (2), 116–120.

Boron neutron capture therapy induces cell cycle arrest and DNA fragmentation in murine melanoma cells

F. Faião-Flores^{a,b}, P.R.P. Coelho^c, J. Arruda-Neto^{d,e}, Durvanei A. Maria^{a,*}

^a Biochemical and Biophysical Laboratory, Butantan Institute, 1500 Vital Brasil Avenue, São Paulo, Brazil

^b Faculty of Medicine, University of São Paulo, 455 Doutor Arnaldo Avenue, São Paulo, Brazil

^c Institute for Nuclear and Energy Research, 2242 Lineu Prestes Avenue, São Paulo, Brazil

^d Physics Institute, University of São Paulo, 187 Matão Street, São Paulo, Brazil

^e FESP, São Paulo Engineering School, 5520 Nove de Julho Avenue, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Available online 21 March 2011

Keywords:

Melanoma

BNCT

Rhodamine 123

Cell cycle

Cyclin D1

ABSTRACT

The melanoma is a highly lethal skin tumor, with a high incidence. Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) is a radiotherapy which combines Boron with thermal neutrons, constituting a binary system.

B16F10 melanoma and L929 fibroblasts were treated with Boronophenylalanine and irradiated with thermal neutron flux. The electric potential of mitochondrial membrane, cyclin D1 and caspase-3 markers were analyzed.

BNCT induced a cell death increase and cyclin D1 amount decreased only in B16F10 melanoma. Besides, there was not caspase-3 phosphorylation.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Malignant melanoma is the most aggressive form of cancer, which causes the majority of deaths from skin cancers. Although it represents less than 10% of skin cancers, it is responsible for more than 75% of skin cancer related deaths.

While the incidence of many solid tumors is gradually decreasing, the incidence of cutaneous melanoma is still on the rise, making this malignancy a significant clinical problem. Overall, melanoma accounts for 1%–3% of all malignant tumors and is increasing in incidence by 6%–7% each year (Bevona and Sober, 2002).

The prognosis of malignant melanoma is strongly related to the stage at which it is detected. Early stages of melanoma are, in majority of the cases, successfully treated with surgery, but advanced disease is generally refractory to conventional chemotherapy (Mendes et al., 2008).

Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) is a radiotherapy procedure where the efficacy depends upon the deposition of ^{10}B in tumor cells. When these cells are irradiated with thermal neutrons a capture nuclear reaction is induced in ^{10}B converting it into ^{11}B , which decays by emission of highly ionizing alpha particles, quite toxic to cells. This therapy essentially combines a radiosensitizer, boron (^{10}B), with a nonionizing radiation, thermal neutrons, constituting a binary system. An advantage of

a binary system would be that each component can be manipulated independently to maximize selectivity (Barth et al., 1992).

Once the melanoma takes up these ^{10}B compounds, thermal neutrons, which cause insignificant cell damage, are easily absorbed by nonradioactive ^{10}B , inducing the $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ reaction and releasing the high linear energy transfer (LET) particles to 14 μm melanoma cell diameter, destroying the tumor without damaging surrounding tissue (Mishima et al., 1989).

The radiation can kill the cell by apoptosis or mitotic catastrophe. This type of death results from DNA damage unrepaired (Dagrosa et al., 2008). The mechanisms that play a role in the tumor damage as produced by BNCT still are unknown. The aim of this paper is to find molecular mechanisms such as reduction of mitosis and tumor proliferation, as well as to suggest cell death pathways using BNCT treatment.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines

Tumor cell lines of murine melanoma (B16F10) and normal fibroblasts (L929) were cultivated in flasks of 75 cm^2 in RPMI-1640 medium supplemented with 10% inactive fetal bovine serum (SFB), 2 mM of L-glutamine and antibiotics streptomycin 0.1 mg/mL.

Adherent cells suspensions were obtained by treatment of the culture flasks with trypsin 0.2% for 5 min and then inactivated in SFB. The nonadherent cells were centrifuged twice, next resuspended in supplemented RPMI-1640 medium, and cell concentration was adjusted to 5×10^5 cells/mL in plates with 96 wells for 24 h.

* Corresponding author. Tel.: +55 11 37267222x2364; fax: +55 11 37261505.

E-mail addresses: durvaneiaugusto@yahoo.br,
durvaneiaugusto@yahoo.com.br (D.A. Maria).

2.2. Boronophenylalanine (BPA)

^{10}B -enriched (>99%) BPA was purchased from KatChem (Prague, Czech Republic) and converted to a fructose complex to increase its solubility (Corderre et al., 1994).

2.3. Cells treatment and irradiation

Tumor and normal cells were treated with 331 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of BPA in all experiments (this value is equivalent to 17 μg $^{10}\text{B}/\text{mL}$), corresponding to 10% of the Inhibitory Concentration ($\text{IC}_{50\%}$) for this compound in these cell lines (data found by our research group), and after 90 min (the best time of boron-10 uptake for these cells) they were irradiated during 30 min, using the IEA-R1 nuclear reactor operating in the potency of 3.5 MW, at the Nuclear and Energetic Research Institute (IPEN, Brazil) facilities. The thermal neutron flux, epithermal neutron flux and fast neutron flux at the position was 2.3×10^8 , 4.6×10^6 and 3.5×10^7 $\text{n}/\text{cm}^2\text{s}$, respectively. The gamma dose rate in air at the irradiation location was 4.2 ± 0.2 Gy h^{-1} . The control group was defined as cells without irradiation and without incubation with BPA compound. The culture medium with boron was removed before irradiation. Another cell group was irradiated without BPA in the same condition.

2.4. Assessment of mitochondrial membrane potential

Rhodamine 123 is a cationic lipophilic fluorescent chemical that accumulates specifically in mitochondria of living cells (Kennady et al., 2004). Then, this agent binds only in active metabolically mitochondria, resulting fluorescence emission.

After treatment by BNCT, the medium culture was removed and the adherent cells were trypsinized. B16F10 and L929 cells were pelleted by centrifugation at 1800 rpm for 10 min and resuspended in 5 μL of rhodamine 123 (5 mg/mL) for 30 min at room temperature, washed with phosphate-buffered-saline (PBS) and resuspended in FACS flow buffer. The samples were analyzed for fluorescence (FL-1 H detector) on a Becton Dickinson FACScan flow cytometer using the Cell Quest software.

2.5. Cell cycle phases analysis

After treatment by BNCT, the medium culture was removed and the adherent cells trypsinized. B16F10 and L929 cells were pelleted by centrifugation at 1800 rpm for 10 mins and washed in cold solution of PBS, fixed in 70% cold ethanol and stored at -20°C . Before analysis, cells were washed in PBS, treated with

50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A and incubated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide (PI) for at least 1 hour in the dark at 4°C . The samples were analyzed for fluorescence (FL-2 H detector) on a Becton Dickinson FACScan flow cytometer using the Cell Quest software.

2.6. Cell cycle progression analysis by cyclin D1 quantification

The type D cyclins (with their partner CDKs) form a regulatory unit of the G1/S transition that is frequently impaired in neoplasia (Li et al., 2006).

After treatment by BNCT, the medium culture was removed and the adherent cells trypsinized. B16F10 and L929 cells were pelleted by centrifugation at 1800 rpm for 10 minutes and incubated with 1 μg of specific anti-cyclin D1 antibody (Santa Cruz, USA) and 10 μL of Triton X-100 (0.1%) for 1 h at 4°C . After that, the cells were resuspended in FACS flow buffer. The samples were analyzed for fluorescence (FL-1H detector) on a Becton Dickinson FACScan flow cytometer using the Cell Quest software.

