INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Avaliação do efeito de um inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME) e de um doador de radicais de nitrogênio (NPS) na citotoxicidade, genotoxicidade e potencial clonogênico de culturas celulares de melanoma humano (SK-MEL-37).

LETÍCIA BONFIM

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientador:

Prof. Dr. Daniel Perez Vieira

São Paulo

2019

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Avaliação do efeito de um inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME) e de um doador de radicais de nitrogênio (NPS) na citotoxicidade, genotoxicidade e potencial clonogênico de culturas celulares de melanoma humano (SK-MEL-37).

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

LETÍCIA BONFIM

**Dissertação apresentada
como parte dos requisitos para
obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientador:

Prof. Dr. Daniel Perez Vieira

São Paulo

2019

Fonte de Financiamento: Comissão Nacional de Energia Nuclear

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

BONFIM, L. . ***Avaliação do efeito de um inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME) e de um doador de radicais de nitrogênio (NPS) na citotoxicidade, genotoxicidade e potencial clonogênico de culturas celulares de melanoma humano (SK-MEL-37)***. 2019. 83 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

<p>Bonfim, Letícia</p> <p>Avaliação do efeito de um inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME) e de um doador de radicais de nitrogênio (NPS) na citotoxicidade, genotoxicidade e potencial clonogênico de culturas celulares de melanoma humano (SK-MEL-37). / Letícia Bonfim; orientador Daniel Perez Vieira. -- São Paulo, 2019.</p> <p>83 p.</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.</p> <p>1. melanoma. 2. óxido nítrico. 3. radioresistência. I. Perez Vieira, Daniel, orient. II. Título.</p>

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de
Desenvolvimento, associada
à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela
Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do
Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Letícia Bonfim

Título: Avaliação do efeito de um inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME) e de um doador de radicais de nitrogênio (NPS) na citotoxicidade, genotoxicidade e potencial clonogênico de culturas celulares de melanoma humano.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós –
Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: / /

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho à Deus, minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. Daniel Perez Vieira pela oportunidade e pelos ensinamentos ao longo destes anos. Foi um grande desafio fazer este mestrado, mas graças ao seu apoio consegui.

Ao meu pai Ordaly Teixeira Bonfim (*in memoriam*), que mesmo estando distante consegue trazer paz para a minha alma.

A minha mãe Maria Helena da Silva Bonfim que sempre me incentivou a estudar e ser uma pessoa melhor. Obrigada por jamais permitir que eu caísse em certos momentos de fraqueza, espero algum dia retribuir tudo o que você tem feito por mim.

A minha irmã Juliana Bonfim e meus sobrinhos Vítor Henrique Bonfim e Vinicius Rafael Bonfim por me acompanharem ao longo desta jornada tornando os meus dias mais alegres.

Ao Daniel Wick, meu amigo e companheiro que sempre esteve ao meu lado com todo o seu amor. Obrigada por acreditar em mim mais do que qualquer outra pessoa.

A minha madrinha Laura Custódio e minha avó Maria Custódio que sempre cuidaram de mim. Sou muito grata por todo o amor que vocês sempre me dedicaram.

A Tamires de Araújo Mora, Bárbara Aranha e Daniel Andrade pela amizade ao longo destes anos.

As minhas amigas Kleicy Cavalcante Amaral, Luma Ramirez de Carvalho, Karina Gonçalves e Ana Cristina Gomes, por cada momento que passamos juntas, me sinto honrada por ter tido a oportunidade de trabalhar com pessoas tão maravilhosas quanto vocês. E, aos novos amigos Priscila Passos, Fúlvio Gabriel, Ana Ligia Albiero, Raquel Laube, Mayelle Paz, pelo carinho e amizade.

A todos os funcionários e estudantes do Centro de Biotecnologia (CB/IPEN) por todo o apoio que recebi ao longo destes anos.

Agradeço à Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) pelo apoio financeiro.

A Elizabeth S. R. Somessari por toda a atenção dedicada durante as irradiações.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

Enfim, agradeço à Deus que sempre colocou pessoas boas em meu caminho e por permitir que eu concluísse mais esta etapa.

Muito obrigada!

“A vida não é sobre quão duro você é capaz de bater, mas sobre quão duro você é capaz de apanhar e continuar indo em frente.”

(Rocky Balboa)

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UM INIBIDOR DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (L-NAME) E DE UM DOADOR DE RADICAIS DE NITROGÊNIO (NPS) NA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E POTENCIAL CLONOGÊNICO DE CULTURAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO (SK-MEL-37).

Letícia Bonfim

RESUMO

O melanoma é classicamente descrito como um dos tumores que possuem alta radioresistência, tanto em experimentos *in vitro* quanto em estudos clínicos. O óxido nítrico é uma molécula que exerce diversas funções no organismo e interage com vias que podem alterar o microambiente tumoral, incluindo a radioresistência. O presente estudo tem o objetivo de avaliar o papel do óxido nítrico (ON) como radiomodificador na linhagem celular de melanoma humano, SK-MEL-37, em culturas irradiadas com radiação gama (^{60}Co) em doses entre 0,5 e 16 Gy. As culturas receberam tratamentos prévios com L-NAME (N(ω)-nitro-L-arginina metil éster) um inibidor da óxido nítrico sintase (NOS) ou com nitroprussiato de sódio (NPS), um doador de nitrogênio. O ensaio de frequência de micronúcleos mostrou que a concentração de 500 μM de NPS tornou as células mais sensíveis aos efeitos das radiações ionizantes e manteve o ritmo do ciclo celular sem alterações significativas até a dose 8 Gy. O tratamento realizado com 60 μM de NPS protegeu a cultura celular provavelmente por reduzir a velocidade do ciclo celular, apesar de induzir maior dano genotóxico. A inibição do ON provocada pela concentração de 6,4 μM de L-NAME tornou a cultura celular mais radioresistentes refletindo em uma menor frequência de dano genotóxico. Os dados obtidos mostraram que o aumento ou a redução da concentração de óxido nítrico nas culturas *in vitro* de SK-MEL-37 podem conferir radioresistência ou sensibilidade por mecanismos distintos.

Palavras-chave: melanoma, radioresistência, óxido nítrico.

EVALUATION OF THE EFFECT OF A NITRIC OXIDE SYNTHASE INHIBITOR (L-NAME) AND NITROGEN RADICAL DONOR (NPS) ON THE CYTOTOXICITY, GENOTOXICITY AND CLONOGENIC POTENTIAL OF HUMAN MELANOMA CELL CULTURES (SK-MEL-37)

Letícia Bonfim

ABSTRACT

Melanoma is classically described as one of the tumors that has high radioresistance in both in vitro and clinical studies. Nitric oxide is a molecule that performs various functions in the body and interacts with pathways that can alter the tumor microenvironment, including radioresistance. The present study aims to evaluate the role of nitric oxide (NO) as a radiomodifier in the human melanoma cell line, SK-MEL-37, in gamma irradiated cultures (^{60}Co) at doses between 0.5 and 16 Gy. Cultures received prior treatments with L-NAME (N (ω)-nitro-L-arginine methyl ester) a nitric oxide synthase inhibitor (NOS) or sodium nitroprusside (NPS), a nitrogen donor. The micronucleus frequency assay showed that the 500 μM NPS concentration made the cells more sensitive to the effects of ionizing radiation and maintained the cell cycle rate without significant changes up to the 8 Gy. Treatment with 60 μM NPS protected cell culture probably by reducing cell cycle speed, although inducing greater genotoxic damage. The inhibition of NO caused by the concentration 6.4 μM L-NAME made the cell culture more resistant reflecting in a lower frequency of genotoxic damage. The data obtained showed that increasing or decreasing nitric oxide concentration in in vitro cultures of SK-MEL-37 may confer radioresistance or sensitivity by different mechanisms.

Key words: *melanoma, radioresistance, nitric oxide.*

Lista de abreviações

C	Carbono
CDK4	quinase dependente de ciclina 4
CDKN2A	inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
COLCH	Colchicina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
keV	quilo elétron Volt
L-NAME	L-NG-nitro-arginina metil éster
MN	Micronúcleo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MTMC	Mitomicina C
MeV	mega elétron Volt
O	Oxigênio
ON	Óxido nítrico
PI3K	Fosfoinositídeo 3 quinase
P53	Proteína 53
NF1	Neurofibromina 3
NPS	Nitroprussiato de sódio
TERT	Transcriptase reversa da telomerase
TLE	Transferência linear de energia
RAS	Proteína G ras
μM	micro molar

SUMÁRIO

1	Introdução	15
1.1	Resposta das células as radiações ionizantes.....	17
1.2	Ciclo celular	19
1.3	Genotoxicidade radio induzida - Micronúcleos.....	20
1.4	Epidemiologia do melanoma.....	22
1.5	Fatores de risco para o melanoma	25
1.6	A relação entre os melanócitos e o melanoma	26
1.7	Mutações e tratamento no melanoma.....	27
1.8	Radioresistência do melanoma.....	28
1.9	Óxido Nítrico	29
1.10	Óxido nítrico e melanoma	32
2	Objetivos	34
2.1	Objetivos Específicos.....	34
3	material e metodos	35
3.1	Cultura Celular	35
3.2	Irradiações	35
3.3	Ensaio de citotoxicidade	36
3.3.1	Ensaio de citotoxicidade - Preparo dos radiomodificadores.....	36
3.3.2	Ensaio de citotoxicidade - Controles positivo e negativo	36
3.3.3	Ensaio de citotoxicidade - Viabilidade celular	37
3.4	Ensaio de potencial clonogênico – Formação de colônias.....	38
3.5	Ensaio de genotoxicidade	39
3.5.1	Controles positivos e negativos	39
3.5.2	Tratamento com L-NAME e NPS e irradiação	39
3.5.3	Ensaio de frequência de micronúcleos por citometria de fluxo	40
3.5.4	Etapas de Lise	41

3.5.5	Análise dos dados obtidos por citometria de fluxo	41
3.6	Ensaio de ciclo celular	44
3.6.1	Marcação fluorescente.....	44
3.6.2	Permeabilização e marcação fluorescente	45
3.7	Análise estatística	45
4	Resultados	47
4.1	Ensaio de micronúcleo por citometria de fluxo em células de melanoma humano irradiadas.	47
4.2	Ensaio de Citotoxicidade.....	50
4.3	Fração de sobrevivência e DL50 das células de melanoma humano irradiadas e tratadas com NPS e L-NAME.	53
4.4	Ensaio de micronúcleo por citometria de fluxo em células de melanoma humano irradiadas e tratadas com NPS e L-NAME.....	55
4.5	Ciclo Celular.....	64
5	Discussão.....	66
6	Conclusão	71
	Referências bibliográficas	72

1 INTRODUÇÃO

A interação das radiações ionizantes com as células pode causar danos ao DNA e induzir diversos efeitos como morte celular, mutações genéticas e alterações na proliferação celular. A gravidade do dano depende da dose e do tecido afetado uma vez que cada célula apresenta alguma radioresistência (UNSCEAR, 2000).

Ao atravessar os tecidos, as radiações podem ionizar a água e as biomoléculas das células. Num contexto mais amplo, o principal alvo em uma célula é o DNA que pode sofrer quebras, simples ou duplas, dependendo da intensidade da radiação. Quando o dano é detectado inicia-se uma série de respostas, como a ativação dos pontos de reparo (*checkpoints*) nos quais as células param o ciclo celular e iniciam o reparo. Caso não seja possível efetuar o reparo, ocorrerá a morte celular por apoptose ou necrose, para que o dano não seja transmitido às outras células-filha (VIGNARD; MIREY; SALLES, 2013).

Células de diferentes origens apresentam resistências variadas aos efeitos das radiações. De acordo com a Lei de Bergonie e Tribondeau a resistência das células as radiações ionizantes está diretamente relacionada com sua capacidade reprodutora e inversamente proporcional à sua diferenciação celular (VOGIN; FORAY, 2013).

As radiações ionizantes são utilizadas no diagnóstico médico e nas terapias antitumorais, inibindo a proliferação de células cancerígenas ou induzindo a morte celular. (SANTIVASI; XIA, 2013). Em tumores que possuem alta radioresistência, a radioterapia é utilizada como um tratamento paliativo devido a aplicação de altas doses que podem comprometer o tecido ao redor do tumor. A eficiência deste tratamento fica comprometida devido à existência de hipóxia no microambiente tumoral, desta forma, as interações das radiação com oxigênio são relativamente escassas, impedindo a formação de espécies reativas de oxigênio, e portanto reduzindo o efeito destrutivo das radiações sobre o tumor (MOELLER; et al 2007).

Na radioterapia as doses são administradas de forma fracionada, pois ao realizar o tratamento com doses diárias menores permite-se que as células normais atingidas pela radiação possam se recuperar do dano, uma vez que o tempo de recuperação de células cancerígenas é maior.(SCHAUE; MCBRIDE, 2015). Embora o fracionamento das doses aumente a eficiência da radioterapia ainda é necessário desenvolver e aprimorar terapias com o intuito de tornar os tumores sensíveis às radiações ionizantes, incluindo aquelas que podem radiosensibilizar especificamente as células tumorais ou radioproteger somente as células normais do tecido (MAIER; WENZ; HERSKIND, 2014).

A compreensão das vias que dependem do óxido nítrico (ON) assim como sua relação com o desenvolvimento da carcinogênese tem possibilitado o desenvolvimento de terapias baseadas em doadores ou inibidores de ON. Um estudo descreveu as vias pelas quais doadores de ON vem sendo desenvolvidos, como uma nova abordagem ao tratamento de câncer, incluindo o melanoma, podendo-se tanto utilizar inibidores para diminuir a concentração de ON e consequentemente o crescimento tumoral ou doadores de ON para induzir a morte das células do tumor. Sugere-se que o ON pode ser utilizado com outras terapias como a quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e terapia gênica para levar até o local do tumor genes da óxido nítrico sintase (NOS) ou a nanotecnologia para levar o doador de ON até o local do tumor.(HUANG; FU; ZHANG, 2017). A administração exógena de drogas doadoras de ON pode aumentar a radiosensibilidade via redução da hipóxia através do aumento da perfusão tumoral. Outros estudos sugerem que o ON é um radiosensibilizador tão potente quanto o oxigênio, permitindo a morte das células tumorais e mantendo as células normais (YASUDA, 2008).

