

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS -
FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA

AÇÃO FOTODINÂMICA DE AMIDAS GRAXAS SINTÉTICAS EM
CÉLULAS DE MELANOMA

Cíntia Duarte Mirco

Dissertação submetida como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, sob a orientação da Profa. Dra. Gilma Santos Trindade e co-orientação da Pós-Doutoranda Dra. Daza de Moraes Vaz Batista Filgueira, do Instituto de Ciências

RIO GRANDE, MAIO DE 2012.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	5
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO GERAL.....	9
INTRODUÇÃO GERAL	11
Objetivos	18
Objetivo geral.....	18
Objetivos específicos	18
Artigo	19
Viability Reduction of Melanoma Cells Under the Photodynamic Action Caused by Ultraviolet Radiation B Associated to a New Synthetic Fatty Acid Amide.....	19
Viability Reduction of Melanoma Cells Under the Photodynamic Action Caused by Ultraviolet Radiation B Associated to a New Synthetic Fatty Acid Amide.....	20
ABSTRACT.....	21
INTRODUCTION.....	22
MATERIALS AND METHODS	24
Cells and culture conditions	24
Synthesis of fatty acid amides.....	24
Treatment of cells.....	24
Synthetic fatty acid amides exposure	24
UVB exposure after OBA incubation	25
Sensitivity assessment of B16F10.....	25
Assessment of oxidative effects and DNA damage	25
Antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP)	26
DNA damage production	27
OBA+UVB association sensitivity comparison for melan-A cells	27
Statistical analysis	28
RESULTS	28
B16F10 cells sensitivity to OBA and RIBA assessment by MTT assay.....	28
Cells sensitivity to OBA + UVB assessment by MTT assay	29
Assessment of oxidative effects	29
DNA Damage.....	29
DISCUSSION	30
Acknowledgements	33

REFERENCES.....	35
FIGURE LEGENDS.....	40
Figure 1.....	42
Figure 2.....	43
Figure 3.....	44
Figure 4.....	45
Figure 5.....	46
CONCLUSÃO GERAL	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Gilma Santos Trindade pela amizade, carinho, compreensão e pela competência com que orientou esta minha dissertação e o tempo que generosamente me dedicou transmitindo-me os melhores e mais úteis ensinamentos, com paciência, lucidez e confiança. Pelo acesso que me facilitou a uma pesquisa enriquecedora e apaixonante, pelos bons conselhos e pela sua crítica sempre construtiva. A você professora minha profunda gratidão!

À Doutora Daza de Moraes Vaz Batista Filgueira que em muitos momentos trabalhou dobrado para que eu pudesse realizar os meus experimentos, por todos ensinamentos e pelas importantes contribuições e discussões no desenvolvimento de meu trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas-Fisiologia animal comparada por todos ensinamentos.

A todos os colegas do programa de pós-graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada, pela diversão, pelo aprendizado, pela convivência e amizade.

Aos colegas Flávio, Glauce, Thaís, Juliane e Sandrinha por toda a ajuda, pela generosidade em compartilhar seus conhecimentos e pelas palavras de conforto nos momentos de desespero. O meu muito obrigada!!!

Aos colegas de laboratório de cultura celular por contribuírem para o meu amadurecimento. Sou muito grata a vocês por isso.

Ao Márcio pela amizade, pelas conversas e bons conselhos.

Aos meus queridos colegas de trabalho do Instituto Federal do Rio Grande do Sul – IFRS: Milena, Ana Paula, Lúcia, Jerônimo, Andréia, Liliane.....pelas palavras de carinho, pela amizade e incentivo para que eu conseguisse concluir a minha tão sonhada dissertação de Mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Marco e Mara, que me ensinaram o valor de um sonho e me deram apoio, estrutura, amor e carinho para buscá-los. Vocês são a razão da minha vida. Amo vocês !!!

As minhas irmãs Deise e Pâmela que estiveram sempre ao meu lado em todas as etapas da minha vida.

Ao meu amor Guto, farol da minha travessia, por todo amor, paciência, companheirismo, por tudo que representas na minha vida!!!Te amo!

"A cada vitória o reconhecimento devido ao meu Deus, pois só Ele é digno de toda honra, glória e louvor" Senhor, obrigada pelo fim de mais essa etapa.