2.7. Caspase-3 activity

Caspases represent a family of cysteine proteases, which are common downstream effectors of apoptosis (Chen et al., 2001).

After treatment by BNCT, the medium culture was removed and the adherent cells trypsinized. B16F10 and L929 cells were pelleted by centrifugation at 1800 rpm for 10 min and incubated with 1 μg of specific anti-caspase-3 PE antibody (Santa Cruz, USA) and 10 μL of Triton X-100 (0.1%) for 1 h at 4°C . After that, the cells were resuspended in FACS flow buffer. The samples were analyzed for fluorescence (FL-2 H detector) on a Becton Dickinson FACScan flow cytometer using the Cell Quest software.

2.8. Statistical analysis

The values are expressed as mean $\pm$ standard deviation. The data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) and significant mean differences were determined using multiple comparisons by the TUKEY-KRAMER test at the $p < 0.05$ level.

3. Results and discussion

3.1. Mitochondrial potential decrease by BNCT

BNCT induced decrease of mitochondrial potential causing cell death in B16F10 murine melanoma. The more rhodamine is caught

Fig. 1. Representative overlaps of fluorescence intensity from B16F10 (A) and L929 (B) cell populations treated by BNCT in comparison to control group.

Fig. 2. Cell cycle phases distribution in B16F10 (A) and L929 cells (B), both treated by BNCT, plus the control group in each case.

Table 1

Comparison among percentage values of active/inactive mitochondria, viable/inviable cells (rhodamine 123) and positive/negative marker (cyclin D1 and caspase-3) of BNCT and control.

	B16F10				L929			
	Active/viable		Inactive/inviable		Active/viable		Inactive/inviable	
	Control	BNCT	Control	BNCT	Control	BNCT	Control	BNCT
	Positive		Negative		Positive		Negative	
Rhodamine 123	70.0	5.1	30.0	94.9	54.1	47.0	45.9	53.0
Cyclin D1	14.3	3.1	85.7	96.9	17.3	19.4	82.7	80.6
Caspase-3	15.4	15.5	84.6	84.5	0.2	0.5	99.8	99.5

the higher is the fluorescence emission, and consequently the higher is the amount of living cells with active mitochondria. The electric potential in B16F10 murine melanoma was significantly reduced, while in L929 murine normal fibroblasts this effect was not observed. The L929 cell line remained without effects causing damages toward death (Fig. 1). The mitochondrial potential is reduced when the energetic metabolism is breached during cell death (Fuller and Arriaga, 2003).

3.2. Cell cycle arrest by decrease of cyclin D1 and cell death by DNA fragmentation

Dysregulation of the cell cycle in conjunction with other signaling pathway aberrations seems to play a role in therapeutic resistance (Smalley et al., 2008). BNCT treatment reduced the preparation for proliferation phase (G0/G1) and mitosis (G2/M). This was proven by the reduction of cyclin D1, one of the markers of the G1 proliferation phase. Moreover, BNCT increased the amount of fragmented DNA in melanoma cells, without affecting normal cells (Fig. 2).

3.3. Cell death induction with caspase-3 absence

DNA fragmentation in B16F10 melanoma was extremely significant, but death of these cells was not occurring by means of intrinsic apoptosis, because the increase of phosphorylated caspase-3 did not take place. In L929 cells this effect was not found too. These findings suggest that the cell death should be of another type, independently from direct phosphorylation of caspase-3 as e.g. necrosis or anoikis (Dagrosa et al., 2008).

It is shown in Table 1 all data for rhodamine 123, cyclin D1 and phosphorylated caspase-3 with BNCT treatment and control groups.

4. Conclusions

The findings of this study suggest that BNCT works by means of cell cycle arrest decreasing the amount of cyclin D1 in melanoma cells, without affecting normal cells. Additionally, we observed that cell quantities in the G0/G1 and G2/M phases decreased, with a significant increase in the DNA fragmented cells quantity.

Moreover, cell death does not occur by activation of caspase-3, indicating that this is accomplished by other types of cell death like necrosis, autophagy or anoikis.

All experiments were performed with a group exposed only to neutron irradiation without BPA. The results were not significant in any of the experiment and for this reason these data were not included.

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp 2008/56397-8).

References

- Barth, R.F., Soloway, A.H., Fairchild, R.G., Brugger, R.M., 1992. Boron neutron capture therapy for cancer. Realities and prospects. *Cancer* 70 (12), 2995–3007.
- Bevona, C., Sober, A.J., 2002. Melanoma incidence trends. *Dermatol. Clin.* 20 (4), 589–595.
- Chen, Y., Kramer, D.L., Diegelman, P., Vujcic, S., Porter, C.W., 2001. Apoptotic signaling in polyamine analogue-treated SK-MEL-28 human melanoma cells. *Cancer Res.* 61 (17), 6437–6444.
- Coderre, J.A., Button, T.M., Micca, P.L., Fisher, C.D., Nawrocky, M.M., Liu, H.B., 1994. Neutron capture therapy of the 9 L rat gliosarcoma using the p-boronophenylalanine-fructose complex. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 30, 643–652.
- Dagrosa, M.A., Crivello, M., Thorp, S., Perona, M., Pozzi, E., Casal, M., Cabrini, R., Kahl, S., Juvenal, G., Pisarev, M., 2008. Radiobiological studies in a human cell line of undifferentiated thyroid cancer (UTC) for BNCT. In: Zonta, A., Altieri, S., Roveda, L., Barth, R. (Eds.), A new option against cancer, Proceedings of 13th International Congress on Neutron Capture Therapy. Florence, Italy, pp. 337–340. In: Zonta, A., Altieri, S., Roveda, L., Barth, R. (Eds.), A new option against cancer, Proceedings of 13th International Congress on Neutron Capture Therapy. Florence, Italy, pp. 337–340.
- Fuller, K.M., Arriaga, E.A., 2003. Advances in the analysis of single mitochondria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 (1), 35–41.
- Kennedy, P.K., Ormerod, M.G., Singh, S., Pande, G., 2004. Variation of mitochondrial size during the cell cycle: a multiparameter flow cytometric and microscopic study. *Cytometry A* 62 (2), 97–108.
- Li, W., Sanki, A., Karim, R.Z., Thompson, J.F., Soon Lee, C., Zhuang, L., McCarthy, S.W., Scolyer, R.A., 2006. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology* 38 (4), 287–301.
- Mendes, P.F., Xander, P., Novaes e Brito, R.R., Mortara, R.A., Jasiulionis, M.G., Lopes, J.D., 2008. A cell surface 230 kDa protein from murine melanoma involved with tumor malignancy. *Cancer Lett.* 262 (2), 276–285.
- Mishima, Y., Ichihashi, M., Hatta, S., Honda, C., Yamamura, K., Nakagawa, T., 1989. New thermal neutron capture therapy for malignant melanoma: melanogenesis-seeking 10B molecule-melanoma cell interaction from in vitro to first clinical trial. *Pigment Cell Res.* 2 (4), 226–234.
- Smalley, K.S., Contractor, R., Nguyen, T.K., Xiao, M., Edward, R., Muthusamy, V., King, A.J., Flaherty, K.T., Bosenberg, M., Herlyn, M., Nathanson, K.L., 2008. Identification of a novel subgroup of melanomas with KIT/cyclin-dependent kinase-4 overexpression. *Cancer Res.* 68 (14), 5743–5752.