Assim sendo, restaria elucidar o papel do ON em tumores irradiados, uma vez que é difícil identificar o papel específico do ON na carcinogênese, pois é dependente da sua concentração, interação com outros radicais livres, íons metálicos e proteínas, o tipo celular e a base genética. O ON pode tanto causar danos ao DNA quanto proteger da citotoxicidade, pode inibir e estimular a proliferação celular e pode ser tanto pró quanto anti apoptótico (WANG et al., 2010).

1.1 Resposta das células as radiações ionizantes

A interação da radiação ionizante com as células tem como principal alvo o DNA e a resposta aos possíveis danos podem vir da sensibilização das células em iniciar cadeias de morte celular devido as alterações genéticas ou modificações no ciclo celular (MAIER et al., 2016).

A indução de alterações fisiológicas nas células pela exposição às radiações ionizantes depende de alguns fatores físicos intrínsecos à radiação incidente. A transferência linear de energia (TLE), é uma grandeza definida como a quantidade de energia por unidade de comprimento do trajeto percorrido no tecido irradiado, e em geral é dada em keV ou meV (quilo ou mega elétron-volt) por micrômetro percorrido no tecido por um determinado fóton ou partícula. A probabilidade de ocorrer a interação entre a radiação e a célula alvo depende da intensidade da TLE. Raios X, raios gama e elétrons possuem baixa TLE com valores entre 0,2 a 5 keV/ μ m e depositam pequenas quantidades de energia no tecido. Nêutrons e íons mais pesados possuem alta TLE com valores entre 50 e 200 keV/ μ m e depositam maiores quantidades de energia (HERSKIND; WENZ, 2014).

A radiação pode remover elétrons dos tecidos ionizando moléculas, excitando radicais oxidantes ou redutores, resultando na desestabilização de estruturas celulares em nível molecular. Tais fenômenos podem ocorrer de forma direta, quando a radiação interage diretamente com as biomoléculas das células, ou indiretamente através da radiólise da água, processo no qual a radiação interage com as moléculas de água gerando radicais livres, espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio, que provocam danos a todas as estruturas celulares, mas preferencialmente ao DNA. (DESOUKY; DING; ZHOU, 2015)

As reações que ocorrem durante a interação das radiações ionizantes com água gerando dois importantes radicais o $e^-_{(aq)}$ (elétron aquoso), OH (hidroxila), conforme as reações descritas a seguir: (CAË, 2011)

Além disso, os radicais $\text{H}^\bullet$ e $\text{OH}^\bullet$ formados durante a radiólise podem interagir com outras moléculas, ou por serem altamente reativos podem recombinar entre si para formar outros produtos extremamente tóxicos como o H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), conforme representado na reação abaixo (WANG; YU; SU, 2010)

A resposta ao dano causado no DNA pela exposição às radiações ionizantes está relacionada com a ativação de diversas vias de sinalização celular, que mantem a integridade genômica. Por exemplo, a via da p53 uma importante proteína que atua na resposta ao dano causado pela exposição à radiação e coordena importantes vias de sinalização no reparo do DNA, como a paralisação do ciclo celular para reparo do DNA, apoptose e senescência. (NARAYANAN et al., 2017). Em tumores, formas mutantes de p53 induzem a desativação de sua atividade supressora podendo desencadear a oncogênese (MULLER; VOUSDEN, 2014).

Quando ocorre o dano no DNA as células começam uma sequência de eventos que se iniciam com a ativação de proteínas responsáveis pela verificação do *checkpoint* do ciclo celular, que traduzem o sinal do dano para a proteína ataxia telangiectasia mutada (ATM) resultando na ativação de proteínas ligadas a fosforilação da p53 que coordenará o reparo do DNA ou a morte celular por apoptose. Sendo assim, a p53 desempenha um papel central nas vias de sinalização da resposta à radiação como parada do ciclo celular para reparo e manutenção do DNA (FEI; EL-DEIRY, 2003).

Em se tratando da utilização da radiação como terapia, o objetivo é impedir a proliferação das células cancerígenas, resultando na morte celular. A

apoptose é um processo de morte celular que envolve três vias reguladoras: a via das mitocôndrias, a via de inibidores de proteína da apoptose e a via de receptores de morte (ZHOU; YUAN; LANATA, 2008). Um outro tipo de morte celular relacionada à exposição as radiações ionizantes é a catástrofe mitótica, resultado da antecipação da fase de mitose antes da conclusão da fase S e G2. (CASTEDO et al., 2004). Ainda como resposta ao dano causado por radiação a morte celular pode ocorrer com menor frequência por necrose, que se inicia com a ruptura da membrana celular seguido pela perda do conteúdo intracelular. A autofagia é um processo de reparo celular recentemente revisto e que também pode ser descrito como uma forma de morte das células cancerígenas como resposta as radiações ionizantes (BASKAR et al., 2012).

As quebras causadas pela radiação no DNA ativam mecanismos que impedem a continuação do ciclo celular para reparar o dano. Caso o dano não seja reparado as células entram em senescência, estado no qual as células perdem permanentemente sua capacidade de proliferação, mas permanecem viáveis. Estudos demonstraram que a senescência ocorre em células cancerígenas após danos causados pela radiação e processos apoptóticos ocorreriam na sequência. (ERIKSSON; STIGBRAND, 2010).

Apesar de ser um tratamento que contribui significativamente para a cura de quantidade considerável de cânceres, tem seu efeito limitado pela radioresistência intrínseca das células cancerígenas. Doses fracionadas de radiação que podem atingir tanto as células normais quanto as cancerígenas reduzindo a eficiência deste tratamento. Sendo assim, a morte celular dependerá da análise de fatores como a transferência linear de energia, dose total, fracionamento da dose, radiosensibilidade das células e o tipo de tecido. (BASKAR et al., 2012)

1.2 Ciclo celular

A proliferação celular é o evento no qual uma célula se desenvolve, realiza a duplicação de seu DNA e finalmente se divide para dar origem à outras células. O ciclo celular possui quatro fases sequenciais: G1 (células crescem e se

dividem, ou entram em repouso - G0); S (síntese- ocorre a replicação do DNA); G2 (preparação para a mitose) e M (divisão do material genético e citocinese). (INGHAM; SCHWARTZ, 2017).

A redistribuição do ciclo celular como uma resposta às radiações ionizantes é um dos principais determinantes da radioresistência das células. A resposta celular aos danos causados ao DNA está na passagem entre as fases do ciclo que são mediadas por pontos de controle (*checkponits*), que determinam se há condições favoráveis ou não para prosseguir com o ciclo. Os *checkponits* iniciam o reparo para impedir a morte celular, ou podem dar continuidade a duplicação mesmo com o DNA danificado. (KASTAN; BARTEK, 2004). O primeiro *checkpoint* ocorre em G1 na transição entre G1e S e o segundo *checkpoint* em G2, na transição entre G2 e M. (BENADA; MACUREK, 2015). A fase do ciclo celular também determina a radiosensibilidade relativa de uma célula, sendo as células mais radioresistentes da fase G0/G1 até a primeira fase de S e mais radiosensíveis da segunda metade da fase S até a fase M (PAWLIK; KEYOMARSI, 2004).

1.3 Genotoxicidade radio induzida - Micronúcleos.

Durante a interação da radiação ionizante com as células, a energia é depositada de forma padronizada e depende da intensidade da LET. O padrão dos depósitos de energia no tecido é o que causa as modificações no DNA e, como consequência, define a distribuição espacial das lesões. Quando a radiação ionizante é emitida por baixa LET a probabilidade de ocorrer o dano em fita simples do DNA é maior devido à baixa concentração de eventos de ionização e consequentemente menos locais de dano. Ao contrário, quando ocorre a emissão por alta LET a probabilidade de ocorrer o dano nas fitas duplas do DNA vem da ocorrência da alta concentração de eventos de ionização e, portanto, é considerado o principal dano que afeta a integridade do DNA. (LOMAX et al., 2013)

A quebra no DNA pode levar a formação de micronúcleos que são pequenos fragmentos que não foram incorporados no núcleo das células filhas durante a divisão celular. O ensaio de frequência de micronúcleos é um teste, *in vitro*, amplamente utilizado e tem como objetivo relacionar o aumento da

quantidade de micronúcleos com o dano genotóxico que pode ter sido causado por substâncias químicas ou por causas físicas, como as radiações ionizantes (PAJIC et al., 2017). São utilizadas como substâncias químicas agentes clastogênicos, que são promotores de quebras cromossômicas e agentes aneugênicos que promovem a segregação cromossômica anormal (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES et al., 2012)

Nesta técnica a incidência dos micronúcleos ocorre pelo bloqueio da citocinesia com a utilização da citocalisina B, um composto que inibe a divisão celular (citocinese) sem afetar a divisão do núcleo (cariocinese) durante a duplicação do DNA. Sendo assim, as células tratadas citocalasina B passarão a ter dois núcleos, sendo denominadas células binucleadas. Quando ocorrer algum dano genotóxico que resulte na quebra irreparável do DNA, as células binucleadas apresentarão os micronúcleos. Sendo assim, os micronúcleos podem apresentar duas origens distintas uma através de fragmentos que não possuem centrômero (fragmentos acêntricos) ou por fragmentos de cromossomos inteiros que não migraram com o restante dos cromossomos durante a anáfase do ciclo celular. Tradicionalmente, o protocolo deste ensaio propõe que as células sejam expostas a concentrações de uma substância teste e em seguida fixadas e coradas para que ocorra a análise através de microscopia ou fluorescência. (OECD GUIDELINE CONSIDERATIONS, 2004;).

Atualmente, a técnica vem sendo realizada através de abordagem automatizada o que pode representar algumas vantagens com relação ao protocolo tradicional no que se refere ao tempo de análise das amostras. O citômetro de fluxo é um equipamento que permite caracterização de células ou partículas através da análise simultânea de parâmetros como tamanho, granulosidade e fluorescência (ADAN et al., 2017). Os núcleos e/ou micronúcleos da amostra são transportados por um fluido de arraste que ao interagir com feixes de luz gerados por lasers dispersam a luz e, as fluorescências emitidas correspondentes aos parâmetros são captadas e registradas por um sistema óptico eletrônico (HAYASHI, 2016).

Bryce e colaboradores, 2007, descreveram a técnica através da análise automatizada da frequência de micronúcleos utilizando citômetro de fluxo como uma nova abordagem com relação aos ensaios de micronúcleos convencionais. Basicamente, houve a incorporação da coloração das células com brometo de

monoazida de etídio (EMA) para marcar a cromatina das células que tiveram morte celular, necrose ou apoptose, e diferenciá-las nos núcleos e micronúcleos que são corados com SYTOX® Green. Além disso, há adição de esferas de látex (*beads*), que por apresentarem quantidade constante durante o ensaio, sua presença possibilita o cálculo da relação entre a quantidade de núcleos e em cada amostra.

1.4 Epidemiologia do melanoma

Dentre os tumores de alta incidência ou mortalidade está o câncer de pele, que pode ser classificado em dois grupos: pele não melanoma e melanoma. Os de pele não melanoma são classificados em carcinomas basocelulares (CBC), que constituem o tipo de neoplasia mais comum, com origem nas células basais da derme, e o segundo é o carcinoma espinocelular, com origem nas células escamosas que constituem a camada epiderme da pele, e por último o melanoma, tipo mais agressivo de câncer de pele. (DIEPGEN; MAHLER, 2002).

O melanoma é desenvolvido pela transformação neoplásica de melanócitos, que são células de morfologia dendrítica que tem origem embrionária na crista neural, e distribuem-se pela pele, olhos, ouvidos e sistema nervoso central, e são os responsáveis pela produção da melanina que é o pigmento da pele. (LIN; FISHER, 2007)

A pele é formada por três camadas: a epiderme (camada mais externa), hipoderme (camada mais interna) e a derme que é a camada intermediária entre estas duas. A epiderme é formada por mais outras cinco subcamadas, sendo a camada mais profunda a basal ou germinativa onde estão situados os queratinócitos e os melanócitos (WONG et al., 2016).

Figura 1 – Camadas da pele

Fonte: Adaptado de NEILL, 2012.

Melanomas apresentam-se na forma de nevus (pintas) ou nódulos que podem apresentar características como assimetria, bordas irregulares, cor variável (a coloração pode adquirir tons de preto, castanho, marrom, vermelho, azul e branco), diâmetro (maior que 6 mm) e a evolução através das mudanças como formas, cor e tamanho. Estas características são adotadas internacionalmente e reunidas num sistema de nomenclatura e classificação conhecido como “ABCDE” e, apesar de ser considerado um autoexame essencial no diagnóstico de um possível melanoma, estas regras não são aplicadas à todos os tipos de achados dermatológicos (TSAO et al., 2015)

Melanomas primários são classificados segundo sua origem, pois apresentam uma variedade de padrões histopatológicos. Primeiramente, há os melanomas extensivos superficiais, que constituem o tipo de maior ocorrência e estão relacionados à exposição intermitente ao Sol, sendo caracterizados por lesões cutâneas que ocorrem devido ao crescimento radial dos melanócitos na região entre a derme e a epiderme e posterior crescimento vertical, no qual as

células invadem a camada da derme. Nesta última etapa há o aumento de risco de aparecimento de metástases. (RASTRELLI et al., 2014).

