

MODULAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO POR PSORALENOS

DUARTE, Débora Teixeira¹; GUILLO, Lídia Andreu².

Palavras-chave: óxido nítrico, psoralenos, melanoma

1. INTRODUÇÃO

Os psoralenos são furocumarinas que apresentam atividade pigmentogênica sobre células epiteliais quando expostos à luz ultravioleta A (comprimento de onda de 320 a 400 nm). Têm sido largamente empregados no tratamento do vitiligo e lúpus eritematoso, entre outras afecções cutâneas, em um tratamento conhecido como terapia PUVA. Também são empregadas no tratamento do psoríase, através da inibição de proliferação celular (GASPARRO, 2000). Não se conhece completamente o mecanismo de ação desta droga.

O óxido nítrico (ON) é um dos compostos relacionados à pigmentogênese que pode estar envolvido no mecanismo de ação dos psoralenos. Gerado por uma família de isoenzimas através da catálise de L-arginina (SPRINGALL, 1995), o ON atua em diversos outros processos fisiológicos do organismo, como neurotransmissão, controle da pressão arterial e reações imunes (COSTA *et al.*, 2003).

A hipótese investigada no presente trabalho é a de que o tratamento PUVA possa interferir na produção de óxido nítrico e ser reponsável pelo efeito citotóxico sobre células de melanoma em cultura.

2. METODOLOGIA

Para a análise do efeito da terapia PUVA na síntese de óxido nítrico, empregaram-se células de melanoma humano da linhagem SKMel 37. Foram mantidas em frascos contendo meio MEM, antibióticos e fungicida em incubadora com 5% de CO₂ a 37 °C. Ao atingirem número suficiente para o experimento, foram plaqueadas em placas de petri, tratadas com diferentes concentrações de 4,5',8-trimetilpsoraleno (TMP), e irradiadas por 15 minutos por meio de uma lâmpada que emite raios UVA a uma fluência de 0,3 mW / cm². Em estudos prévios foi verificado que o tempo de irradiação de luz UVA de 15 minutos não interfere na viabilidade celular.

Após a irradiação as células foram mantidas em incubadora nas mesmas condições anteriormente citadas, por 24 e 48 horas, sendo o sobrenadante recolhido para dosagem após este período.

Procedeu-se à dosagem dos níveis de nitrito e nitrato (metabólitos do óxido nítrico) no meio de cultura e após a irradiação, através do método de Griess modificado. Para a dosagem de nitrito, adicionou-se de um volume adequado de sulfanilamida 2% e naftiletilenediamina 0,1% a 100 µL de amostra, e realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm em Leitor ELISA. Para a dosagem de nitrato, adicionou-se Cloreto de Vanádio, além dos demais reagentes, a 100 µL de amostra, e realizou-se a leitura da absorbância nas mesmas condições.

As concentrações de nitrito e nitrato nas amostras foram calculadas com base em curvas padrão de nitrito e nitrato de sódio, cujos valores de absorbâncias foram obtidos nas mesmas condições das amostras.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de nitrito e nitrato encontradas estão representadas nos gráficos a seguir:

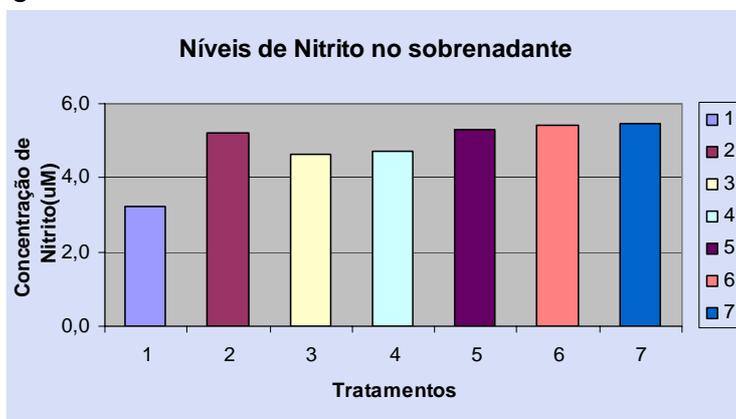
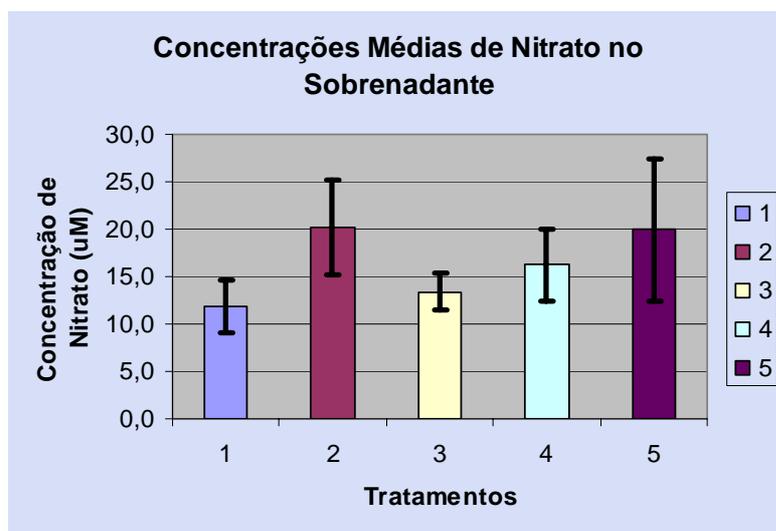