Boron uptake in normal melanocytes and melanoma cells and boron biodistribution study in mice bearing B16F10 melanoma for boron neutron capture therapy

Fernanda Faião-Flores · Paulo Rogério Pinto Coelho · João Dias Toledo Arruda-Neto · Maria Aparecida Pires Camillo · Silvyta Stuchi Maria-Engler · Rose Eli Grassi Rici · Jorge Eduardo Souza Sarkis · Durvanei Augusto Maria

Received: 17 November 2011 / Accepted: 31 March 2012 / Published online: 11 April 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Information on ^{10}B distribution in normal tissues is crucial to any further development of boron neutron capture therapy (BNCT). The goal of this study was to investigate the in vitro and in vivo boron biodistribution in B16F10 murine melanoma and normal tissues as a model for human melanoma treatment by a simple and rapid colorimetric method, which was validated by HR-ICP-MS. The B16F10 melanoma cell line showed higher melanin content than human melanocytes, demonstrating a greater potential for boronophenylalanine

uptake. The melanocytes showed a moderate viability decrease in the first few minutes after BNCT application, stabilizing after 75 min, whereas the B16F10 melanoma showed the greatest intracellular boron concentration at 150 min after application, indicating a different boron uptake of melanoma cells compared to normal melanocytes. Moreover, at this time, the increase in boron uptake in melanoma cells was approximately 1.6 times higher than that in normal melanocytes. The ^{10}B concentration in the blood of mice bearing B16F10 melanoma increased until 90 min after BNCT application and then decreased after 120 min, and remained low until the 240th minute. On the other hand, the ^{10}B concentration in tumors was increased from 90 min and maximal at 150 min after application, thus confirming the in vitro results. Therefore, the present in vitro and in vivo study of ^{10}B uptake in normal and tumor cells revealed important data that could enable BNCT to be possibly used as a treatment for melanoma, a chemoresistant cancer associated with high mortality.

F. Faião-Flores (✉) · D. A. Maria (✉)
Laboratory of Biochemistry and Biophysics, Butantan Institute,
1500 Vital Brasil Avenue, São Paulo, SP 05503-900, Brazil
e-mail: fernandafaiiao@usp.br

D. A. Maria
e-mail: durvanei@usp.br

F. Faião-Flores
Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo,
SP, Brazil

P. R. P. Coelho · M. A. P. Camillo · J. E. S. Sarkis
Institute for Nuclear and Energy Research, São Paulo, SP, Brazil

J. D. T. Arruda-Neto
Physics Institute, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

J. D. T. Arruda-Neto
CEPESq/Unifitalo—Italy-Brazilian University Center,
São Paulo, SP, Brazil

S. S. Maria-Engler
Department of Clinical Chemistry and Toxicology,
School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo,
São Paulo, SP, Brazil

R. E. G. Rici
Faculty of the Veterinary Medicine and Zootechny,
Department of Surgery, University of São Paulo,
São Paulo, SP, Brazil

Keywords Boron neutron capture therapy · ^{10}B measurement · Boronophenylalanine · B16F10 melanoma · C57Bl/6J mice

Introduction

Melanoma, a highly invasive and metastatic tumor type, has shown an increasing incidence and mortality in recent years (Jemal et al. 2009). It is the most aggressive skin cancer and causes the majority of deaths among skin cancer cases (Mendes et al. 2008). Melanoma is currently being cured by surgical excision if detected early. However, melanoma with distant metastasis is still incurable (Larrosa et al. 2003).

Boron neutron capture therapy (BNCT) is a binary treatment modality involving the selective accumulation of

^{10}B carriers in tumors followed by irradiation with a thermal or epithermal neutron beam (Trivillin et al. 2008). High linear energy transfer (LET) alpha particles and recoiling ^7Li nuclei are emitted during the capture of thermal neutrons by ^{10}B nuclei and deposit their energy with a high relative biological effectiveness in biological material (Coderre and Morris 1999).

The basic idea of BNCT is that if ^{10}B is taken up selectively by tumor tissue, then capture reactions will occur preferentially in tumor cells, and the resulting high LET particles will travel only a very short distance (corresponding roughly to the size of a cell/cell nucleus) (Trivillin et al. 2008). BNCT would, thus, potentially target neoplastic tissue selectively (Coderre et al. 1990).

Neutron irradiations should be performed at the point in time after the boron compound is administered, when there is both a high absolute boron concentration in the tumor and high tumor/normal tissue and tumor/blood ratios (Kreimann et al. 2003). Clinical trials of BNCT for the treatment of melanoma using *L*-para-boronophenylalanine (BPA) as the boron compound have been performed (Fukuda et al. 1994; Menéndez et al. 2009) and are currently in progress in Finland, Sweden, Japan, Argentina, Italia and others. Experimental studies have been carried out employing a variety of experimental models based on the implantation of tumor cells in normal tissue (Barth et al. 1994; Coderre et al. 1991).

Despite numerous investigations, inconclusive information is available regarding ^{10}B metabolism and uptake in normal tissues. Note that information on the ^{10}B distribution in normal tissues is crucial for any further development of BNCT in a broadened spectrum of indications where the dose delivered to normal tissue is a limiting factor for the therapy. In-depth knowledge on the boron bioavailability in normal tissues may offer another starting point for treatment optimization, because it is an important parameter that influences normal tissue injury (Wittig et al. 2009). Cho and coworkers already showed a BPA biodistribution in C57BL/6J mice bearing B16F10 melanoma by prompt gamma analysis (Cho et al. 2007). However, their study included only few data about the curve for BPA biodistribution in this melanoma model, and there was no determination of the best time for BPA administration before thermal neutron irradiation.

In this study, the boron biodistribution in B16F10 murine melanoma and normal tissues as a model for human melanoma treatment with BNCT was investigated in detail.

Materials and methods

Cell lines

A tumor cell line of murine melanoma (B16F10) was cultivated in 75-cm² flasks with RPMI-1640 (Cultilab)

medium supplemented with 10 % inactive fetal bovine serum (Cultilab), 2 mM of L-glutamine (Sigma Chemical Company) and 0.1 mg/mL streptomycin (FontouraWyeth AS). A human primary culture of melanocytes isolated from foreskin was cultivated with 254CF medium (Life Sciences®) supplemented with 10 % inactive fetal bovine serum HMGS (Life Sciences®) and 0.1 mg/mL streptomycin (FontouraWyeth AS), as previously described (Fernandez et al. 2005). Cell suspensions were obtained from adherent cells by a 5-min treatment with trypsin 0.2 % and subsequent inactivation of trypsin with 10 % fetal bovine serum (FBS)-enriched medium. The nonadherent cells were centrifuged twice, resuspended in medium, then seeded in plates and allowed to grow for 24 h.

Boronophenylalanine (BPA)

^{10}B -enriched (> 99 %) BPA (molecular weight = 209.01 g) was purchased from KatChem and converted to a fructose 1:1 complex to increase its solubility (Coderre et al. 1994).