Os melanomas nodulares são o segundo tipo, caracterizado pelo crescimento vertical rápido e precoce (KHAN et al., 2011). Os melanomas do tipo *lentigo maligno* são neoplasias localizadas, nas quais as células ficam limitadas ao tecido de origem (epiderme) e ocorrem em áreas que estão expostas aos raios ultravioletas do Sol e se desenvolvem por um crescimento radial e lento. Por último, os melanomas acrais são tipos raros de melanoma que se iniciam na junção da dermo-epiderme e que acomete as regiões das palmas das mãos e as solas dos pés. (MCCOURT; DOLAN; GORMLEY, 2014)

Além destes quatro tipos clássicos do melanoma, existem outros mais raros com variantes histopatológicas atípicas, como melanomas spitzóides, caracterizado por nevos de Spitz; melanomas desmoplásicos causados por células fusiformes (ALVA, 2013), melanomas da mucosa que podem ser localizados nas regiões cabeça-pescoço, anorretal, vulvovaginal; e os uveais, localizados no interior do globo ocular e os melanomas amelanóticos caracterizados pela falta de pigmento. (SCHADENDORF et al., 2018).

Mesmo com certos avanços em terapias direcionadas para o tratamento do melanoma, o diagnóstico é realizado pela análise histopatológica de biópsias de uma ou mais lesões. (PAVRI et al., 2016). Melanomas em estágio avançado possuem prognóstico ruim, uma vez que a quimioterapia se torna ineficiente devido à resistência deste tumor ao tratamento. As razões que o tornam quimiorresistente ainda não estão totalmente esclarecidas, aparentemente as células de melanoma humano apresentam alterações nas vias apoptóticas de modo a inibir as vias pró apoptóticas, favorecendo a continuidade do tumor (MISHRA et al., 2018; HELMBACH et al., 2001).

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que no Brasil durante o biênio 2018/2019 serão detectados cerca de 600 mil novos casos de câncer para cada ano. Desde total, serão 165.580 casos de câncer de pele não melanoma para cada ano do biênio, sendo 85.170 nos homens e 80.410 nas mulheres, representando cerca de 30% de todos os tumores malignos. Apesar da alta prevalência, este tipo de câncer de pele possui baixa taxa de mortalidade (INCA,

2018). Em relação ao câncer de pele tipo melanoma, estimam-se 6.260 novos casos no período descrito, sendo 2.920 casos em homens e 3.340 novos casos em mulheres por ano do biênio (INCA, 2018). Apesar de possuir baixa incidência relativa (cerca de 1% do total de casos), este tipo de neoplasia apresenta alta mortalidade, especialmente se diagnosticado após o processo de metástase tornando as chances de cura reduzidas. (TÍMÁR et al., 2016).

1.5 Fatores de risco para o melanoma

Os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento do melanoma são: histórico familiar, presença de nevos displásicos, cor da pele, episódios de queimadura solar, localização geográfica, e exposição à radiação ultravioleta. Os mecanismos utilizados pela pele contra a exposição aos efeitos genotóxicos da radiação ultravioleta incluem aumento da espessura da epiderme, mecanismos de reparo do DNA, processos antioxidantes e a pigmentação da pele (BANDARCHI et al., 2013).

O histórico familiar pode carregar um risco maior ao desenvolvimento do melanoma e está associado a mutações encontradas nos genes CDKN2A, CDK4, BAP1, POT1, , TERF, que indicam suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer de pele (READ; WADT; HAYWARD, 2015). No entanto, a exposição à radiação ultravioleta (UV) do Sol é o principal fator de desenvolvimento do melanoma. Os mecanismos de interação entre a pele, melanócitos, queratinócitos e luz UV ainda não foram totalmente elucidados e são associados a lesões tanto diretas quanto indiretas no DNA, que se manifestam através de respostas inflamatórias, mutações genéticas e formação de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio. (NARAYANAN, 2010)

Os danos causados ao DNA variam conforme a intensidade da radiação ultravioleta que é formada, por aproximadamente, 95% UVA (comprimento de onda entre 320 – 400 nm) e 5 % de UVB (280 – 320 nm). A interação de UVA e UVB com a pele produz uma variedade de efeitos, sendo que a UVB é capaz de produzir mais danos citotóxicos e mutagênicos cuja energia é absorvida diretamente pelo DNA, podendo causar mutações. A UVA penetra na pele e pode alcançar a camada da

derme sendo a responsável pelo dano indireto no DNA, incluindo a formação das espécies reativas do oxigênio (SUN et al., 2016). A lesão principal causada no DNA de forma direta é associada a mutações provocadas pela formação de dímeros de pirimidina. (PFEIFER; BESARATINIA, 2012)

De forma indireta a exposição à luz UV induz a formação de espécies reativas de oxigênio utilizando-se de vários mecanismos para a formação de oxigênio singlete (O_2), radicais hidroxila (OH^*) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) levando a danos celulares, estresse oxidativo, mutações e morte celular (DE JAGER; COCKRELL; DU PLESSIS, 2017).

Outro fator a ser analisado é a produção de óxido nítrico pelos queratinócitos mediante estímulo pela exposição à luz UV, como parte de um mecanismo de defesa e reparo da pele, pois o ON está envolvido em processos inflamatórios, atividade microbiana e apoptose (WANG et al., 2010).

1.6 A relação entre os melanócitos e o melanoma

O processo de formação do melanoma se inicia nos melanócitos, porém não há um consenso sobre como esta neoplasia se desenvolve em seus estágios iniciais (SHAIN; BASTIAN, 2016). Há uma noção tomada como canônica que sustenta que a transformação maligna dos melanócitos é uma combinação de vários fatores atuando em diferentes vias moleculares, como aquelas envolvidas na alteração de proteínas do ciclo celular que participam no desenvolvimento do melanoma.(BANDARCHI et al., 2013)

Um estudo avaliou a expressão de 37 genes extraídos de melanomas primários com histologias distintas de lesões precursoras, que foram analisadas de acordo com a sequência, que se inicia com uma lesão benigna, lesão intermediária, melanoma *in situ*, melanoma invasivo e por último a metástase. O trabalho propôs três possíveis modelos de progressão do melanoma, sendo que a radiação ultravioleta possui papel importante desde o surgimento da lesão benigna até o câncer se tornar invasivo. O primeiro modelo indica que uma lesão benigna já abriga a mutação V600E do gene BRAF e TERT, o segundo mostra a ocorrência de uma lesão intermediária, ou seja, aquela que na histologia está entre uma lesão

benigna e melanoma *in situ*, que possui mutações nos genes NRAS e TERT, indicando que esta mutação está presente desde o início, e por último um terceiro modelo no qual lesões intermediárias estão associadas à mutação V600K do gene BRAF e TERT. Independentemente do modelo a transição do melanoma *in situ* para o melanoma invasivo, ocorre em virtude das mutações SWI/SNF no gene CDKN2A, sendo que a metastatização ocorre provavelmente pela mutação na P53 (SHAIN et al., 2015)

Ambos os trabalhos reafirmam a hipótese de que cada tipo de melanoma pode evoluir por trajetórias distintas e pelos vários estágios da doença, sendo assim o mapeamento da sucessão de alterações genéticas que ocorrem durante o progresso do melanoma, utilizado como critérios para o prognóstico e diagnóstico da doença.

1.7 Mutações e tratamento no melanoma

O melanoma é considerado um dos tumores que mais possuem mutações, que podem ser diferentes para cada tipo de melanoma. (HAYWARD et al., 2017). Estas mutações alteram as vias que envolvem proliferação celular, desregulação do ciclo celular e dano no DNA e podem ocorrer por diferentes vias de sinalização, sendo a MAP quinase uma das mais importantes e ativadas mutações nos genes BRAF, NRAS, KIT, NF1. Outras vias podem alterar o ciclo celular por alterações nos genes TP53, CCND1, CDK4, e a via da telomerase pelo gene TERT. As mutações em BRAF, NRAS, KIT, NF1 e a no gene da telomerase, são as mutações que ocorrem com maior frequência, portanto, aquelas que direcionam o desenvolvimento de novas terapias. (SHTIVELMAN et al., 2014)

Aproximadamente 50% dos melanomas invasivos provém de células tumorais nas quais o gene BRAF carrega a mutação V600E, que por sua vez descontrola a proliferação e dá a característica de alta taxa de divisão mitótica que confere a morbidade do tumor em questão. A descoberta desta mutação permitiu o desenvolvimento dos fármacos Vermurafenib® e Dabrafenib®, que são inibidores específicos da proteína BRAF mutante reduzindo a agressividade do tumor e

aumentando a taxa de sobrevivência de pacientes com melanoma em estágio avançado.(CHENG et al., 2018)

As mutações que afetam o gene NRAS estão presentes em 20-25% dos casos de melanoma, sendo considerada a segunda mutação mais frequente neste tipo de tumor. A mutação neste gene altera o processo de hidrólise do trifosfato de guanosina (GTP) ativando as vias de sinalização MEK/MAPK e demais proteínas como GEF, PI3K e RAS. Devido à sua natureza agressiva, esta mutação se torna resistente às terapias que vem sendo testadas, fazendo-se necessário novas estratégias e alvos que melhorem a eficácia de futuros tratamentos.(YU, 2018)

Outro fármaco que vem apresentando resultados satisfatórios no tratamento do melanoma em estágio avançado é o Pembrolizumab® (Keytruda), um anticorpo que possui afinidade com a proteína de morte programada (PD-1). O Pembrolizumab bloqueia a interação entre PD-1 e seus ligantes PD-L1 e PD-L2, potencializando as respostas das células T e reativando a imunidade antitumoral, resultando na redução do crescimento do tumor.(DEEKS, 2016).

Os *checkpoints* do ciclo celular vêm sendo estudados como alternativa para novas terapias no tratamento do melanoma que possui ciclo celular irregular. Novas abordagens, *in vitro* e *in vivo*, sugerem o uso de inibidores da cinase dependente de ciclina (Cdk) em combinação com inibidores de BRAF ou inibidores da via MEK com inibidores da mutação NRAS. (XU; MCARTHUR, 2016)

No tratamento do melanoma a radioterapia tem sido utilizada como uma medida paliativa nos casos que a doença está em estágios avançados devido à radioresistência deste tipo de tumor. Com o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, a radioresistência do melanoma passou a ser questionada e hoje, apesar de controvérsias, a radioterapia está sendo reconsiderada no tratamento do melanoma (STROJAN, 2010).

1.8 Radioresistência do melanoma

O melanoma é classicamente descrito como um tumor que apresenta relativa resistência aos efeitos das radiações ionizantes, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, fazendo com que a radioterapia perdesse sua importância neste tipo de tumor. Os

primeiros estudos foram baseados em curvas de sobrevivência, nos quais a linhagens celulares de melanoma apresentavam alta resistência se comparada com as demais linhagens.(FERTIL; MALAISE, 1985).

Embora os mecanismos que levam o melanoma a ser radioresistente ainda sejam pouco esclarecidos, com o desenvolvimento de novos estudos a radioresistência do melanoma foi sendo associada à uma série de propriedades. Estudos recentes relacionam a radioresistência do melanoma à uma possível alta capacidade de reparo do DNA (ESPENEL et al., 2016). A melanina pode tanto proteger através de suas propriedades antioxidantes e protegendo o DNA dos queratinócitos absorvendo a radiação UV, quanto auxiliar no desenvolvimento da carcinogênese quando queratinócitos com o DNA lesionado estimulam a liberação do hormônio α -MSH, responsável pela síntese da melanina (PREMI et al., 2015).

1.9 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (ON) é um radical livre que regula uma variedade de respostas fisiológicas importantes, incluindo vasodilatação, respiração, migração celular resposta imune e apoptose (BONAVIDA, 2015).

Em mamíferos, o ON é sintetizado por uma família de enzimas referidas como Óxido Nítrico Sintases (NOS). A síntese do ON é catalisada por uma das três isoformas: neuronal (nNOS/NOS1), imunológica (iNOS/NOS2), endotelial (eNOS/NOS3) (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

Todas as isoformas dependem do substrato L-arginina bem como dos cofatores/coenzimas Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH), Tetrahidrobiopterina (BH₄), Dinucleotídeo de Flavina e Adenina (FAD), Mononucleotídeo de Flavina (FMN), oxigênio (O₂) e protoporfirina IX sendo que a formação de ON é proveniente da conversão de L-arginina em L-citrulina. Inicialmente ocorre a hidroxilação de um dos hidrogênios da L-arginina para gerar NG-hidroxi-L-Arginina (NHA), mediante a presença de NADPH e oxigênio, na sequência ocorre a conversão da NHA em L-citrulina e ON. NOS1 e NOS3 produzem concentrações de ON da ordem de nanomolares por curto período, a

NOS2 produz concentrações de ON em micromolares por períodos de horas ou dias. (FRANK et al., 2002)

A formação do ON pode ocorrer de forma dependente ou não de Cálcio. A NOS2 é induzida transcricionalmente por estímulos produzidos por várias células do sistema imunológico de uma forma independente de cálcio. Já as isoformas nNOS e eNOS, foram agrupadas como cNOS, têm sua atividade dependente de cálcio permitindo que elas se liguem à proteína calmodulina. (BOGDAN, 2015).

Figura 2 – Síntese do óxido nítrico

Fonte: Adaptado de FREIRE, 2009.

Outra fonte de ON ocorre por dois processos de redução. No primeiro, o nitrato é reduzido a nitrito e na sequência é reduzido em ON. Observou-se que após a exposição à radiação UV, nitrato ou nitrito passam a produzir ON, e portanto são vias de produção de ON independente das isoformas (SUSCHEK; OPLÄNDER; VAN FAASSEN, 2010).

Com uma variedade de propriedades e funções no organismo as isoformas podem ser inibidas por diversas substâncias, utilizadas tanto em células

isoladas como *in vivo*. A NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-Lornitina (L-NIO), NG-amino-L-arginina (L-NAA), NG-nitro-L-arginina (L-NA), NG-nitro-L-arginina-metil-éster competem com a L-arginina na reação de síntese e atuam como inibidores específicos da NOS. A aminoguanidina é um inibidor específico da NOS2 que também age por competição com o sítio de ligação da L-arginina existente no grupo heme da enzima e a NG-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) e foi identificada como um potente inibidor de todas as isoformas (BOGDAN, 2015).