Figura 1: Gráfico das concentrações de nitrito presentes no meio de cultura após o tratamento com diferentes concentrações de TMP e irradiação com UVA. Os tratamentos estão delineados na tabela a seguir.

Amostra	Tempo (h)	Tratamentos			Abs	Concentração de nitrito (µM)	
		TMP					
		[4,3.10 ⁻³ M]	[4,3.10 ⁻⁴ M]	[4,3.10 ⁻⁵ M]			
1	24	X			X	0,013	3,2202
2	48	X			X	0,040	5,2261
3	48		X		X	0,028	4,6231
4	48		X		X	0,030	4,7236
5	48			X	X	0,041	5,2764
6	48			X	X	0,044	5,4271
7	48				X	0,045	5,4774

As maiores concentrações de nitrito observadas correspondem às amostras submetidas apenas à irradiação UVA, e os menores níveis, às amostras tratadas com a maior concentração de TMP ($4,3 \cdot 10^{-3}$ M) e recolhidas em 24 horas.



N°	Tratamento
1	TMP [4,3 . 10 ⁻³ M] + UVA 24h
2	TMP [4,3 . 10 ⁻³ M] + UVA 48h
3	TMP [4,3 . 10 ⁻⁴ M] + UVA 48h
4	TMP [4,3 . 10 ⁻⁵ M] + UVA 48h
5	Controle UVA 48h

Figura 2: Níveis de nitrato presentes no meio de cultura de células submetidas a tratamento com diferentes concentrações de 4, 5', 8-trimetilpsoraleno. O meio foi recolhido 24 ou 72 horas após o início do tratamento. Os valores apresentados representam a média de 3, 4 ou 5 experimentos. As linhas verticais representam o desvio padrão (SD) da média.

Os maiores níveis de nitrato foram encontrados nas amostras tratadas com TMP a $4,3 \cdot 10^{-3}$ M, após 48h, e nas amostras submetidas apenas à luz UVA. Os menores níveis correspondem às amostras tratadas com TMP, porém recolhidas após 24h.

Analisando todas as dosagens de nitrito e nitrato, observa-se que as concentrações de nitrato no sobrenadante foram maiores que as de nitrito para todos os tratamentos realizados.

4. Conclusão

Não foi possível demonstrar que o tratamento com 4, 5', 8-trimetilpsoraleno aumente ou diminua a produção de óxido nítrico em células de melanoma humano.

Entretanto, isso não exclui a possibilidade de que o ON esteja de alguma maneira envolvido no mecanismo de ação do TMP. Provavelmente a alteração na produção de ON provocada pelo tratamento é muito sutil para ser detectada pelo método colorimétrico empregado neste estudo.

5. Referências bibliográficas

COSTA, M. T. *et al.* The different roles of nitric oxide with focus on cancer. **Ciência Rural**. v.33, n.5, p.967-974, 2003.

GASPARRO, F.P. The role of PUVA in the treatment of psoriasis. Photobiology issues related to skin cancer incidence. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 6, 337-348, 2000.

SPRINGALL, D.R. Nitric oxide – Friend and foe. Editorial. **Journal Pathology**; v.165, p.165-166, 1995.

¹ Bolsista Voluntária de Iniciação Científica. Instituto de Ciências Biológicas – Laboratório de Biologia Celular, deborateixeiraduarte@hotmail.com

² Orientadora / Instituto de Ciências Biológicas / UFG, andreuguillo@aol.com