Melanin content assay

The content of melanin was determined according to the procedure described by Meyskens (Meyskens 1981) and modified by Zhao (Zhao et al. 2003). Melanocytes and B16F10 melanoma cells were plated in different flasks containing 10 mL of RPMI 1640 medium. After 24 h, each cell type was removed from the dish by 0.25 % trypsin, and the cells were counted and adjusted to a concentration of 10^3 cells/mL. After centrifugation for 10 min, the cells were washed twice with phosphate-buffered saline (pH 7.0), and 10^3 cells were dissolved in 1.0 mL of 1 N NaOH and 10 % dimethyl sulfoxide for 30 min. Thereafter, the absorbance at 470 nm was recorded.

Cell treatment and BNCT irradiation

Melanocytes and B16F10 melanoma cells were seeded in 96-well plates at a concentration of 10^5 cells/mL and allowed to grow for 24 h. They were then treated with BPA at a concentration of 4.18 mg/mL, corresponding to 220 μg ^{10}B /mL. After different incubation time intervals (from 15 to 180 min), the cells were irradiated at the BNCT research facility of the Nuclear and Energetic Research Institute (IPEN, Brazil) (Coelho et al. 2002) for a period of 10 min, using the IEA-R1 nuclear reactor operating at a power of 3.5 MW. The thermal neutron flux, epithermal neutron flux and fast neutron flux at the irradiation position were $(2.31 \pm 0.03) \times 10^8$, $(4.60 \pm 0.10) \times 10^6$ and $(3.50 \pm 0.10) \times 10^7$ n/cm²s, respectively. The gamma dose rate in air at the irradiation site was 3.50 ± 0.80 Gy. Before

irradiation, the BPA-enriched incubation medium was removed, and the cells were washed in 0.9 % saline solution. A sample that was not irradiated or treated with BPA was also studied, representing the “control group” (time 0). Images of the control and treated cells were taken using a camera (Sony Cyber-shot 7.2 megapixels) coupled to an optic inverted microscope (Carl Zeiss), magnified at $40\times$. Another cell group was irradiated without BPA (beam only) and was termed the “irradiated control.”

Cellular viability assay—MTT

The cellular viability of B16F10 melanoma and melanocytes treated with BNCT was determined using colorimetric methodology, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma), which is based on MTT reduction of formazan by living cells (Mosmann 1983). MTT is reduced in metabolically active cells to form insoluble purple formazan crystals, which are solubilized by the addition of a detergent. The color is then quantified by spectrophotometric means. For each cell type, a linear relationship between cell number and absorbance is established, enabling accurate, straightforward quantification of changes in proliferation. This colorimetric assay is well established; it is widely used and described in several papers (Kamida et al. 2008).

Cell treatment for boron concentration analysis

Melanocytes and B16F10 melanoma cells were seeded in dishes at a concentration of 10^6 cells/mL and were allowed to grow for 24 h. After this period, they were treated with BPA at a concentration of 4.18 mg/mL, corresponding to $220\text{ }\mu\text{g }^{10}\text{B/mL}$. The medium was then collected at times ranging from 0 to 180 min, and the cells were removed from the dish with 0.25 % trypsin. These samples were stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ until later analysis.

In vivo biodistribution for boron concentration analysis

All animal experiments were carried out according to the regulations of the Ethical Committee for Animal Research at the Butantan Institute (479/09). C57Bl/6J female mice (18–23 g) were divided into ten groups of five mice each. The animals were maintained with diet and water ad libitum. The B16F10 melanoma cells ($10^4/0.1\text{ mL}$ of culture medium) were inoculated subcutaneously in the dorsal skin of C57Bl/6J mice. Forty days after inoculation with tumor cells, the mice received BPA (750 mg/kg body mass intraperitoneally (i.p.)). Samples were taken from 0 to 240 min after BPA administration (for colorimetric assay). Blood samples were drawn from submandibular vein. The

mice were euthanized by cervical dislocation and then necropsied. The following samples were excised: tumor, adjacent normal skin (0.1 cm^2), and several organs such as liver, kidney, intestine, spleen, brain, heart and lung after different time periods.

Sample preparation by boron concentration analysis

Tissue samples were taken, cleaned out from blood with saline solution, weighed and digested by 1:1 HNO_3 and H_2O_2 solutions. All samples were exposed to ultrasound for 60 min at $80\text{ }^\circ\text{C}$.

Boron concentration analysis by colorimetric method

The samples were placed inside quartz tubes with 1 mL of water and 0.5 mL of 2 % (w/v) aqueous solution of KMnO_4 . The mixture was incubated for 1 h at $95\text{ }^\circ\text{C}$ and then cooled to room temperature. The samples were then treated with 2 mL of 10% (v/v) 2-ethyl-1,3-hexanediol in CHCl_3 and shaken for 3 min. The aqueous phase containing precipitated MnO_2 was removed by aspiration. An aqueous solution of curcumin (1.0 mL) and 0.3 mL of H_2SO_4 were then added to 0.5 mL of CHCl_3 extract. The mixture was allowed to stand for 15 min at room temperature, and then, 50 mL of 95 % (v/v) EtOH was added. The color of this solution, ranging from orange-yellow to red, reveals the amount of boron present (Ikeuchi and Amano 1978). The absorbance at 555 nm was read using a Thermo Scientific Genesys 6[®] spectrophotometer. The calibration curve was linear from 0.2 to $440\text{ }\mu\text{g}$ of boron in the BPA standard solution.

Boron concentration analysis by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR-ICP-MS) technique

To confirm and validate the results from boron concentration analysis by colorimetric assay, some samples were sorted out for boron concentration analysis by HR-ICP-MS. These samples corresponded to 0 min (mice bearing B16F10 melanoma tumor without BPA injection—control group) and BPA post-injection time of 150 min.

All HR-ICP-MS measurements were taken in a HR-ICP-MS (Element 1, Thermo Finnigan MAT GmbH, Bremen, Germany). The Element 1 is equipped with a self-aspirating microconcentric nebulizer, a Scott-type spray chamber, a Fassel torch and a 27-MHz generator. Instrumental settings and optimized measurement parameters for boron isotopes are given in Table 1. Isotopic measurements were taken using only electric scanning (E-scanning) and at a medium-resolution setting ($R = 3,500$).

Table 1 HR-ICP-MS instrument settings and scanning conditions

Sample introduction system and instrumental operating conditions	
Nebulizer (mL/min)	1
Spray chamber	Scott-spray chamber
Sampling cone	Nickel
Skimmer cone	Nickel
RF power (W)	1,200
Plasma gas flow rate (L/min)	16
Auxiliary gas flow rate (L/min)	0.9
Nebulizer gas flow rate (L/min)	1
Measurement conditions	
Resolution (10 % valley definition)	Medium, $M/\Delta M = 3,500$
Acquisition mode	E-scan
Magnet setting time (s)	0.001
Mass range (amu)	
^{10}B	10.010–10.012
^{11}B	11.006–11.012
Search window (%)	120
Integration window (%)	60
Sample time (s)	0.02
Numbers of channels per peak	30
Segment duration (s)	2
Detection mode	Ion counting
Number of replicates	15
Dead time correction (ns)	10

Scanning electron microscopy

B16F10 cells and melanocytes (at 150 min, the time point corresponding to the main reduction in B16F10 viability) were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) twice and fixed with 3 % glutaraldehyde in PBS incubating overnight at room temperature. After washing with PBS thrice again, the samples were fixed with 1 % osmium tetroxide (pH 7.4) at 4 °C for 1 h. The samples were dehydrated, dried in a critical point drier and gold sputtered. Scanning electron microscopic (SEM) images were then taken on a LEO 453 VP, Electron Microscopy.