O nitroprussiato de sódio (NPS) é um sal de sódio, fotossensível e solúvel em água, composto por ferro e óxido nítrico e cinco ânions cianeto e utilizado tanto *in vitro* como *in vivo* como doador de radicais nitrados. É um potente vasodilatador que reage com outras moléculas para produzir ON, porém sua prescrição deve ser feita com cautela pois os ânions de cianeto podem causar toxicidade. (HOTTINGER et al., 2014)

O ON exerce suas funções através de duas vias de sinalização celular, uma dependente e outra independente da monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). Pela via dependente, o ON se difunde pela membrana plásmatica e tem como alvo o componente heme da enzima guanilato ciclase solúvel e produz cGMP resultando no relaxamento das células da musculatura lisa. A via independente de cGMP ocorre através modificação pós traducional que afeta a relação DNA-proteína através da S-nitrosilação. (Al-Shboul et al., 2018).

De forma indireta o ON pode reagir com espécies reativas de oxigênio para gerar espécies reativas de nitrogênio, como o peroxinitrito que interage com determinados fatores de transcrição desestruturando vias de sinalização celular por apoptose. (KUNDU; SURH, 2012). Há observação de que as modificações pós traducionais causadas pela ação do peroxinitrito são aumentadas em tecidos tumorais possivelmente porque o ON pode ser transportado para locais com baixa concentração de oxigênio, como tumores. (NAPOLI et al., 2013)

São consideradas baixas concentrações de ON, aquelas que estão entre 100 e 400 nM e podem favorecer a progressão tumoral através aumento de fatores como proliferação celular, angiogênese, metástase, proteção contra efeitos citotóxicos e diminuição da frequência da apoptose. Concentrações altas são aquelas maiores que 500 nM e podem causar maiores danos ao DNA, estresse

oxidativo, e aumento da apoptose e efeitos citotóxicos.(VANINI; KASHFI; NATH, 2015)

A produção de ON via NOS2 é considerada essencial durante a proliferação de células de melanoma, sugerindo que a expressão desta isoforma *in vivo* ou *in vitro* está envolvida desde as etapas iniciais do melanoma até uma possível metástase. Há pelo menos um estudo que ressalta a alta expressão da NOS2 em células tumorais relacionada a uma menor taxa de sobrevivência de pacientes com melanoma em estágio avançado, sugerindo que o ON produzido pela NOS2 contribui para a sobrevivência do tumor.(GODOY et al., 2012).

O ON é descrito na literatura como uma molécula que por desempenhar diversas funções no organismo, possui papel ambíguo no desenvolvimento da carcinogênese. Em geral as respostas celulares são mediadas pela concentração de ON em microambiente tumoral, baixas concentrações favorecem a progressão tumoral e a proliferação celular, altas concentrações de ON são citotóxicas para as células cancerígenas e causam apoptose (VAHORA et al., 2016).

1.10 Óxido nítrico e melanoma

As vias que levam a interação entre o ON e o melanoma não estão totalmente esclarecidas, embora haja indícios de correlação. Alguns estudos ressaltam o papel dúbio do ON no desenvolvimento deste tipo de tumor e descreveram algumas vias que são estudadas para relaciona-los. O ON pode influenciar no microambiente tumoral podendo limitar ou estimular a proliferação do melanoma, através da interação com citocinas, células do sistema imunológico, inibição da apoptose e, elevadas concentrações de ON indicam um mau prognóstico para pacientes com melanoma. Além disso, melanócitos normais produzem NO através da cNOS e NOS2 e nos melanomas ocorre maior expressão de NOS2. (YARLAGADDA et al., 2017)

Uma das vias atualmente explorada está relacionada com a resposta imunológica dada à tumores tipo melanoma. No sistema imunológico, macrófagos utilizam a NOS2 para expressar altas concentrações de NO o qual influencia no processo inflamatório ocasionado por tumores de melanoma levando a dispersão

das células tumorais do sistema imunológico, promovendo a proliferação e a invasão das células cancerosas para outros tecidos.(PIENIAZEK; MATKOWSKI; DONIZY, 2018).

A despeito da influência do ON no desenvolvimento da carcinogênese, incluindo melanoma, há diversas informações na literatura que salientam que o papel do ON na carcinogênese é dependente de sua concentração podendo tanto favorecer quanto inibir a proliferação do câncer, porém há poucas citações sobre o papel do ON na radioresistência de melanoma. Tendo em vista que o melanoma é descrito como um tumor que apresenta resistência aos efeitos das radiações ionizantes e o ON um importante sinalizador no desenvolvimento da carcinogênese, justifica-se a necessidade de elucidar os efeitos da produção ou inibição do ON na radioresistência de tumores de melanoma irradiados.

2 OBJETIVOS

Avaliar o potencial radiomodificador de um doador de radicais de nitrogênio - Nitroprussiato de Sódio (NPS) e de um inibidor da NOS, L-NG-nitro-arginina metil éster (L-NAME) em culturas celulares de melanoma humano (SK-MEL-37), através de ensaios de genotoxicidade e citotoxicidade.

2.1 Objetivos Específicos

- Determinar concentrações citotóxicas (e não-tóxicas) de NPS e L-NAME em células SK-MEL-37 mediante ensaios de viabilidade celular.
- Tratar culturas de SK-MEL-37 com concentrações não-tóxicas de NPS ou L-NAME e irradiá-las, com o intuito de observar se há alteração da fração de sobrevivência ou da dose letal mediante tratamento com as substâncias-teste.
- Avaliar possível indução de genotoxicidade ou perda de potencial proliferativo em cultivos de células de melanoma humano *in vitro* causadas pela administração de doadores de radicais de nitrogênio ou inibidores da síntese de ON.

3 MATERIAL E METODOS

3.1 Cultura Celular

Foram utilizadas células de melanoma humano (SK-MEL-37, CVCL_3878, Memorial Sloan-Kettering Câncer Center, Nova Iorque). O cultivo celular desenvolveu-se em garrafas estéreis de 25 cm² em meio de cultura- RPMI 1640 com vermelho de fenol (Vitrocell - Embriolife), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB – GIBCO-BRL) e 1% de Antibióticos (Penicilina, Estreptomicina – GIBCO-BRL). As substituições do meio de cultura aconteceram a cada 48 h de incubação, até atingir a confluência aproximada de 70% para que ocorresse o subcultivo. Todos os experimentos foram realizados utilizando culturas que sofreram ao menos duas etapas de subcultivo após descongelamento. Durante a realização de todos os ensaios, as culturas celulares foram incubadas em uma estufa sempre sob as mesmas condições de temperatura (37°C) e umidade (5% CO₂ e 95% O₂).

3.2 Irradiações

Células SK-MEL-37 foram tripsinizadas e ressuspensas em 1 mL de solução fosfato-salina (PBS) e divididas em tubos para centrifuga estéreis de 15 mL (CORNING COSTAR CORP, NY, EUA) que já continham 5 mL de solução fosfato-salina tamponada (PBS). Cada tubo foi identificado com uma das doses de 0,5; 1; 2; 4; 8 e 16 Gy e mais um tubo com o controle que não foi irradiado, mas que permaneceu do lado de fora do irradiador durante todo o tempo de experimento. As irradiações ocorreram a temperatura ambiente em um equipamento modelo GammaCell 220 (Irradiation Unit of Canadian Atomic Energy Commission, Ltd.), presente no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR-IPEN/CNEN-SP) utilizando blindagem de chumbo metálico correspondente a 90% de atenuação da energia da radiação, dependendo da atividade da fonte. Nas ocasiões das irradiações, a taxa de dose da fonte variou de 190 a 194 kGy/h. Após as irradiações, as suspensões foram centrifugadas e as proporções de células viáveis determinadas através da

contagem no hematocítômetro das células inviáveis mediante incorporação do corante azul de tripano.

Em outros experimentos, as células receberam tratamento em concentrações não tóxicas de L-NAME ou NPS, determinadas por ensaios de citotoxicidade, que foram diluídos em meio de cultura e adicionadas separadamente ao meio de cultura por um período de 24 horas anterior a irradiação. Após o tratamento, o meio com o inibidor foi retirado, e as células irradiadas como descrito.

3.3 Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado para a determinação de concentrações tóxicas e não tóxicas de NPS e L-NAME.

3.3.1 Ensaio de citotoxicidade - Preparo dos radiomodificadores

Foi utilizado como inibidor da óxido nítrico sintase o L-NAME (N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride; C₇H₁₅N₅O₄.HCl; 269,69 g/mol; CAS: 51298-62-5), diluído em meio RPMI 1640 em concentrações que variaram entre 100 e 1000 μ M. O doador de radicais nitrados foi o NPS (Nitroprussiato de Sódio Diidratado; Na₂[Fe(CN)₅NO].2H₂O; CAS 13755-38-9), que foi diluído em meio RPMI 1640 concentrações entre 10 e 1000 μ M.

3.3.2 Ensaio de citotoxicidade - Controles positivo e negativo

Controles positivos foram realizados a partir de células em poços tratados com 100 μ L de extrato de látex, produzido com 4 cm² de látex (luva cirúrgica sem talco) em contato com meio de cultura por 24h a 37 °C. Após este período, o extrato foi esterilizado por filtração (0,22 μ m) antes do uso. Controles negativos foram células que receberam, além de meio de cultura, 5 μ L de solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) estéril. Além disso, foi utilizado como controle (CC) células cultivadas em meio RPMI 1640 sem adição de qualquer composto.

3.3.3 Ensaio de citotoxicidade - Viabilidade celular

A fim de observar as proporções de proliferação celular de cada uma das amostras tratadas ou não tratadas optou-se por utilizar o método colorimétrico avaliado através da capacidade das desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas ou vivas em converter o composto MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio), CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, N° Cat. G1112) na presença de PMS (metossulfeto de ferazina, Sigma-Aldrich, CAS 299-11-6).

As células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de meio de cultura. Foi preparado uma solução com 20 µL de suspensão celular e 20 µL de azul de tripano, corante de exclusão que penetra apenas em células inviáveis já que elas são permeabilizadas, corando-as em azul. Desta solução foram retirados 10 µL que foram transferidos para o hematocitômetro para a contagem das células viáveis.

Após a contagem as suspensões celulares foram ajustadas para 10.000 células viáveis em um volume de 100 µL de meio por poço e semeadas na placa de 96 poços em octuplicatas e ficaram incubadas por 24 h. Após o tempo de incubação o meio foi sugado e adicionado 100 µL das soluções contendo os controles positivo, negativo e CC, além dos modificadores L-NAME e NPS nas concentrações citadas anteriormente e, novamente incubadas por 24 horas.

Encerrado o período de incubação, o meio de cultura foi retirado e os poços lavados com 100 µL de PBS a 37 °C. O PBS foi aspirado e foi adicionado 20 µL/poço de solução composta de MTS (2 mg/mL de PBS) (Promega, Madison, WI) e PMS (0,92 mg/mL de PBS) (Promega, Madison, WI), na proporção 19:1, solubilizados em meio RPMI (19µL MTS: 1µL PMS: 100µL de meio RPMI). A quantidade de produto formada foi determinada pela absorvância de 490 nm e é proporcional ao número de células viáveis em cultura. A leitura foi realizada em leitor de microplaca (Multiskan EX, Labsystems), 2 horas após a incubação com o reagente. Os valores de absorvância obtidos foram convertidos em porcentagens de viabilidade celular sendo que o valor máximo, considerado como 100%, foi representado por células não tratadas.

3.4 Ensaio de potencial clonogênico – Formação de colônias

Para avaliar o potencial clonogênico, as células foram tratadas com concentrações não tóxicas de L-NAME ou NPS diluídas em meio de cultura e incubadas durante 24 horas.

Após o período de tratamento, o meio de cultura foi retirado e as células foram tripsinizadas e centrifugadas. O pellet formado foi ressuspensionado em PBS e dividido na mesma quantidade, em tubos previamente identificados com para irradiação nas doses 0,5; 1; 2; 4; 8 e 16 Gy e mais um tudo controle

Após a irradiação, as células foram centrifugadas e os pellets formados foram ressuspensionados em meio de cultura. Para determinar as frações viáveis, foi utilizado 20 µL da suspensão celular em 20 µL de corante azul de tripano seguido por contagem no hematocitômetro.

Após contagem, as células viáveis foram ajustadas para a concentração 600 células por poço diluídas em 3mL de meio de cultura, semeadas em placas de 6 poços (CORNING COSTAR CORP) e incubadas. Cada amostra referente à uma dose foi feita em triplicata.

Cerca de 10 a 12 dias após semeadura, o meio foi removido e as células foram lavadas com 3 mL de PBS e fixadas com 3 mL de metanol por 30 minutos. O metanol foi descartado e as placas ficaram secando em temperatura ambiente por 30 minutos. Na sequência, as células foram coradas com 2,5 mL de corante Giemsa, diluído 1/20 em tampão fosfato (0,02M Na₂HPO₄; 0,004M KH₂PO₄, água deionizada q.s.p. 1L), pH 6,8.

Apenas colônias com número de células maior ou igual a 50 foram contabilizadas no contador de colônias CP 600 (Phoenix). Os resultados foram expressos em eficiência de plaqueamento (EP) e fração de sobrevivência (FS).

$$EP = (n^{\circ} \text{ de colônias contadas}) / (n^{\circ} \text{ de células semeadas}) \times 100 \quad (1)$$

$$FS = n^{\circ} \text{ de colônias contadas em cultura tratada} / 600 \times (\text{média EP}/100) \quad (2)$$

Os valores de frações de sobrevivência foram ajustados à equação de crescimento exponencial:

$$EP = Y = e^{-(A-B \cdot X - C \cdot X^2)} \quad (3)$$

onde Y é correspondente aos valores obtidos de frações de sobrevivência e X as doses de radiação utilizadas. Os coeficientes obtidos após os ajustes foram comparados pelo teste F das somas dos quadrados para comparar-se as regressões obtidas para cada tratamento.

3.5 Ensaio de genotoxicidade

Todos os experimentos de citometria de fluxo foram realizados no equipamento Accuri CSampler (BD Biosciences), equipado com alimentador automático de amostras e presente no Laboratório de Radiobiologia do Centro de Biotecnologia IPEN/CNEN-SP.

3.5.1 Controles positivos e negativos

Foi utilizado como controle positivo agente aneugênico a colchicina e agente clastogênico a mitomicina.

