

# Avaliação da presença de radicais de nitrogênio no potencial clonogênico de células de melanoma humano (SK-MEL-37)

Ana Cristina Gomes Nascimento, Leticia Bonfim e Daniel Perez Vieira  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

## INTRODUÇÃO

No mundo, o câncer de pele é o mais comum e pode ser classificado de duas formas, como melanoma e não melanoma. O melanoma, tem origem a partir de células de pigmentação da pele, melanócitos e pode ocorrer na pele, olhos, boca e intestino. Se manifesta habitualmente de duas formas, o carcinoma basocelular e o carcinoma espinocelular. Apesar de ter baixa incidência (2.920 casos novos em homens e 3.340 casos novos em mulheres) tem alta letalidade. Em 2012, o câncer de pele melanoma, representou 55.488 óbitos no mundo, devido à sua elevada propensão para produzir metástases, apresentando também uma alta taxa de recidiva e resistência tumoral. O melanoma é citado na literatura como radioresistente, sendo assim, terapias alvos como a radioterapia não são eficazes.<sup>(1) (2) (3)</sup>

O óxido nítrico (NO) é uma pequena molécula inorgânica sinalizadora gasosa que age no melanoma através de radicais livres e processos enzimáticos. Estudos demonstraram múltiplos papéis do NO na patologia do melanoma via vigilância imunológica, apoptose, angiogênese e na própria célula do melanoma. Desta forma, este trabalho visa avaliar o potencial radiomodificador de um doador de radicais de nitrogênio em cultura celular de melanoma humano (SK-MEL-37).<sup>(4)</sup>

## OBJETIVO

Avaliar possíveis efeitos da administração de um doador de radicais de nitrogênio (Nitroprussiato de Sódio) no potencial proliferativo de células de melanoma humano, SK-MEL-37, irradiadas por radiação gama.

## METODOLOGIA

Cultura celular: Linhagem celular de melanoma humano (SK-MEL-37, CVCL\_3878, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Nova Iorque) foi cultivada em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> em meio RPMI 1640 com vermelho de fenol (Vitrocell - Embriolife), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – GIBCO-BRL) e 1% de antibióticos (Penicilina, Pstreptomicina – GIBCO-BRL), incubadas a 37°C na presença de 5% de CO<sub>2</sub>.

Ensaio de Potencial Clonogênico: a cultura celular foi tratada com as concentrações de 60 e 500 µM de Nitroprussiato de Sódio (SNP, Sodium Nitroprusside, Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO]·2H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), diluído em RPMI 1640. As células (SK-MEL-37) foram incubadas por 24h antes da irradiação. Logo após as células foram tripsinizadas e o pellet ressuscitado em 1 mL de solução salina-tamponada fosfato (PBS, Phosphate Buffered Saline), e a suspensão foi fracionada em seis tubos estéreis identificados com as seguintes dosagens ( 0; 0,5; 1; 2; 4; e 8 Gy). Cada tubo foi irradiado em uma fonte de <sup>60</sup>Co, 70% de atenuação, localizado no Centro de Tecnologia das Radiações, IPEN/CNEN-SP, (GAMMA-CELL 220 - Irradiation Unit of Canadian Atomic Energy Commission, Ltd.). Após irradiação as células foram centrifugadas, e o pellet ressuscitado em 1mL de meio de cultura e as frações viáveis foram determinadas pela coloração do azul de tripano. As células viáveis foram semeadas, 600 células por poço e cultivadas até a obtenção de 50 células por colônia.

## RESULTADOS

A radiosensibilidade celular, o potencial clonogênico e a capacidade proliferativa foram avaliadas com ensaios de formação de colônias. Após tratamento com Nitroprussiato de sódio (NPS) em baixa concentração (60  $\mu\text{M}$ ) e doses acima de 0,5 Gy, observou-se radioproteção celular. Já na presença de uma alta concentração de NPS (500  $\mu\text{M}$ ) o NPS induziu efeitos opostos, de radiosensibilidade. No presente estudo podemos observar a  $DL_{50}$ , com uma queda no potencial proliferativo, a curva de sobrevivência da figura 1 que tende a decair. O NO demonstrou neste ensaio a sua atuação como um radiomodificador.

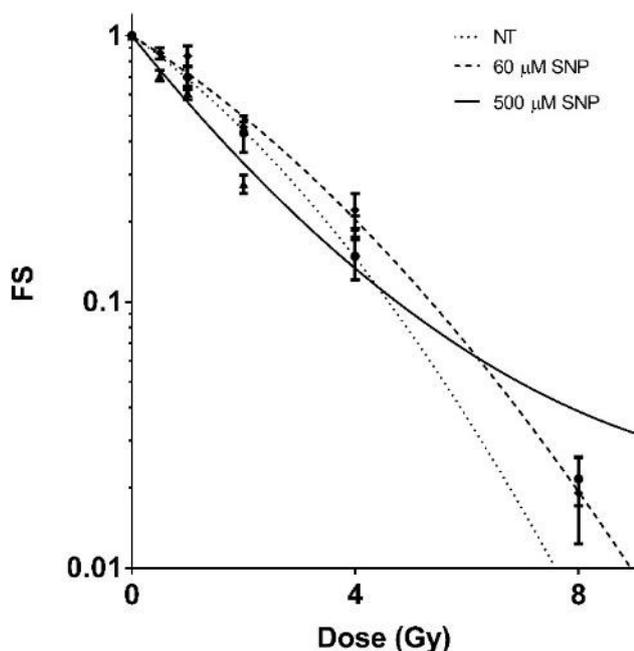


Figura 1 – Dose letal ( $DL_{50}$ ) de células de melanoma humano tratadas com concentrações de NPS.

## CONCLUSÕES

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos biológicos de um doador de óxido nítrico

(NO) em células de melanoma humano irradiadas por radiação gama. O NO produzido pela iNOS foi considerado importante na proliferação celular na linha celular de melanoma. Por meio de um doador de óxido nítrico analisamos colônias após irradiação, que demonstrou que este composto em baixas concentrações funciona como um radioprotetor para as células pois aumenta a curva de sobrevivência das mesmas. É expresso o oposto em altas concentrações que age como um radiosensibilizador para as células, deixando – as mais vulneráveis ao dano biológico causado por radiação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[85]INCA. Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil [Internet]. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2017. 130 p. Available.

[86]Instituto Nacional de Câncer, (INCA) C de P e V (Conprev). Fisiopatologia do câncer. Ações Enferm para o Control do câncer uma Propos Integr ensino-serviço. 2008;51.

[87]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*, 4, p. 137–148, 2011.

[88]Yarlagadda, K., Hassani, J., Foote, I. P., e Markowitz, J., *The role of nitric oxide in (BBA)-Reviews on Cancer*, v. 1868, p. 500-509, 2017.

## APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

### CNPQ/PIBIC