Statistical analysis

The data were analyzed using the unpaired *t* test, followed by Welch's *t* test with *p* values less than 0.0001 considered extremely significant. These analysis methods were used to compare the melanin synthesis between the two cell types.

Results

In vitro selective boron uptake

Both cell types were subjected to boron quantification analysis. A standard curve was obtained using BPA, and an

Fig. 1 Standard curve used for boron concentration determination in melanocytes and melanoma cells and tissues of mice bearing B16F10 melanoma

analysis method in tissues and cells was developed (Fig. 1). In the boron concentration analysis, the uptake in melanocytes was similar in the first minutes of incubation (15–60 min). From 75 min onward, the same intracellular boron concentration was maintained in the melanocytes (Fig. 2a), whereas the B16F10 melanoma cells were observed to show an increased boron uptake at the same time (Fig. 2b). The greatest intracellular boron concentration in tumor cells was obtained at 150 min, showing boron uptake selectivity greater in B16F10 melanoma cells when compared to normal melanocytes. Moreover, at 150 min, there was roughly 160 µg per 10^6 cells of boron uptake in B16F10 melanoma cells, whereas the highest boron uptake by melanocytes was only 100 µg per 10^6 cells at 60 min of incubation (an approximate increase of 1.6 times). In melanoma cells, there is an increase in boron uptake; therefore, there is a decrease in boron in supernatant. In contrast, in melanocytes cells, there is not much uptake, so there is a constant boron concentration in supernatant.

Increased cytotoxicity and higher melanin production in B16F10 melanoma cells

Upon confirming the boron uptake data in both cell types, melanocytes showed a viability decrease in the first minutes (15 min) and then an increase from 15 min onward, keeping a constant increase rate up to 180 min. In contrast, melanoma cells exhibited a stable viability decrease (between 15 and 135 min), with a cytotoxicity peak at 150 min (viability decline of approximately 40 %). There was a steady increase from this point on, indicating boron elimination with a consequent reduction in BNCT effectiveness (Fig. 3a). The irradiated control group did not show any significant differences compared to the control group (without BPA and without irradiation).

Fig. 2 Boron concentration in melanocytes and melanoma cells. **a** Boron concentration in melanocytes with BPA incubation from 0 to 180 min in cells and cell supernatants. **b** Boron concentration in

melanoma with BPA incubation from 0 to 180 min in cells and cell supernatants. Each point represents mean $\pm$ standard deviation of the results from three experiments performed in triplicate

Fig. 3 **a** Melanocytes and melanoma cell viability after BPA incubation from 0 to 180 min and thermal neutron irradiation. **b** Melanin content in melanocytes and melanoma cells. Each point represents mean $\pm$ standard deviation of the results from three experiments performed in triplicate

These differences in boron uptake with a consequent reduction in the viability of the tumor cells could be related to the amount of melanin produced by B16F10 melanoma cells, which showed approximately four times more melanin synthesis compared to normal melanocytes (Fig. 3b).

These results were confirmed by analysis of morphological changes of the cell population distribution in each time period (Fig. 4). Melanocytes were observed to have some debris and had a density population similar to the control group for all times. However, B16F10 melanoma cells had a viability decrease, with a sharp peak at 150 min, as it is observed in Fig. 3a, thus confirming the MTT results and indicating that cells with more melanin are more affected by BNCT.

Cells analysis using scanning electron microscopy in the best period of BNCT application

After 150 min, the B16F10 melanoma cells showed the greatest decrease in cell viability, indicating the best point of administration of BPA followed by irradiation with thermal neutrons. At this time point, images were taken using scanning electron microscopy of these cells and the normal melanocytes cell line to make a comparison. It can be observed that the B16F10 melanoma cells in the control group (Fig. 5a) were intact, with the preservation of normal cell contours and the presence of mitotic figures. In contrast, B16F10 melanoma cells treated with BNCT (Fig. 5b) showed apoptotic bodies with degradation of the extracellular matrix. Melanocytes in the control group (Fig. 5c) showed the cytoplasmic morphology characteristic of this cell line, without the presence of cytoplasmic vacuolization. Melanocytes treated with BNCT (Fig. 5d) also showed preserved normal cell limits with few cellular changes. Thus, it can be concluded that the best period for irradiation with thermal neutrons is after 150 min of BPA incubation, to have the most deleterious effect on melanoma cells, with minimal side effects in normal cells.

Fig. 4 Photomicrographs of melanocytes and melanoma cells after BPA incubation from 0 to 180 min and thermal neutron irradiation corresponding to Fig. 2a. Images of the control and treated cells were taken by a camera (Sony Cyber-shot 7.2 mega pixels) coupled to an optic inverted microscope (Carl Zeiss), magnified at 40×

In vivo boron biodistribution

To analyze the boron concentration within organs, tumors and blood, we used the standard curve (Fig. 1), with boron concentrations ranging from 0 to 300 $\mu\text{g/mL}$ of selected samples. During the first minutes after BPA administration, a significant increase in the boron concentration in blood (between 15 and 90 min) was observed, followed by a sharp drop at 120 min. At 90 min and later, a high intra-tumoral boron concentration increase was observed, peaking after 150 min at approximately 100 ppm. A small amount of boron (approximately 35 μg per 10^6 cells) in the tumor, with no significant amount observed in the blood, was also found in the last measured period (Fig. 6a). In terms of the ratio between the amount of boron in blood and in the tumor, after 150 min of BPA administration, which is quite adequate for this type of treatment, there was approximately 10 times more boron in the tumor than in blood (Fig. 6b).

Boron biodistribution in other organs was also studied, indicating that liver, heart and lung do not take up boron from BPA. Other organs such as spleen and brain captured minimal quantities of this element compound (Table 2). Additionally, there was an increase in boron in the kidney

after 210 min and in the intestine after 240 min due to its clearance. Another relevant finding was the low boron uptake in normal skin adjacent to the tumor, indicating a higher uptake by B16F10 melanoma cells.

Validation of the colorimetric method by comparison with HR-ICP-MS

The mice of the control group (time 0) and mice that received BPA 150 min before euthanasia were analyzed, in order to compare the colorimetric and HR-ICP-MS methods. All values obtained by the colorimetric method were consistent with those obtained by HR-ICP-MS (Table 3); that is, differences were within the error bars of both methods. Therefore, the colorimetric method was validated.

Discussion

Malignant melanoma is the most aggressive form of cancer, causing the majority of deaths among skin cancers. Although representing less than 10 % of skin cancers, it is responsible for more than 75 % of skin cancer-related

Fig. 5 Photomicrographs of scanning electron microscopy of B16F10 melanoma cells and melanocytes. **a** Cells from the control group of B16F10 melanoma cells. **b** B16F10 melanoma cells treated

with thermal neutrons at 150 min after BPA incubation. **c** Normal melanocytes of the control group. **d** Normal melanocytes treated with thermal neutrons at 150 min after BPA incubation

deaths. The notorious resistance of malignant melanoma to all current chemotherapeutic regimens remains a major obstacle for its successful treatment (Gogas et al. 2009). Common treatments for malignant melanoma involve a combination of therapies including surgical removal, chemotherapy and radiotherapy. However, the reported five-year survival rate of melanoma is still discouraging due to its chemoresistance and metastasis. In particular, the most commonly utilized chemotherapeutic regimens have been tried without significantly increasing overall survival rates among metastatic melanoma patients (Jiang et al. 2010).