3.5.2 Tratamento com L-NAME e NPS e irradiação

No primeiro dia deste ensaio as células foram tripsinizadas e divididas em quatro placas para os controles (NaCl, Mitomicina, Colchicina e controle) e uma placa com células que receberam o tratamento.

No segundo dia de ensaio as células foram lavadas com 3 mL de PBS e receberam os controles NaCl, Mitomicina, Colchicina, de 60 e 500 µM de NPS e

6,4 μ M de L-NAME e o controle que recebeu meio de cultura e foram incubadas por 24 horas.

No terceiro dia o meio de cultura foi removido e as células foram tripzinizadas e centrifugadas à 1500 rpm por 5 minutos. O pellet formado foi ressuspensionado em PBS sem EDTA e dividido em tubos previamente identificados com as doses 0,5; 1; 2; 4; 8 e 16 e mais um tubo para um controle que foi tratado, mas não foi irradiado.

Após a irradiação as células foram centrifugadas, incluindo os controles, e os pellets formados foram ressuspensionados em 1 mL meio de cultura. Para determinar as frações viáveis, foi utilizado 20 μ L da suspensão celular em 20 μ L de corante azul de tripano seguido por contagem no hematocitometro.

As células foram ajustadas para 20.000 células por poço em 100 μ L de meio de cultura e foram semeadas em placas de 96 poços e foram incubadas por 48 horas.

3.5.3 Ensaio de frequência de micronúcleos por citometria de fluxo

Após 48 horas de incubação (quinto dia de ensaio) as células foram centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos à 20°C. O sobrenadante foi sugado e foi adicionado 50 μ L por poço da solução de brometo de etídio monoazida (Thermo-Fisher Scientific, E1374) (EMA) a uma concentração de 8,5 μ g / mL diluída em PBS sem EDTA suplementado com 2% de soro fetal bovino.

As placas de cultura foram abertas e expostas a uma fonte de luz azul led (440-450nm, 30W) durante 30 minutos à 4 °C, para fotoativação do composto.

Este procedimento teve como objetivo marcar eficientemente células que não deveriam ser incluídas na contagem de núcleos e micronúcleos, além de fornecer alguma medida de citotoxicidade, pois o corante EMA associou-se apenas com o DNA de células não viáveis.

Após esta etapa, as células receberam 100 μ L de soma solução com PBS suplementado com 2% soro bovino fetal e foram centrifugadas à 1500 rpm por 10 minutos à 20°C, para a remoção do corante livre. Todas as etapas seguintes foram feitas na ausência de luz.

3.5.4 Etapas de Lise

Após as células serem centrifugadas o sobrenadante foi sugado de todos os poços e então ocorreu a adição de duas soluções de lise com a finalidade de liberar núcleos e micronúcleos e corar seu DNA.

Na primeira solução de lise foi adicionado em cada poço da placa 100µL de solução composta por cloreto de sódio (0.854mg / mL), citrato de sódio (1 mg / mL) e o detergente IGEPAL® (0,3 µL / mL), assim como 0.4µM SYTOX® Green (corante fluorescente) (Thermo Fisher- Scientific, S7020). Esta solução também continha RNase A (Sigma, SLB5176V) na concentração de 500 µg/mL, para que moléculas de RNA residual não pudessem se associar aos corantes, modificando a aquisição dos sinais de fluorescência pelo equipamento. O material foi incubado por 60 minutos a 37 °C ao abrigo da luz.

As placas foram retiradas da estufa e receberam 100 µL da segunda solução de lise que continha (sacarose 85,6 mg / mL, ácido cítrico 15 mg / mL e SYTOX® Green 0,4 µM), suplementadas com esferas de látex AccuCheck® Counting Beads (Thermo-Fisher Scientific, PCB 100), que possuem cerca de 6 µm de diâmetro na concentração de 5 µL/poço. O material foi incubado por mais 45 minutos em temperatura ambiente antes da aquisição dos eventos no citômetro de fluxo (Accuri CSampler, BD Biosciences).

3.5.5 Análise dos dados obtidos por citometria de fluxo

Os dados foram coletados em octuplicatas como percentagens de eventos negativos para EMA e eventos MN positivos para SYTOX , os resultados foram dados como alterações em comparação com os poços controle (células não irradiadas e não tratadas) a partir da sua razão do número encontrado nos controles de células (*fold-increase*, múltiplos ou submúltiplos das quantidades observadas nos controles).

Os eventos marcados com EMA foram excluídos da contagem total. Os eventos com SYTOX foram avaliados de acordo com seu tamanho no canal FSC e fluorescência no canal FL1, para discriminação entre núcleos e micronúcleos. A

proporção entre os núcleos e esferas de látex foi usada para encontrar diferenças nas proporções da divisão celular entre os grupos e pelo menos 20.000 eventos coletados na região dos núcleos foram contados em cada amostra. A estratégia para análise é mostrada na figura 3.

Figura 3 - Estratégia de gating. (A) FSC x SSC, com evidência das beads de contagem; (B) Exclusão de doublets (eventos duplos); (C) Consideração de eventos que possuem ao menos 1/100 da fluorescência do maior pico em FL1, discriminado como representante de eventos de células em G0/G1; (D) Remoção de eventos que não atendem a quesitos de tamanho (Front Scatter); (E) Remoção de eventos que não atendem a quesitos de rugosidade/complexidade (Side Scatter); (F) Determinação das regiões com eventos relevantes, vindos de células viáveis (SYTOX+/EMA-) ou a ser removidos, vindos de células inviáveis (SYTOX+/EMA+). Aspecto típicos dos plots e quantidades de núcleos e micronúcleos (MN) encontrados em controles de células (G) e positivos (mitomicina) (H).

Fonte: Autora da dissertação

3.6 Ensaio de ciclo celular

O ensaio de ciclo celular seguiu o seguinte esquema:

- Ensaio 1: células tratadas com 60 μ M de NPS e irradiadas.
- Ensaio 2: células tratadas com 500 μ M de NPS e irradiadas.
- Ensaio 3: células tratadas com 6,4 μ M de L-NAME e irradiadas.
- Ensaio 4: células que não receberam tratamento e foram irradiadas (controle - CC).
- Ensaio 5: células que foram tratadas e não foram irradiadas

3.6.1 Marcação fluorescente

No primeiro dia de ensaio as células com confluência em aproximadamente 70%, tiveram seu meio de cultura sugado e foram lavadas com 3 mL de PBS sem EDTA. As células receberam 3 mL de meio de cultura sem soro bovino fetal e foram incubadas por 24 horas.

Esta etapa do ensaio teve como objetivo sincronizar o ciclo celular de forma que a maioria das células esteja em G0/G1, desta forma a radiosensibilidade das populações celulares é uniforme, e as possíveis variações detectadas serão mais provavelmente derivadas dos tratamentos, e não de flutuações devidas à fase do ciclo em que estas células foram irradiadas.

No segundo dia de ensaio as células tiveram o meio de cultura sem soro bovino fetal descartado e receberam tratamento com 3 mL de uma das concentrações 60 μ M de NPS, 500 μ M de NPS ou 6,4 μ M de L-NAME ou meio de cultura com soro bovino no caso do ensaio controle no qual as células foram irradiadas sem receber tratamento.

No terceiro dia de experimento as células foram tripsinizadas e centrifugadas o pellet foi ressuspenso em PBS e dividido em tubos previamente identificados com as doses de irradiação e controle.

Após a irradiação, as células foram centrifugadas e o *pellet* ressuspenso em meio de cultura, transferidas para placas de Petri e incubadas por 4h. O meio de cultura de cada placa foi recolhido e transferido para tubos de 15

mL previamente identificados. As células foram tripsinizadas e transferidas para o tubo que já continha o respectivo meio de cultura, foram centrifugadas e o *pellet* ressuspendido em 1 mL de PBS com EDTA à temperatura de 4 °C. Para a fixação das células, as suspensões celulares foram pipetadas vagarosamente para outros novos tubos identificados, que continham 9 mL de Etanol 70% a -20°C e armazenadas à -20 °C por até 5 dias.

3.6.2 Permeabilização e marcação fluorescente

As células fixadas foram centrifugadas e o *pellet* reidratado em 1 mL de PBS com EDTA a 4 °C. Logo após, as suspensões celulares foram centrifugadas novamente e ressuspendidas em 200 µL de uma solução com 195 µL de PBS, 1% de soro fetal bovino, 0,1% de Triton® X-100 e 5 µL do corante fluorescente para ácidos nucleicos 7AAD (7-Aminoactinomicina D, BD Cat. N° 559925, 50ng/ µL) e RNase A (500 µg/mL). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos, protegidas da luz para leitura no citômetro de fluxo.

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi feita usando o programa GraphPadPrism (versão 7.0) para elaboração dos gráficos e tabelas. Para a comparação dos dados entre os diferentes tratamentos foi utilizado ANOVA One-way e Teste de múltiplas comparações de Dunnett a fim de verificar a significância estatística das diferenças de viabilidade celular encontradas em células tratadas com diferentes concentrações de L-NAME e NPS.

Os dados da fração de sobrevivida foram ajustados a uma função exponencial (4) para traçar a curva de sobrevivência celular. Os valores da dose foram ajustados pelo logaritmo neperiano (base “e”) e adaptados a uma curva sigmoide dose-resposta (5) para cálculo de DL_{50%} de células irradiadas.

$$FS = e^{(\alpha X - \beta X^2)} \quad (4)$$

$$FS = Bottom + (Top-Bottom)/(1+e^{((LogDL50-X)*HillSlope)}) \quad (5)$$

Onde X são as doses absorvidas de radiação em Gy, α e β são os coeficientes linear e quadrático, respectivamente.

Nos experimentos com células irradiadas, os dados obtidos foram comparados por two-way ANOVA, e os grupos foram comparados interdependentemente pelo pós-teste segundo Bonferroni.

4 RESULTADOS

4.1 Ensaio de micronúcleo por citometria de fluxo em células de melanoma humano irradiadas.

. As figuras 4, 5, 6 e 7 mostram os resultados obtidos através do ensaio de frequência de micronúcleo por citometria de fluxo. Na figura 4, observa-se o ajuste das frequências de micronúcleos à equação polinomial de segundo grau, mostrando que a técnica é capaz de detectar tais proporções de forma adequada ao modelo clássico de quantificação de dano ao DNA por exposição à radiação (modelo linear sem limiar, *linear non-threshold*, *LNT*).

Figura 4 - Frequências de micronúcleos em relação ao controle não-irradiado (0Gy), ajustadas ao modelo polinomial de segunda ordem. Encaixe: Equação calculada e coeficiente de ajuste.

Fonte: Autora da dissertação

A figura 5 permitiu avaliar o dano genotóxico causado pelos efeitos das radiações ionizantes nas células de melanoma humano, SK-MEL-37, que não

receberam tratamento com NPS ou L-NAME. O aumento da frequência de micronúcleos indica a ocorrência do dano genotóxico, o qual é observado a partir da dose 16 Gy.

Figura 5 - Frequências de micronúcleos em relação ao controle não-irradiado (0Gy). (*) = $p < 0,05$, e (****) = $p < 0,00001$. (MTMC): controle positivo, Mitomicina. Barras: Erro padrão das médias (SEM).

Fonte: Autora da dissertação

A figura 6 mostra que a proporção apreciável de morte celular se inicia na dose 4 Gy.

Figura 6 - Proporção de células inviáveis (EMA⁺) em relação aos controles. (*), (**), (***) e (****) correspondem a $p < 0,05$, $0,01$, $0,001$ e $0,0001$, respectivamente, em relação aos controles (0Gy). (MTMC): controle positivo, Mitomicina. Barras: Erro padrão das médias (SEM).

Fonte: autora da dissertação

A capacidade da radiação em retardar a velocidade do ciclo celular foi avaliada através da relação entre as esferas de látex (beads) e os núcleos. Uma quantidade constante de *beads* foi inserida na amostra durante o ensaio de frequência de micronúcleos nas etapas de lise 1 e 2, uma vez que a quantidade de núcleos é variável, pois depende do dano genotóxico sofrido, é possível estimar a redução ou aumento da proliferação celular através da razão núcleos/esferas de látex. A figura 7 mostra que apenas doses iguais ou maiores a 8Gy são capazes de induzir redução da velocidade do ciclo refletindo na redução da proliferação celular.

Figura 7- Relação entre número de núcleos e esferas de látex (beads), representando diferenças da velocidade de duplicação celular entre os grupos., (**) = $p < 0,01$, (***) = $p < 0,0001$. (MTMC): controle positivo, Mitomicina. Barras: Erro padrão das médias (SEM).

Fonte: autora da dissertação.

Observa-se que os efeitos das radiações ionizantes nas células de melanoma humano, SK-MEL-37, são observados nas doses dose 4, 8 e 16 Gy, devido a ocorrência de eventos relacionados a morte celular e redução na proliferação celular. Provavelmente o ciclo celular o foi mantido pela ativação dos *checkpoints* para o reparo do dano até a dose 4 Gy quando se inicia a morte celular refletindo na redução da proliferação celular em 8 Gy e no dano irreparável observado na dose 16 Gy.

4.2 Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado para determinar concentrações tóxicas e não tóxicas dos modificadores NPS, um doador de nitrogênio, e L-NAME como inibidor da enzima óxido nítrico sintase e conseqüentemente da produção de ON. A figura 9 mostra a viabilidade celular de células de melanoma humano

tratadas com concentrações entre 10 e 1000 μM do doador de nitrogênio – nitroprussiato de sódio (NPS).

Figura 8 - Porcentagens de células viáveis em culturas tratadas com NPS. (●), (●●), (●●●) e (●●●●) correspondem a $p < 0,05$, 0,01, 0,001 e 0,0001, respectivamente, em relação aos controles (0). (-): controle negativo, NaCl. (+): controle positivo, extrato de látex. Barras: Erro padrão das médias (SEM).

Fonte: Autora da dissertação

Os resultados apresentados na figura 9 mostram um fraco efeito citotóxico na cultura celular tratada com NPS, com pequenas diferenças estatísticas encontradas nas culturas tratadas nas concentrações 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 1000 μM . As concentrações 500, 600 e 700 μM de NPS estimularam um ligeiro aumento na proliferação celular.