The next step in optimizing radiotherapy might be achieved by targeting the radiation in a way that, in principle, it is able to selectively kill tumor cells while sparing the surrounding normal tissues. One such treatment option may be BNCT, which, because of the limited spatial distribution of its effects, produces a highly selective delivery of radiation (Wittig et al. 2009). Therefore, if ^{10}B can be delivered selectively to tumor cells, then the short range of the charged particles produced in BNCT would offer the potential for targeting radiation to individual tumor cells

with high biological efficacy (Coderre and Morris 1999; Sauerwein 1993; Barth 2003; Yamamoto et al. 2008).

In BNCT, a flux of neutrons of appropriate energy is set to react with ^{10}B isotopes that have accumulated in tumor cells. Selective accumulation is achieved by administering BPA enriched in ^{10}B . This step is followed by bombardment with a thermal neutron beam, generated in a nuclear reactor, which induces an (n, α) reaction with ^7Li and ^4He (α -particle) as products. As the mean free paths of both particles are of the same order as the size of the tumor cells, these are destroyed without the normal tissue suffering any significant damage (Gautier et al. 2007).

A comprehensive review of the methods for analysis of clinical and biological samples for boron has been provided (Probst 1999), and the colorimetric assay for boron concentration analysis is favored because it is a simple and quick method for quantifying boron in the samples to be used for BNCT.

The B16F10 cells may offer an approach to investigate the properties of malignant cells. This cell line has been studied since 1975 and has reliable characteristics that are

Fig. 6 In vivo boron concentrations in tumor, blood and normal tissues. **a** Boron concentration in tumor and blood after BPA administration from 0 to 240 min. **b** Tumor/blood concentration ratio of boron after BPA administration from 0 to 240 min. Each point represents mean $\pm$ standard deviation of the results from three experiments performed in triplicate

similar to human melanomas (Fidler 1975). Thus, this model has been chosen here to study the in vitro ^{10}B uptake and the in vivo uptake model in C57Bl/6J mice.

BPA is an analog of an essential amino acid phenylalanine and is actively taken up in cells not only as an amino acid analog for protein synthesis, but also as a tyrosine analog for melanogenesis. Due to these properties, BPA has been clinically utilized for malignant melanoma (Mishima et al. 1989). The B16F10 melanoma cell line showed approximately four times more melanin than normal melanocytes (Fig. 3b), demonstrating a greater potential for BPA uptake (Fig. 2b) in comparison with the lower ^{10}B uptake by normal melanocytes (Fig. 2a). In B16F10 cells, the BPA uptake increased after 75 min of incubation.

The analysis of the boron content in the supernatant is also important for confirming the amount of boron uptake as function of time (Probst 1999). For instance, the results in Fig. 2 indicate that the amount of ^{10}B decreases in the

Table 2 Boron concentration in tumor, blood and normal tissues after BPA administration from 0–240 min (μg per 10^6 cells)

Tissues	Time (min)									
	0	15	30	60	90	120	150	180	210	240
Liver	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0
Kidney	9.2 $\pm$ 0.1	9.2 $\pm$ 0.1	10.1 $\pm$ 0.2	12.9 $\pm$ 0.1	12.9 $\pm$ 0.1	12.8 $\pm$ 0.2	13.2 $\pm$ 0.3	13.4 $\pm$ 0.3	27.8 $\pm$ 1.0	30.3 $\pm$ 2.3
Intestine	0.7 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.3	8.9 $\pm$ 1.2	19.2 $\pm$ 2.4
Skin	3.5 $\pm$ 0.5	3.5 $\pm$ 0.4	3.7 $\pm$ 0.4	3.8 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.3	4.9 $\pm$ 1.1	4.8 $\pm$ 1.2	4.7 $\pm$ 0.9	4.2 $\pm$ 0.8	4.1 $\pm$ 0.9
Spleen	0.7 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.3	5.6 $\pm$ 1.0	6.3 $\pm$ 1.2	7.8 $\pm$ 1.4	8.1 $\pm$ 1.2	8.4 $\pm$ 1.5	7.5 $\pm$ 1.1	7.2 $\pm$ 0.9
Brain	1.3 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.2	2.9 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 0.9	3.1 $\pm$ 0.8	3.5 $\pm$ 1.0	7.5 $\pm$ 1.5	6.5 $\pm$ 1.4	6.0 $\pm$ 0.9
Heart	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0
Lung	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0
Blood	2.1 $\pm$ 0.1	113.2 $\pm$ 8.1	124.9 $\pm$ 12.2	150.4 $\pm$ 15.1	187.7 $\pm$ 12.2	25.6 $\pm$ 5.9	10.1 $\pm$ 1.4	9.5 $\pm$ 1.9	7.5 $\pm$ 1.1	5.3 $\pm$ 0.9
Tumor	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.4	5.3 $\pm$ 1.7	28.6 $\pm$ 2.4	89.5 $\pm$ 3.5	100.5 $\pm$ 15.1	80.2 $\pm$ 9.5	55.5 $\pm$ 8.4	35.2 $\pm$ 5.9

Table 3 Boron concentration comparison between colorimetric method and ICP-MS method at 0 (control) and 150 min after BPA administration

Tissue	Boron concentration analysis ($\mu\text{g per } 10^6 \text{ cells}$)			
	Colorimetric method		ICP-MS method	
	0 (control)	150 min	0 (control)	150 min
Liver	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Kidney	9.2 ± 0.1	13.2 ± 0.3	9.5 ± 0.9	12.3 ± 1.2
Intestine	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.4	0.7 ± 0.1	1.4 ± 0.3
Skin	3.5 ± 0.5	4.8 ± 1.2	3.2 ± 0.1	4.2 ± 0.4
Spleen	0.7 ± 0.2	8.1 ± 1.2	0.3 ± 0.2	6.2 ± 0.6
Brain	1.3 ± 0.2	3.5 ± 1.0	1.0 ± 0.1	4.2 ± 0.4
Heart	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Lung	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Blood	2.1 ± 0.1	10.1 ± 1.4	2.4 ± 0.2	10.6 ± 1.6
Tumor	0.2 ± 0.1	100.5 ± 15.1	0.6 ± 0.3	80.4 ± 8.1

supernatant, while there is an increase within the cells, as shown in panels a and b. This finding corroborates with the cell viability shown in Fig. 3a. Furthermore, probably there was no boron reabsorption by melanocytes and B16F10 melanoma cells because there was no increase in boron amount after the peak concentration during the evaluated time.

The data shown in Fig. 2 were confirmed since there is an accentuated drop in melanoma cells viability, falling to a minimum at 150 min after BPA incubation (Fig. 3a). The melanocytes viability moderately decreased in the first minutes, but the cell viability trend was stable and nearly constant from 45 min onward. These results are consistent with those presented in Fig. 4, where a decreased confluence and debris formation in melanoma cells over time is observed, whereas there are no significant differences between melanocytes incubated with BPA and cells from the control group. These findings in B16F10 melanoma cells can confirm the inhibition of cell proliferation by a decrease in cyclin D1, with apoptosis by DNA fragmentation (Faião-Flores et al. 2011a) and cell death mainly occurring in the tumor cells as a result of free radical production (Faião-Flores et al. 2011b). The results of the present study are consistent with those obtained in these previous studies. Results of previous studies obtained by our group (Faião-Flores et al. 2011b) that included the irradiated control under the same conditions have already been published. In the present paper, we did not find—same as in Faião-Flores et al. 2011b—any significant difference between the irradiated control and the control group.

Boron compounds for BNCT do not themselves have any therapeutic effect, and the methods used to measure the ^{10}B concentration in tissue are generally invasive. Thus, the number of patients who can be included in trials examining only the uptake of compounds in tissue is very limited

(Wittig et al. 2008a, b). Consequently, animal studies play a central role in characterizing the bioavailability of compounds for the rational design of future BNCT trials.

Some articles have reported on the boron biodistribution in various models, for example, melanoma in hamsters (Ichikawa et al. 2009), undifferentiated thyroid carcinoma in mice (Dagrosa et al. 2005) and Walker 256 tumors in rats (Suzuki et al. 2004). However, there are no detailed studies about BPA biodistribution as a function of time by intraperitoneal inoculation in B16F10 murine melanoma, which is widely used and reflects the metastatic potential of melanoma.

BPA administration in mice bearing B16F10 melanoma showed significant results in terms of ^{10}B capture in tumor tissue. The ^{10}B concentration in blood rose up to 90 min after administration and fell thereafter, maintaining low values until a time of 240 min after administration. On the other hand, the ^{10}B concentration in the tumor increased from 60 min onward, reaching a maximum at 150 min, thus confirming the *in vitro* results. However, the maximum ^{10}B concentration in the tumor decreased more significantly from 180 min onward (Fig. 6a).

To achieve therapeutically appropriate pharmacokinetics in BNCT, a tumor/blood boron concentration ratio of at least greater than one must be achieved, meaning that the boron compound should accumulate and persist within the tumor cells, while the blood concentrations decrease (Soloway et al. 1998). We observed that the tumor/blood concentration ratio increased from 90 min onward, with a peak at 150 min, corresponding to a tumor/blood concentration ratio, which is approximately 10 (Fig. 6b). A minimum tumor boron concentration of approximately $20 \mu\text{g per } 10^6 \text{ cells}$ and a tumor/blood concentration ratio of at least 3:1 have been established as requirements for the potential success of the procedure (Dagrosa et al. 2005). These requirements are met here between 120 and 240 min

after administration. In the present study, although the tumor/blood concentration ratio was higher than 3:1, the tumor/healthy tissue dose ratio depends on other factors, as the gamma fluence at the irradiation place.

For BNCT, a sufficient number of ^{10}B atoms must accumulate in the tumor, and the gradient of the amount of ^{10}B atoms between the tumor and the surrounding normal tissues must be large (Suzuki et al. 2004). Interestingly, the concentrations of boron in B16F10 melanoma cells and B16F10 tumors in mice were higher than those reported in the literature. This finding may be related to two main hypotheses: (1) the B16F10 cell line shows a higher melanin content compared to other melanoma cell lines (Fidler 1975) and (2) BPA uptake could occur through the L-type amino acid transporter 1 (LAT 1) that helps to capture BPA because of the phenylalanine that is present in the BPA molecule and that is required by cells during intense proliferative activity (Uchino et al. 2002).

Some organs such as the liver, heart and lungs did not show increased ^{10}B uptake, while spleen and normal skin displayed moderate increases. The kidney and intestine showed a moderate ^{10}B increase from 210 min after administration onward, indicating clearance of the compound. The quantification of ^{10}B in organs such as the spleen and liver is important for evaluating BPA metabolism, and kidney and intestine are relevant for excretion analysis (Probst 1999). The absolute mean ^{10}B concentrations in tumor, normal tissues and blood are summarized in Table 1.

The HR-ICP-MS method also used in the present study is applicable for boron to be measured at ppb levels in serum, plasma, urine, plants, saline, water and tissue (Wittig et al. 2008a, b; Mattiello et al. 2011). It was used here to validate results of boron concentration analysis by the colorimetric method. The control group (time 0) and mice that received BPA 150 min before analysis were used to validate all samples. All results were found compatible with both methods by comparing the medians with the standard deviations (SD). In this way, the colorimetric method can be used to facilitate boron concentration analysis in tissue samples.

Conclusions

Biodistribution of the administered ^{10}B compounds in vivo is among the many problems to be solved before a successful clinical implementation of BNCT. Understanding how the ^{10}B compounds are absorbed and distributed is crucial for correctly calculating the beginning of irradiation. The ideal irradiation time is when the tumor/blood concentration ratio is maximal, while the boron concentration near the tumor cells is minimal. In summary, it was

shown here the best time period for thermal neutron irradiation to be 150 min after BPA incubation for metastatic melanoma treatment, represented here by the B16F10 melanoma model. It was at this time that the highest ^{10}B concentration in tumor cells in vitro and in the in vivo melanoma model was observed.

Thus, in vitro and in vivo studies of ^{10}B uptake in normal and tumor cells can provide important data that can help lead to successful BNCT application under the best possible conditions for many cancer types. These cancers include those with a high mortality rate such as melanoma. BNCT can be used as an important tool in human melanoma treatment with high effectiveness.

Acknowledgments The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp 2008/56397-8 and 2008/58817-4).

References

- Barth RF (2003) A critical assessment of boron neutron capture therapy: an overview. *J Neurooncol* 62:1–5
- Barth RF, Matalka KZ, Bailey MQ, Staubus AE, Soloway AH, Moeschberger ML, Coderre JA, Rofstad EK (1994) A nude rat model for neutron capture therapy of human intracerebral melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 28:1079–1088
- Cho HJ, Chun KJ, Park KW, Chung YS, Kim HR (2007) Determination of boron in a black mouse by prompt gamma activation analysis. *J Radioanal Nuclear Chem* 272:404–407
- Coderre JA, Morris GM (1999) The radiation biology of boron neutron capture therapy. *Radiat Res* 151:1–18
- Coderre JA, Glass JD, Fairchild RG, Micca PL, Joel DD (1990) Selective delivery of boron by the melanin precursor analogue boronophenylalanine in tumors other than melanoma. *Cancer Res* 50:138–141
- Coderre JA, Slatkin DN, Micca PL, Ciallella JR (1991) Boron neutron capture therapy of a murine melanoma with p-boronophenylalanine: dose-response analysis using a morbidity index. *Radiat Res* 128:177–185
- Coderre JA, Button TM, Micca PL, Fisher CD, Nawrocky MM, Liu HB (1994) Neutron capture therapy of the 9L rat gliosarcoma using the p-boronophenylalanine-fructose complex. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30:643–652
- Coelho PRP, Hernandez AC, Siqueira PTD (2002) Neutron flux calculation in a BNCT research facility implemented in IEA-R1 reactor. In: 10th International Congress on Neutron Capture Therapy. Research and development in neutron capture therapy. Wolfgang S, Raymond M, Andrea W. Essen, Germany (Bologna), pp 197–201
- Dagrosa MA, Viaggi M, Rebagliati RJ, Batistoni D, Kahl SB, Juvenal GJ, Pisarev MA (2005) Biodistribution of boron compounds in an animal model of human undifferentiated thyroid cancer for boron neutron capture therapy. *Mol Pharm* 2:151–156
- Faião-Flores F, Coelho PR, Arruda-Neto J, Maria DA (2011a) Boron neutron capture therapy induces cell cycle arrest and DNA fragmentation in murine melanoma cells. *Appl Radiat Isot* 69:1741–1744
- Faião-Flores F, Coelho PR, Muniz RO, Souza GS, Arruda-Neto J, Maria DA (2011b) Antitumor potential induction and free radicals production in melanoma cells by Boron Neutron Capture Therapy. *Appl Radiat Isot* 69:1748–1751