A figura 10 mostra a viabilidade celular das células de melanoma humano (SK-MEL-37) tratadas com concentrações entre 100 e 1000 μM do inibidor da óxido nítrico sintase, L-NAME.

Figura 9 - Curva de toxicidade de concentrações de L-NAME em culturas de Sk-MEL-37. Valores de $IC_{50\%}$ e $IC_{10\%}$ indicam as concentrações de L-NAME capazes de induzir mortalidade em 50 ou 10% da das células, respectivamente.

Fonte: autora da dissertação.

O tratamento realizado com L-NAME mostrou-se tóxico sendo que o valor da concentração inibitória (IC_{50}) necessária para inibir a viabilidade celular em 50% foi de 14,8 μM e a inibição de 10% (IC_{10}) da viabilidade celular é 6,4 μM.

Para os ensaios de genotoxicidade e ciclo celular foram escolhidas as concentrações 60 μM e 500 μM de NPS sendo a primeira uma concentração suavemente tóxica e a segunda que estimulou discreta proliferação celular. Com relação à L-NAME, optou-se por testar a concentração 6,4 μM sendo referente a um valor mínimo de toxicidade.

4.3 Fração de sobrevivência e DL50 das células de melanoma humano irradiadas e tratadas com NPS e L-NAME.

O ensaio de formação de colônias avaliou se o aumento ou a redução de ON provocou alterações na radioresistência das células. A análise ocorreu através dos dados referentes a fração de sobrevivência e DL₅₀%, dose necessária para reduzir em 50% a cultura celular. A figura 10 mostra as modificações na fração de sobrevivência devido ao tratamento realizado com as concentrações de 60 e 500 μ M de NPS, doadoras de ON, e 6,4 μ M de L-NAME se comparadas com o controle (NT) que não recebeu tratamento.

Figura 10 - As curvas foram ajustadas ao modelo linear quadrático (A) ou sigmoidal (B) em função da dose de radiação.

Fonte: autora da dissertação

A tabela 1 indica as alterações na radioresistência na cultura celular devido ao tratamento realizado com as concentrações 60 e 500 μ M de NPS e 6,4 μ M de L-NAME.

Tabela 1-: Valores dos coeficientes obtidos a partir dos dados dos valores da fração de sobrevivência das células SK-MEL-37 irradiadas de 0 a 8Gy. (α) e (β) são coeficientes lineares e quadráticos respectivamente, (β/α) é o coeficiente de radiosensibilidade. NT: células não tratadas e irradiadas.

Coeficiente	NT	60 μ M NPS	500 μ M NPS	6,4 μ M L-NAME
β (quadrático)	0,03544 $\pm$ 0,08482	0,04510 $\pm$ 0,03054	-0,02429 $\pm$ 0,02324	0,004767 $\pm$ 0,04527
α (linear)	-0,3382 $\pm$ 0,02044	-0,2310 $\pm$ 0,07490	-0,6003 $\pm$ 0,07375	-0,4036 $\pm$ 0,1541
β/α	-0,1048 $\pm$ 0,03086	-0,1953 $\pm$ 0,1901	0,04047 $\pm$ 0,03494	0,01181 $\pm$ 0,1085
R^2	0,9993	0,9832	0,9844	0,8838
DL _{50%}	4,365	6,371	2,124	12,62

A relação entre os coeficientes linear e quadrático (α/β) é tida como um parâmetro clássico da radiosensibilidade celular, que considera não só a linhagem celular em questão, como também a fase do ciclo celular no qual se encontra a célula. Os valores obtidos se ajustaram satisfatoriamente às equações exponencial (4) e logarítmica (5) conforme é demonstrado pelos valores de R^2 . Houve a prevalência do coeficiente quadrático (β), resposta típica encontrada em experimentos com radiação de baixa transferência linear de energia (TLE).

Observa-se que para reduzir em 50% a cultura celular foi necessária uma dose de 4,365 Gy, referente ao controle não tratado (NT). O tratamento com 60 μ M de NPS promoveu o aumento da radioresistência refletindo em uma DL_{50%} (6,371 Gy) maior que a do controle. A concentração de 500 μ M NPS tornou as células mais radiosensíveis verificada na redução da DL_{50%} para 2,124 Gy. Por último, concentração de 6,4 μ M L-NAME aumentou consideravelmente a radioresistência das células conforme observado na DL_{50%} de 12,62 Gy.

4.4 Ensaio de micronúcleo por citometria de fluxo em células de melanoma humano irradiadas e tratadas com NPS e L-NAME.

A ensaio de frequência de micronúcleos foi realizado para determinar o dano genotóxico causado pela exposição as radiações ionizantes. A cultura celular recebeu tratamento com as concentrações de 60 e 500 μM de NPS e 6,4 μM de L-NAME, foi exposta a uma fonte ^{60}Co e irradiadas nas doses 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 Gy. As figuras 11, 12, 13, 14 e 15 mostram os núcleos após as etapas de lise 1 e 2 e antes de ocorrer a leitura das amostras no citômetro de fluxo

Figura 11.- Cultura celular que não recebeu tratamento nem irradiação após as etapas de lise 1 e 2. EMA: núcleos com a coloração vermelha. Sytox Green: Núcleos com a coloração verde. Beads: coloração azul.

Fonte: Autora da dissertação

Figura 12 - Cultura celular que recebeu o controle positivo Mitomicina, após as etapas de lise 1 e 2. EMA: núcleos com a coloração vermelha. Sytox Green: Núcleos com a coloração verde. Beads: coloração azul.

Fonte: Autora da dissertação

Figura 13 - Cultura celular que recebeu a concentração de 60 μ M após as etapas de lise 1 e 2. EMA: núcleos com a coloração vermelha. Sytox Green: Núcleos com a coloração verde. Beads: coloração azul

Fonte: Autora da dissertação

Figura 14 - Cultura celular que recebeu a concentração de 500 μM de NPS após as etapas de lise 1 e 2. EMA: núcleos com a coloração vermelha. Sytox Green: Núcleos com a coloração verde. Beads: coloração azul

Fonte: Autora da dissertação

Figura 15 - Cultura celular que recebeu a concentração de 6,4 μM de L-NAME após as etapas de lise 1 e 2. EMA: núcleos com a coloração vermelha. Sytox Green: Núcleos com a coloração verde. Beads: coloração azul

Fonte: Autora da dissertação

A figura 16 mostra que a cultura celular sem receber tratamentos com NPS ou L-NAME teve dano genotóxico a partir de 16 Gy, conforme verificado nos resultados exibidos anteriormente na figura 5.

Figura 16- Frequências de micronúcleos das células de melanoma humano irradiadas que não receberam tratamento. (**) = $p < 0,01$, (***) = $p < 0,01$ e (****) $p < 0,0001$. (MTMC): controle positivo, Mitomicina; (COLCH): controle positivo, Colchicina; (NaCl): controle negativo, cloreto de sódio. Barras: Erro padrão das médias (SEM).

Fonte: Autora da dissertação

As figuras 17, 18 e 19 são referentes ao ensaio de micronúcleo por citometria de fluxo, nos quais as células foram previamente tratadas 60 e 500 μ M de NPS e 6,4 μ M de L-NAME e irradiadas em uma fonte de ^{60}Co nas doses 0,5; 1; 2; 4; 8 e 16 Gy.

A figura 17 mostra que o aumento de ON promovido pela concentração de 60 μ M induziu o dano genotóxico em doses maiores ou iguais à 8 Gy, ou seja, uma dose menor do que aquela observada no controle (figura 16)

Figura 17- Frequências de micronúcleos em células de melanoma humano tratadas com 60 μ M de NPS e irradiadas. (*)= $p < 0,05$, (**) = $p < 0,01$ e (****) = $p < 0,0001$. (MTMC): controle positivo, Mitomicina; (COLCH): controle positivo, Colchicina; (NaCl): controle negativo, cloreto de sódio. Barras: Erro padrão das médias (SEM).

Fonte: Autora da dissertação

Na figura 18 a concentração de 500 μ M de NPS induziu níveis de dano genotóxico a partir da dose 16 Gy, ou seja, semelhante à dose encontrada no controle.

Figura 18- Frequências de micronúcleos em células de melanoma humano tratadas com 500 μ M de NPS e irradiadas. (**)= $p<0,01$, (****)= $p<0,0001$. (MTMC): controle positivo, Mitomicina; (COLCH): controle positivo, Colchicina; (NaCl): controle negativo, cloreto de sódio. Barras: Erro padrão das médias (SEM).

Fonte: autora da dissertação

A figura 19 mostra que a cultura celular tratada com 6,4 μ M L-NAME não apresentou dano genotóxico. Contrariamente, apresentou quantidades de micronúcleos menores do que as encontradas nos controles.

Figura 19- Frequência de micronúcleos das células de melanoma humano tratadas com 6,4 μ M de L-NAME e irradiadas. (MTMC): controle positivo, Mitomicina. (COLCH): controle positivo, Colchicina. (NaCl): controle negativo, Cloreto de Sódio. Erro padrão das médias (SEM). (*) = $p < 0,05$; (****) = $p < 0,0001$.

Fonte: Autora da dissertação

As figuras 20, 21, 22 e 23 mostram as razões núcleos/beads denotando as diferenças na proliferação da cultura celular, SK-MEL-37.

A redução da proliferação celular começou na dose 2 Gy na cultura celular que não foi tratada com NPS ou L-NAME, conforme mostrado na figura 20.

Figura 20- Mostra as razões núcleos/beads na cultura celular irradiada que não recebeu tratamento. (MTMC): controle positivo, Mitomicina. (COLCH): controle positivo, Colchicina. (NaCl): controle negativo, Cloreto de Sódio. Erro padrão das médias (SEM). (***) = $p < 0,001$; (****) = $p < 0,0001$.

Fonte: Autora da dissertação

Na figura 21, o tratamento com 60 μM de NPS reduziu a proliferação celular nas doses 8 e 16 Gy. Provavelmente o ciclo celular foi mantido de forma a não alterar a proliferação celular até 8 Gy.

Figura 21- Razão núcleos/beads da cultura celular tratada com 60 μM de NPS. (MTMC): controle positivo, Mitomicina. (COLCH): controle positivo, Colchicina. (NaCl): controle negativo, Cloreto de Sódio. Erro padrão das médias (SEM). (*) = $p < 0,05$; (****) = $p < 0,0001$.

Fonte: Autora da dissertação

A figura 22 mostra que tratamento com 500 μM de NPS promoveu a redução na proliferação celular na dose 16 Gy.

Figura 22- Razão núcleos/beads da cultura celular tratada com 500 μM de NPS. (MTMC): controle positivo, Mitomicina. (COLCH): controle positivo, Colchicina. (NaCl): controle negativo, Cloreto de Sódio. Erro padrão das médias (SEM). (**) = $p < 0,01$; (****) = $p < 0,0001$.

Fonte: Autora da dissertação

Com relação a cultura celular tratada com 6,4 μM de L-NAME proporcionou a redução da proliferação celular na amostra controle (0 Gy), porém as doses 0,5; 1 e 2 houve o aumento da proliferação celular, sugerindo que L-NAME acelerou o ciclo celular até a dose 2 Gy como uma forma proteger as células do dano.

Figura 23- Razão núcleos/beads da cultura celular tratada com 6,4 μ M de L-NAME. MTMC): controle positivo, Mitomicina. (COLCH): controle positivo, Colchicina. (NaCl): controle negativo, Cloreto de Sódio. Erro padrão das médias (SEM). (**) = $p < 0,01$; (****) = $p < 0,0001$.

Fonte: Autora da dissertação.

4.5 Ciclo Celular

As alterações no ciclo celular devido ao tratamento com NPS e L-NAME podem ser observadas na figura 24.

Figura 24 - Proporção de células que não receberam tratamento e foram irradiadas. (B): Proporção de células tratadas com 60 μM de NPS. (C): Proporção de células tratadas com 500 μM de NPS. (D): Proporção de células tratadas com 6,4 μM de L-NAME.

Fonte: Autora da dissertação

A figura 24A mostra que a maioria das células estão ou em G0/G1 e na fase S. Em 24B, o tratamento com a concentração de 60 μM de NPS acelerou o ciclo celular de modo que a maioria das células estão em síntese, fase onde ocorre a duplicação do DNA o mesmo efeito é verificado no tratamento com a concentração 6,4 μM L-NAME, conforme a figura 24D.

O tratamento feito com a concentração 500 μM NPS, figura 24C, a maioria das células encontram-se na fase de síntese em todas as doses, mas repete um padrão menos homogêneo, semelhante ao encontrado nos controles não-irradiados do que aquele encontrado nas culturas tratadas por 60 μM de NPS ou 6,4 μM L-NAME.

5 DISCUSSÃO

O estudo foi planejado para avaliar o papel do óxido nítrico na radioresistência de células de melanoma humano, um tipo de tumor descrito na literatura como resistente às radiações ionizantes. Foi utilizado um inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME) e um doador de nitrogênio (NPS) nos ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e potencial clonogênico, realizados para averiguar alterações na radioresistência do melanoma.

Primeiramente, foram realizados ensaios nos quais as células, SK-MEL-37 foram irradiadas sem receber tratamento com NPS ou L-NAME. A linhagem celular de melanoma humano, SK-MEL-37, apresentou uma $DL_{50\%}$ no valor de 4,3 Gy (tabela 1). O ensaio de frequência de micronúcleo mostrou que o dano genotóxico irreparável começou da dose 16 Gy (figura 5).

A redução putativa da concentração de óxido nítrico, obtida através da aplicação do inibidor da óxido nítrico sintase, L-NAME, na concentração de 6,4 μ M, aumentou consideravelmente a radioresistência da cultura celular (tabela 1) e protegeu contra o dano genotóxico inclusive em doses altas como 16 Gy, (figura 19). Este efeito radioprotetor pode ter redistribuído o ciclo celular, no qual as células passaram mais rápido G0/G1 para a fase S, refletindo em um aumento na proliferação celular nas doses 0,5; 1 e 2 Gy (figura 23).