- Fernandez Y, Verhaegen M, Miller TP, Rush JL, Steiner P, Opipari AW Jr, Lowe SW, Soengas MS (2005) Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res* 65:6294–6304
- Fidler IJ (1975) Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res* 35:218–224
- Fukuda H, Hiratsuka J, Honda C, Kobayashi T, Yoshino K, Karashima H, Takahashi J, Abe Y, Kanda K, Ichihashi M et al (1994) Boron neutron capture therapy of malignant melanoma using 10B-paraboronophenylalanine with special reference to evaluation of radiation dose and damage to the normal skin. *Radiat Res* 138:435–442
- Gautier EA, Roberti MJ, Gettar RT, Jiménez Rebagliati R, Batistoni DA (2007) Assessment of chemical purity of 10B-enriched p-boronophenylalanine by high-performance liquid chromatography coupled on-line with inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 388:499–503
- Gogas HJ, Kirkwood JM, Sondak VK (2009) Chemotherapy for metastatic melanoma: time for a change? *Cancer* 109:455–464
- Ichikawa H, Taniguchi E, Fujimoto T, Fukumori Y (2009) Biodistribution of BPA and BSH after single, repeated and simultaneous administrations for neutron-capture therapy of cancer. *Appl Radiat Isot* 67:S111–S114
- Ikeuchi I, Amano T (1978) A colorimetric determination of boron in biological materials. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 26:2619–2623
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ (2009) Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59:225–249
- Jiang G, Liu YQ, Wei ZP, Pei DS, Mao LJ, Zheng JN (2010) Enhanced anti-tumor activity by the combination of a conditionally replicating adenovirus mediated interleukin-24 and dacarbazine against melanoma cells via induction of apoptosis. *Cancer Lett* 294:220–228
- Kamida A, Fujita Y, Kato I, Iwai S, Ono K, Suzuki M, Sakurai Y, Yura Y (2008) Effect of neutron capture therapy on the cell cycle of human squamous cell carcinoma cells. *Int J Radiat Biol* 84:191–199
- Kreimann EL, Miura M, Itoiz ME, Heber E, Garavaglia RN, Batistoni D, Rebagliati RJ, Roberti MJ, Micca PL, Coderre JA, Schwint AE (2003) Biodistribution of a carborane-containing porphyrin as a targeting agent for boron neutron capture therapy of oral cancer in the hamster cheek pouch. *Arch Oral Biol* 48:223–232
- Larrosa M, Tomás-Barberán FA, Espín JC (2003) Grape polyphenol resveratrol and the related molecule 4-hydroxystilbene induce growth inhibition, apoptosis, S-phase arrest, and upregulation of cyclins A, E, and B1 in human SK-Mel-28 melanoma cells. *J Agric Food Chem* 51:4576–4584
- Mattiello EM, Ruiz HA, Silva IR, Sarkis JES (2011) Use of the HRICP-MS technique for the evaluation of boron isotopes in eucalyptus plants. *Quím Nova* 34:512–515
- Mendes PF, Xander P, Novaes e Brito RR, Mortara RA, Jasiulonis MG, Lopes JD (2008) A cell surface 230 kDa protein from murine melanoma involved with tumor malignancy. *Cancer Lett* 262:276–285
- Menéndez PR, Roth BM, Pereira MD, Casal MR, González SJ, Feld DB, Santa Cruz GA, Kessler J, Longhino J, Blaumann H, Jiménez Rebagliati R, Calzetta Larrieu OA, Fernández C, Nievas SI, Liberman SJ (2009) BNCT for skin melanoma in extremities: updated Argentine clinical results. *Appl Radiat Isot* 67:S50–S53
- Meyskens FL Jr (1981) Modulation of abnormal growth by retinoids: a clinical perspective of the biological phenomenon. *Life Sci* 28:2323–2327
- Mishima Y, Honda C, Ichihashi M, Obara H, Hiratsuka J, Fukuda H (1989) Treatment of malignant melanoma by single thermal-neutron capture therapy with melanoma seeking B-10 compound. *Lancet* 2:388–389
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63
- Probst TU (1999) Methods for boron analysis in boron neutron capture therapy (BNCT). A review. *Fresenius J Anal Chem* 364:391–403
- Sauerwein W (1993) Principles and history of neutron capture therapy. *Strahlenther Onkol* 169:1–6
- Soloway AH, Tjarks W, Barnum A, Rong FG, Barth RF, Codogni IM, Wilson JG (1998) The chemistry of neutron capture therapy. *Chem Rev* 98:1515–1562
- Suzuki M, Nagata K, Masunaga S, Kinashi Y, Sakurai Y, Maruhashi A, Ono K (2004) Biodistribution of 10B in a rat liver tumor model following intra-arterial administration of sodium borocaptate (BSH)/degradable starch microspheres (DSM) emulsion. *Appl Radiat Isot* 61:933–937
- Trivillin VA, Heber EM, Rao M, Cantarelli MA, Itoiz ME, Nigg DW, Calzetta O, Blaumann H, Longhino J, Schwint AE (2008) Boron neutron capture therapy (BNCT) for the treatment of spontaneous nasal planum squamous cell carcinoma in felines. *Radiat Environ Biophys* 47:147–155
- Uchino H, Kanai Y, Kim DK, Wempe MF, Chairoungdua A, Morimoto E, Anders MW, Endou H (2002) Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition. *Mol Pharmacol* 61:729–737
- Wittig A, Michel J, Moss RL, Stecher-Rasmussen F, Arlinghaus HF, Bendel P, Mauri PL, Altieri S, Hilger R, Salvadori PA, Menichetti L, Zamenhof R, Sauerwein WA (2008a) Boron analysis and boron imaging in biological materials for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT). *Crit Rev Oncol Hematol* 68(1):66–90
- Wittig A, Malago M, Collette L, Huiskamp R, Buhrmann S, Nievaart V, Kaiser GM, Jockel KH, Schmid KW, Ortmann U, Sauerwein WA (2008b) Uptake of two 10B-compounds in liver metastases of colorectal adenocarcinoma for extracorporeal irradiation with boron neutron capture therapy (EORTC Trial 11001). *Int J Cancer* 122:1164–1171
- Wittig A, Huiskamp R, Moss RL, Bet P, Kriegeskotte C, Scherag A, Hilken G, Sauerwein WA (2009) Biodistribution of (10)B for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) in a mouse model after injection of sodium mercaptoundecahydro-closo-dodecaborate and l-para-boronophenylalanine. *Radiat Res* 172:493–499
- Yamamoto T, Nakai K, Matsumura A (2008) Boron neutron capture therapy for glioblastoma. *Cancer Lett* 262:143–152
- Zhao W, Entschladen F, Liu H, Niggemann B, Fang Q, Zaenker KS, Han R (2003) Boswellic acid acetate induces differentiation and apoptosis in highly metastatic melanoma and fibrosarcoma cells. *Cancer Detect Prev* 27:67–75