O tratamento com 60 μ M de NPS tornou as células mais radioresistentes elevando o valor da $DL_{50\%}$ para 6,3 Gy (tabela 1). Houve a ocorrência de um aumento de danos no DNA que se iniciou na dose 8 Gy, refletindo na redução da proliferação celular (figura 21). Como resposta às irradiações e uma forma de reparar o dano, considerou-se que esta concentração pode ter promovido a passagem mais rápida da fase G0/G1 para a fase S ou paralisando o ciclo na fase S (figura 24B).

Por fim, a concentração de 500 μ M de NPS tornou a cultura celular mais sensível aos efeitos da radiação ionizante refletindo em um valor menor de $DL_{50\%}$ de 2,12 Gy. Contudo, nos ensaios de frequência de micronúcleos observamos que o aumento de ON protegeu a cultura celular do dano genotóxico. Se comparada

com o controle (figura 24A) esta concentração promoveu alterações no ciclo celular com a redistribuição da maior parte das células para as fases S e G2/M, consideradas radioresistentes.

Sendo assim, a concentração de 500 μ M de NPS sensibilizou as células do melanoma humano, porém não foram encontradas relações com os ensaios de gentoxicidade e ciclo celular. Alguns estudos relatam o NPS como um doador bio redutivo de ON que pode radiosensibilizar células tumorais sob condições de hipóxia (KURIMOTO et al., 1999). Considerando-se que um dos desafios na radioterapia é vencer a hipóxia tumoral, o ON também pode ser utilizado como um potente radiosensibilizador, assim como o oxigênio, pois ele pois sua difusão ocorre célula por célula e para dentro da massa tumoral pelo chamado efeito espectador (COOK et al., 2004).

Menores concentrações de ON podem reduzir a apoptose e favorecer a progressão tumoral. Além disso, a redução de ON intracelular levaria à formação de quantidades menores de peroxinitrito, composto altamente lesivo e forte provocador de quebras nas fitas duplas do DNA. É razoável avaliar a sua redução como fator que pode contribuir para a diminuição da frequência de quebras no DNA. (VANINI; KASHFI; NATH, 2015).

A relação entre a presença de óxido nítrico e a fisiologia tumoral é oscilante, e os efeitos de sua quantidade intracelular variam não só quantitativamente quanto qualitativamente. Para compreender esta relação, foram testadas concentrações de ON em células de adenocarcinoma mamário humano (MCF7). As baixas concentrações de ON favoreceram a apoptose como uma resposta à radiação, e alteraram as vias que dependem de cGMP nas concentrações entre 1-30 nM. Altas concentrações de ON promovem respostas citostática e apoptótica ativando a fosforilação da p53 em concentrações maiores que 400 nM e induzindo o estresse nitrosativo em concentrações maiores que 1 μ M (NARAYANAN et al., 2017).

A paralização do ciclo celular pode estar relacionada com a p53, que controla processos de senescência, parada do ciclo celular e apoptose para reparar o dano causado pela exposição as radiações ionizantes. A indução da parada do ciclo celular se inicia com o dano que afeta a integridade do DNA dando início ao

processo de fosforilação da proteína ATM (ataxia telangiectasia mutada) que, por sua vez fosforila a p53. A ativação da p53 aumenta a expressão do inibidor de quinase dependente de ciclina, p21, que inibe a produção das proteínas CDK4 e CDK6, que desempenham um papel importante na regulação do ciclo celular, promovendo a paralisação do ciclo celular em G1. Além disso, o aumento da expressão de p21 também bloqueia a transição da fase G2 para a fase M (MAIER et al., 2016).

A redução de ON via inibição da NOS2 também favorece a redistribuição do ciclo celular. Alguns testes com o flavonoide Nobiletin (NOB) em células de câncer de cólon humano (HCT116) indicaram que a redução da expressão da NOS2 promoveu a paralisação das células nas fases G0/G1 e em G2/M provavelmente por alterações em vias de sinalização relacionadas com a progressão do ciclo celular como aquelas dependentes de ciclinas e quinases dependentes de ciclina (WU et al., 2017)

A redução de ON, em células de tumor de mama humano (MCF7) irradiadas em doses entre 0,5 e 8 Gy, e tratadas com um inibidor da NOS2, a aminogunidina, nas concentrações de 1 e 2 mM, mostrou resultados semelhantes aos deste trabalho. A administração da aminoguanidina promoveu alterações na radioresistência das células sendo que a concentração de 1mM aumentou a frequência de danos, induziu a perda de potencial clonogênico refletindo em um valor menor de $DL_{50\%}$, portanto tornou as células mais radiosensíveis. O tratamento realizado com a concentração de 2 mM aparentemente reduziu o dano genotóxico (FONSECA; OCAMPO; VIEIRA, 2019).

Um estudo explorou em diversas linhagens o papel do NO como um modulador que pode promover a parada do ciclo celular em etapa além a fase G2, embora impedindo a entrada na metáfase, ocorrendo através de mecanismos distintos que dependem da concentração de ON, e que inibem a proliferação celular sem exercer efeitos citotóxicos. De todos os mecanismos a via melhor caracterizada que é afetada pelo NO é aquela dependente do aumento da expressão do inibidor da quinase ciclina dependente de p21.(VILLALOBO, 2006). Assim, a inibição da expressão de NOS2 causada pela administração de L-NAME impediria a paralisação do ciclo celular em G2/M, justamente as fases do ciclo em

que as células estão mais radiosensíveis devido ao nível baixo de empacotamento, e assim aumentaria sua resistência.

Os efeitos das radiações ionizantes foram testados em duas linhagens de melanoma, a WM115 (tumor primário) e WM266-4 (sítio metastático, pele). As células foram irradiadas de duas maneiras distintas: uma com fonte de fótons X (320 keV), nas doses 2, 4 e 6 Gy e outra fonte de núcleos ^{12}C ou ^{16}O nas doses 0,5, 1 e 2 Gy. A análise da distribuição do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo e os resultados demonstraram que ambas modalidades de radiação promoveram a retenção das células nas fases G2 e M, e a quantidade de células nesta fase aumentou conforme a dose. A parada do ciclo celular nesta fase indica altas quantidades de lesões no DNA fazendo com que as células não passassem pelo *checkpoint* da fase G2/M, o que acaba por iniciar a apoptose. (ANINDITHA et al., 2019)

Uma outra consideração a ser feita com relação ao efeito protetor da inibição do ON, é aquele relacionado com a inibição das enzimas de reparo. Um primeiro mostrou que há uma relação entre o processo inflamatório observado na carcinogênese está relacionado com a ativação da NOS2 e a produção excessiva de ON em resposta a citocinas inflamatórias causam danos no DNA e inibem as proteínas de reparo promovendo a progressão da carcinogênese. (JAISWAL et al., 2000). As enzimas PARP (Poli-Adenosina difosfato-Ribose-Polimerase) estão envolvidas no reparo do DNA, e são ativadas em resposta a diversos danos causados no DNA, inclusive os oxidativos, aumenta os efeitos citotóxicos das radiações ionizantes. (PERALTA-LEAL et al., 2009). Foi demonstrado que a terapia com PARP juntamente com doadores de ON administrada em cultura celular com deficiência no gene BRCA 1 tornou as células mais sensíveis as radiações ionizantes. (WILSON et al., 2019).

Neste estudo não foram realizados ensaios de sobre cadeias de morte celular. Porém Zhang e colaboradores avaliaram o papel da senescência como resposta ao dano causado pela exposição a doses de raios X e íons pesados, na dose 10Gy. Foram utilizadas duas linhagens celulares a melanoma maligno humano (A375) e fibroblastos de pulmão (MRC5) e os resultados demonstraram que radiação realizada com raios X e raios gama e íons pesados podem induzir a senescência celular tanto nas células normais (MRC5) quanto nas cancerosas

(A375) por uma via que envolve as proteínas p53 e p21 em resposta ao dano. E a formação de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, que promovem o processo de senescência (ZHANG et al., 2016).

Há relatos de estudos sendo desenvolvidos com o intuito de utilizar o ON como terapia no tratamento do câncer, incluindo melanoma. Logo, a abordagem apresentada neste trabalho pode proporcionar novas perspectivas para futuras investigações sobre as vias que relacionam a radioresistência do melanoma com os doadores de ON e os mecanismos que levam à inibição da NOS como fator protetor das células de melanoma humano.

6 CONCLUSÃO

As alterações nas concentrações de óxido nítrico podem tornar a cultura celular de melanoma humano, SK-MEL-37, mais resistentes ou sensíveis aos efeitos das radiações ionizantes, sendo dependente da concentração, bem como dos inibidores ou doadores de ON.

- Redução da expressão de NO por L-NAME aumentou drasticamente a radioresistência ($DL_{50\%}$), na medida em que reduziu o dano genotóxico radio induzido e retarda a proliferação celular, com paralisação na fase S.
- Efeito é observado em menor medida em tratados por 60 μ M de NPS. Neste caso, pode ter ocorrido resposta compensatória (do óxido nítrico e a célula para de produzir NO).
- Os efeitos da 500 μ M NPS parecem ser lesivos por atuarem em mecanismos alheios à genotoxicidade e controle de ciclo celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAN, A.; ALIZADA, G.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y.; NALBANT, A. Flow cytometry: basic principles and applications. ***Critical reviews in biotechnology***, v. 37, n. 2, p. 163–176, 2017.

ANINDITHA, K. P.; WEBER, K. J.; BRONS, S.; DEBUS, J.; HAUSWALD, H. In vitro sensitivity of malignant melanoma cells lines to photon and heavy ion radiation. ***Clinical and Translational Radiation Oncology***, v. 17, p. 51–56, 2019.

BANDARCHI, B.; JABBARI, C. A.; VEDADI, A.; NAVAB, R. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. ***Journal of Clinical Pathology***, v. 66, n. 8, p. 644–648, 2013.

BASKAR, R. et al. Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. ***International Journal of Medical Sciences***, v. 9, n. 3, p. 193–199, 2012.

BENADA, J.; MACUREK, L. Targeting the checkpoint to kill cancer cells. ***Biomolecules***, v. 5, n. 3, p. 1912–1937, 2015.

BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An update. ***Trends in Immunology***, v. 36, n. 3, p. 161–178, 2015.

BONAVIDA, B. Preface. **Nitric Oxide and Cancer: Pathogenesis and Therapy**, p. v–ix, 2015.

BRYCE, S. M.; BEMIS, J. C.; AVLASEVICH, S. L.; DERTINGER, S. D. In vitro micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity. ***Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis***, v. 630, n. 1-2, p. 78-91, 2007.

CAË, S. LE. Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H₂ Production under Ionizing Radiation. **Water**, v. 3 p. 235–253, 2011.

CASTEDO, M.; PERFETTINI, J. L.; ROUMIER, T.; ANDREAU, K.; MEDEMA, R.; KROEMER, G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2825–37, 2004.

CHENG, L.; LOPEZ-BELTRAN, A.; MASSARI, F.; MACLENNAN, G. T.; MONTIRONI, R. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: A move toward precision medicine. **Modern Pathology**, v. 31, n. 1, p. 24–38, 2018.

COOK, T., WANG, Z., ALBER, S., LIU, K., WATKINS, S. C., VODOVOTZ, Y.; BILLIAR, T. R.; BLUMBERG, D. Nitric oxide and ionizing radiation synergistically promote apoptosis and growth inhibition of cancer by activating p53. **Cancer Research**, v. 64, n. 21, p. 8015–8021, 2004.

DE JAGER, T. L.; COCKRELL, A. E.; DU PLESSIS, S. S. Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species. **Springer**, Cham, p. 15-23, 2017.

DE RIDDER, M. et al. Hypoxic tumor cell radiosensitization through nitric oxide. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 164–169, 2008.

DEEKS, E. D. Pembrolizumab: A Review in Advanced Melanoma. **Drugs**, v. 76, n. 3, p. 375–386, 2016.

DESOUKY, O.; DING, N.; ZHOU, G. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 8, n. 2, p. 247–254, 2015.

DIEPGEN, T.; MAHLER, V. Epidemiology of skin cancer. **Neuroendocrinology Letters**, v. 146, p. 1–6, 2002.

ERIKSSON, D.; STIGBRAND, T. Radiation-induced cell death mechanisms. ***Tumor Biology***, v. 31, n. 4, p. 363–372, 2010.

ESPENEL, S.; VALLARD, A.; RANCOULE, C.; GARCIA, M. A.; GUY, J. B.; CHARGARI, C.; DEUTSCH, E., MAGNÉ, N. Melanoma: Last call for radiotherapy. ***Critical Reviews in Oncology/Hematology***, v. 110, p. 13-19, 2016.

FEI, P.; EL-DEIRY, W. S. P53 and radiation responses. ***Oncogene***, v. 22, n. 37, p. 5774–5783, 2003.

FERTIL, B.; MALAISE, E. P. Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: Analysis of 101 published survival curves. ***International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics***, v. 11, n. 9, p. 1699–1707, 1985.

FONSECA, D. C.; OCAMPO, I. Z.; VIEIRA, D. P. Genotoxic and anti-proliferative effects of aminoguanidine on gamma-irradiated MCF-7 breast cancer cells. ***Brazilian Journal of Radiation Sciences***, v. 7, n. 1, 2019.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. ***European Heart Journal***, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

FRANK, S. et al. Nitric oxide drives skin repair: Novel functions of an established mediator. ***Kidney International***, v. 61, n. 3, p. 882–888, 2002.

FREIRE, M. A. M.; GUIMARÃES, J. S.; GOMES-LEAL, W.; PEREIRA, A. Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord. ***Frontiers in neuroscience***, v. 3, p. 24, 2009.

GODOY, L. C.; ANDERSON, C. T.; CHOWDHURY, R.; TRUDEL, L. J.; WOGAN, G.

N. Endogenously produced nitric oxide mitigates sensitivity of melanoma cells to cisplatin. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, v. 109, n. 50, p. 20373–20378, 2012.

GRANADOS-PRINCIPAL, S.; LIU, Y.; GUEVARA, M. L.; BLANCO, E.; CHOI, D. S.; QIAN, W.; ZHAO, H. Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. ***Breast Cancer Research***, v. 17, n. 1, p. 1–16, 2015.

GUIDELINE, D.; CONSIDERATIONS, I. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE 487 : In Vitro Micronucleus Test. v. 2004, p. 1–13, 2004.

HAYASHI, M. The micronucleus test — most widely used in vivo genotoxicity test. ***Genes and Environment***, p. 4–9, 2016.

HAYWARD, N. K.; WILMOTT, J. S.; WADDELL, N.; JOHANSSON, P. A.; FIELD, M. A.; NONES, K.; JAKROT, V. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. ***Nature***, v. 545, n. 7653, p. 175–180, 2017.

HELMBACH, H.; ROSSMANN, E.; KERN, M. A.; SCHADENDORF, D. Drug-resistance in human melanoma. ***International Journal of Cancer***, v. 93, n. 5, p. 617–622, 2001.

HERSKIND, C.; WENZ, F. Radiobiological aspects of intraoperative tumour-bed irradiation with low-energy X-rays (LEX-IORT). ***Transl Cancer Res***, v. 3, n. 1, p. 3–17, 2014.

HOTTINGER, D. G.; BEEBE, D. S.; KOZHIMANNIL, T.; PRIELIPP, R. C.; BELANI, K. G. Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. ***Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology***, v. 30, n. 4, p. 462, 2014.

HUANG, Z.; FU, J.; ZHANG, Y. Nitric Oxide Donor-Based Cancer Therapy: Advances and Prospects. ***Journal of Medicinal Chemistry***, v. 60, n. 18, p. 7617–

7635, 2017.

Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso: 20 de março de 2019.

INGHAM, M.; SCHWARTZ, G. K. Cell-cycle therapeutics come of age. ***Journal of Clinical Oncology***, v. 35, n. 25, p. 2949–2959, 2017.

JAISWAL, M.; LARUSSO, N. F.; BURGART, L. J.; GORES, G. J. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. ***Cancer Research***, v. 60, n. 1, p. 184–190, 2000.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. ***Nature***, v. 432, n. 7015, p. 316–323, 2004.

KHAN, M. K.; KHAN, N.; ALMASAN, A.; MACKLIS, R. Future of radiation therapy for malignant melanoma in an era of newer, more effective biological agents. ***OncoTargets and Therapy***, v. 4, p. 137–148, 2011.

KIM, P. K.; ZAMORA, R. U. B. E. N.; PETROSKO, P.; BILLIAR, T. R. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. ***International Immunopharmacology***, v. 1, n. 8, p. 1421–1441, 2001.

KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Emerging avenues linking inflammation and cancer. ***Free Radical Biology and Medicine***, v. 52, n. 9, p. 2013–2037, 2012.

KURIMOTO, M.; ENDO, S.; HIRASHIMA, Y.; HAMADA, H.; OGIICHI, T.; TAKAKU, A. L. GROWTH inhibition and radiosensitization of cultured glioma cells by nitric oxide generating agents. ***Journal of neuro-oncology***, v. 42, n. 1, p. 35-44, 1999.

LIN, J. Y.; FISHER, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 843–850, 2007.

LOMAX, M. E.; FOLKES, L. K.; O'NEILL, P. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: Relevance to radiotherapy. **Clinical Oncology**, v. 25, n. 10, p. 578–585, 2013.

MAIER, P.; HARTMANN, L.; WENZ, F.; HERSKIND, C. Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1, 2016.

MAIER, P.; WENZ, F.; HERSKIND, C. Radioprotection of normal tissue cells. **Strahlentherapie und Onkologie**, v. 190, n. 8, p. 745–752, 2014.

MCCOURT, C.; DOLAN, O.; GORMLEY, G. Malignant melanoma: A pictorial review. **Ulster Medical Journal**, v. 83, n. 2, p. 103–110, 2014.

MISHRA, H.; MISHRA, P. K.; EKIELSKI, A.; JAGGI, M.; IQBAL, Z.; TALEGAONKAR, S. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 144, n. 12, p. 2283–2302, 2018.

MOELLER, B. J.; RICHARDSON, R. A.; DEWHIRST, M. W. Hypoxia and radiotherapy: Opportunities for improved outcomes in cancer treatment. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 26, n. 2, p. 241–248, 2007.

MULLER, P. A. J.; VOUSDEN, K. H. Mutant p53 in cancer: New functions and therapeutic opportunities. **Cancer Cell**, v. 25, n. 3, p. 304–317, 2014.

AL-SHBOUL, O. A.; MUSTAFA, A. G.; OMAR, A. A.; AL-DWAIRI, A. N.; ALQUDAH,

M. A.; NAZZAL, M. S.; AL-HADER, R. A. Effect of progesterone on nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling and contraction in gastric smooth muscle cells. **Biomedical Reports**, p. 511–516, 2018.

NAPOLI, C.; PAOLISSO, G.; CASAMASSIMI, A.; AL-OMRAN, M.; BARBIERI, M.; SOMMESE, L.; INFANTE, T.; IGNARRO, L. J. Effects of nitric oxide on cell proliferation: Novel insights. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 2, p. 89–95, 2013.

NARAYANAN, D. L.; SALADI, R. N.; FOX, J. L. Ultraviolet radiation and skin cancer. **International Journal of Dermatology**, v. 49, n. 9, p. 978–986, 2010.

NARAYANAN, I. V.; PAULSEN, M. T.; BEDI, K.; BERG, N.; LJUNGMAN, E. A.; FRANCA, S.; VELOSO, A.; MAGNUSON, B.; DI FAGAGNA, F. A.; WILSON, T.E.; JUNGMAN, M. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the ionizing radiation response by ATM and p53. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 1–11, 2017.

NASTI, T. H.; TIMARES, L. MC1R, eumelanin and pheomelanin: Their role in determining the susceptibility to skin cancer. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 1, p. 188–200, 2015.

NEILL, U. S. Skin care in the aging female: myths and truths. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 2, p. 473–477, 2012.

ORONSKY, B. T.; KNOX, S. J.; SCICINSKI, J. J. Is Nitric Oxide (NO) the Last Word in Radiosensitization? A Review. **Translational Oncology**, v. 5, n. 2, p. 66–71, 2012.

PAJIC, J.; JOVICIC, D.; PS MILOVANOVIC, A. Micronuclei as a marker for medical screening of subjects continuously occupationally exposed to low doses of ionizing radiation. **Biomarkers**, v. 22, n. 5, p. 439–445, 2017.

PAWLIK, T. M.; KEYOMARSI, K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, v. 59, n. 4, p. 928–942, 2004.

PERALTA-LEAL, A.; RODRÍGUEZ-VARGAS, J. M.; AGUILAR-QUESADA, R.; RODRÍGUEZ, M. I.; LINARES, J. L.; DE ALMODÓVAR, M. R.; OLIVER, F. J. PARP inhibitors: New partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 47, n. 1, p. 13–26, 2009.

PERSHING, N. L.; YANG, C. F. J.; XU, M.; COUNTER, C. M. Treatment with the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME provides a survival advantage in a mouse model of *Kras* mutation-positive, non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, v. 7, n. 27, 2016.

PFEIFER, G. P.; BESARATINIA, A. UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochemical and Photobiological Sciences*, v. 11, n. 1, p. 90–97, 2012.

PIENIAZEK, M.; MATKOWSKI, R.; DONIZY, P. Macrophages in skin melanoma-the key element in melanomagenesis (Review). *Oncology Letters*, v. 15, n. 4, p. 5399–5404, 2018.

PREMI, S.; WALLISCH, S.; MANO, C. M.; WEINER, A. B.; BACCHIOCCHI, A.; WAKAMATSU, K.; BECHARA, E. J. H.; HALABAN, R.; DOUKI, T.; BRASH, D.E. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. *Science*, v. 347, n. 6224, p. 842–847, 2015.

RASTRELLI, M.; TROPEA, S.; ROSSI, C. R.; ALAIBAC, M. Melanoma:epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In vivo*, v. 28, n. 6, p. 1005-1011, 2014.

READ, J.; WADT, K. A. W.; HAYWARD, N. K. Melanoma genetics. *Journal of*

Medical Genetics, v. 53, n. 1, p. 1–14, 2015.

SANTIVASI, W. L.; XIA, F. Ionizing Radiation-Induced DNA Damage, Response, and Repair. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 2, p. 251–259, 2013.

SCHADENDORF, D.; VAN AKKOOI, A. C.; BERKING, C.; GRIEWANK, K. G.; GUTZMER, R.; HAUSCHILD, A.; STANG, A.; ROESCH, A.; UGUREL, S. Melanoma. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 971–984, 2018.

SCHAU, D.; MCBRIDE, W. H. Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 9, p. 527–540, 2015.

SHAIN, A. H.; YEH, I.; KOVALYSHYN, I.; SRIHARAN, A.; TALEVICH, E.; GAGNON, A.; DRUMMER, J.N.; PINCUS, L.; RUBEN, B.; RICKABY, W.; D'ARRIGO, C.; ROBSON, A.; BASTIAN, B. C. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 20, p. 1926–1936, 2015.

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345–358, 2016.

SHTIVELMAN, E.; DAVIES, M. A.; HWU, P.; YANG, J.; LOTEM, M.; OREN, M.; FLAHERTY, K.T.; FISHER, D. E. Pathways and therapeutic targets in melanoma. **Oncotarget**, v. 5, n. 7, 2014.

STROJAN, P. Role of radiotherapy in melanoma management. **Radiology and Oncology**, v. 44, n. 1, p. 1–12, 2010.

SUN, X.; KIM, A.; NAKATANI, M.; SHEN, Y.; LIU, L. Distinctive molecular responses to ultraviolet radiation between keratinocytes and melanocytes. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 9, p. 708–713, 2016.

SUSCHEK, C. V.; OPLÄNDER, C.; VAN FAASSEN, E. E. Non-enzymatic NO production in human skin: Effect of UVA on cutaneous NO stores. ***Nitric Oxide - Biology and Chemistry***, v. 22, n. 2, p. 120–135, 2010.

TÍMÁR, J. et al. Genetic progression of malignant melanoma. ***Cancer and Metastasis Reviews***, v. 35, n. 1, p. 93–107, 2016.

TSAO, H.; OLAZAGASTI, J. M.; CORDORO, K. M.; BREWER, J. D.; TAYLOR, S. C.; BORDEAUX, J. S.; BEGOLKA, W. S. Early detection of melanoma: Reviewing the ABCDEs. ***Journal of the American Academy of Dermatology***, v. 72, n. 4, p. 717–723, 2015.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES et al. S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. ***Guidance for Industry***, v. 2, n. June, p. 1–31, 2012.

UNSCEAR. **United Nations Scientific Committee on Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR 2000)**. Disponível: https://www.unscear.org/docs/publications/2000/UNSCEAR_2000_Report_Vol.I.pdf. Acesso: 15 de setembro de 2019.

VAHORA, H.; KHAN, M. A.; ALALAMI, U.; HUSSAIN, A. The Potential Role of Nitric Oxide in Halting Cancer Progression Through Chemoprevention. ***Journal of Cancer Prevention***, v. 21, n. 1, p. 1–12, 2016.

VANINI, F.; KASHFI, K.; NATH, N. The dual role of iNOS in cancer. ***Redox Biology***, v.6, p. 334–343, 2015.

VIGNARD, J.; MIREY, G.; SALLES, B. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: A direct and indirect lighting up. ***Radiotherapy and Oncology***, v. 108, n. 3, p. 362–369, 2013.

VILLALOBO, A. Nitric oxide and cell proliferation. **FEBS Journal**, v. 273, n. 11, p. 2329–2344, 2006.

VOGIN, G.; FORAY, N. The law of Bergonié and Tribondeau: A nice formula for a first approximation. **International Journal of Radiation Biology**, v. 89, n. 1, p. 2–8, 2013.

WANG, W.; YU, Z.; SU, W. Ion irradiation and biomolecular radiation damage II . Indirect effect. **arXiv preprint arXiv:1004.4394**, 2010.

WANG, Y.; CHEN, C.; LOAKE, G. J.; CHU, C. Nitric oxide: promoter or suppressor of programmed cell death? **Protein & Cell**, v. 1, n. 2, p. 133–142, 2010.

WILSON, A.; MENON, V.; KHAN, Z.; ALAM, A.; LITOVCHICK, L.; YAKOVLEV, V. Nitric oxide-donor/PARP-inhibitor combination: A new approach for sensitization to ionizing radiation. **Redox Biology**, v. 24, n. February, p. 101169, 2019.

WONG, R.; GEYER, S.; WENINGER, W.; GUIMBERTEAU, J. C.; WONG, J. K. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 92–98, 2016.

WU, X.; SONG, M.; GAO, Z.; SUN, Y.; WANG, M.; LI, F.; ZHENG, J.; XIAO, H. Nobiletin and its colonic metabolites suppress colitis-associated colon carcinogenesis by down-regulating iNOS, inducing antioxidative enzymes and arresting cell cycle progression. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 42, p. 17–25, 2017.

XU, W.; MCARTHUR, G. Cell Cycle Regulation and Melanoma. **Current Oncology Reports**, v. 18, n. 6, 2016.

YARLAGADDA, K.; HASSANI, J.; FOOTE, I. P.; MARKOWITZ, J. The role of nitric oxide in melanoma. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1868, n. 2, p. 500-509, 2017.

YASUDA, H. Solid tumor physiology and hypoxia-induced chemo/radio-resistance: Novel strategy for cancer therapy: Nitric oxide donor as a therapeutic enhancer. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 205–216, 2008.

YU, Y. A novel combination treatment against melanoma with NRAS mutation and therapy resistance. **EMBO Molecular Medicine**, v. 10, n. 5, p. e8573, 2018.

ZHANG, X. et al. Both complexity and location of DNA damage contribute to cellular senescence induced by ionizing radiation. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–16, 2016.

ZHOU, L.; YUAN, R.; LANATA, S. Molecular Mechanisms of Irradiation-Induced Apoptosis. **National Institute of Health**, v. 8, p. 1–18, 2008.