*Ainda bem que sempre existe outro dia. E outros sonhos. E outros risos.
E outras coisas. A vida, apesar de bruta, é meio mágica. Dá sempre
pra tirar um coelho da cartola. E lá vou eu, nas minhas tentativas, às
vezes meio cegas, às vezes meio arriscadas, tentar acertar os passos.
Sem me preocupar se a próxima etapa será o tombo ou o vôo. Eu sei que
vou. Insisto na caminhada. O que não dá é pra ficar parado. Se
amanhã o que eu sonhei não for bem aquilo, eu tiro um arco-íris da
cartola. E refaço. Colo. Pinto e bordo. Porque a força de dentro é
maior. Maior que todo mal que existe no mundo. Maior que todos os
ventos contrários. É maior porque é do bem. E nisso, sim, acredito até o
fim.*

Caio Fernando Abreu

Lista de abreviaturas

AF – Ação fotodinâmica

B16F10 – Células Tumorais de pele

EROs/ROS – Espécies reativas de oxigênio

EFM-19 - Células de carcinoma de mama humano

H₂DCF-DA - 2',7'- Diclorofluoresceína diacetato

LPO – Lipídeos peroxidados/ lipid peroxidation

melan-A – Células normais de pele (melanócitos)

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium

MCF-7 – Célula carcinoma mamário humano

MDA-MB-231 -Célula carcinoma mamário humano

MDR – Resistência a múltiplas drogas

2-metil-2'-F-anandamide (Met-F-AEA) - Análogo da amida graxa anandamida

OBA – Amida graxa sintética oleilbenzilamida

OBA+UVB – Ação fotodinâmica da amida OBA associado com radiação UVB

PBS – Tampão fosfato salino

RIBA – Amida graxa sintética ricinoleilbenzilamida

UV – Radiação ultravioleta

UVB – Radiação ultravioleta B

RESUMO GERAL

Substâncias fotossensíveis tem sido alvo de diversos estudos numa aplicação conhecida como ação fotodinâmica. É sabido que compostos que apresentam em sua estrutura molecular anéis aromáticos, tem a capacidade de absorção de determinada faixa de radiação, logo novas moléculas que compartilhem desta estrutura, tem sido investigadas quanto a sua aplicabilidade na ação fotodinâmica (AF). Neste sentido, compostos como as amidas graxas sintéticas compartilham desta estrutura devem ser considerados e já tem sido alvo de estudo por nosso grupo de pesquisa.

Descritas na literatura como uma classe de lipídeos biologicamente ativos, as amidas graxas são importantes ferramentas para o conhecimento de processos celulares envolvidos no desenvolvimento da patologia câncer. Apesar dos efeitos das amidas graxas terem sido verificados em vários modelos celulares, são raros os estudos ligados a sua aplicabilidade na AF. Esta ausência de dados científicos ainda é mais marcante quando consideramos o efeito de amidas graxas sintéticas.

Assim o presente trabalho comparou o efeito de duas novas amidas graxas sintéticas, oleilbenzilamida (OBA) e ricinoleilbenzilamida (RIBA), na diminuição do número de células viáveis em células de melanoma B16F10. Neste estudo também foram investigados possíveis efeitos produzidos pela AF da OBA com a radiação ultravioleta B (OBA+UVB), avaliando o envolvimento de estresse oxidativo e dano de DNA. Por fim, com o intuito de comparar a sensibilidade à AF entre células tumorais e não tumorais, células de uma linhagem de melanócitos - melan-A foram expostas a este tratamento e avaliada a viabilidade celular. Nossos resultados demonstraram para a linhagem B16F10 que a amida OBA mostrou uma maior diminuição no número de células viáveis quando comparada com a amida RIBA. Este resultado foi decisivo para a escolha da amida OBA para os posteriores experimentos. Foi demonstrado que OBA

diminui o número de células viáveis de forma tempo e concentração dependente e que este efeito foi acentuado quando houve a associação OBA+UVB. Analisando a AF desta associação foi demonstrado que o estresse oxidativo não está envolvido na diminuição da viabilidade celular e permitiu sugerir ser o dano de DNAo processo envolvido nesta sensibilidade. Porfim, foi demonstrado que a linhagem não tumoral foi sensível ao tratamento de AF, no entanto, a linhagem tumoral apresentou maior sensibilidade a este tratamento.

INTRODUÇÃO GERAL

Ação fotodinâmica (AF) significa a fotooxidação de moléculas (fotossensibilizador), na presença de oxigênio e de uma determinada faixa de comprimento de onda (radiação) (Blum, 1941; Trindade *et al.*, 1999). Este processo ocorre por dois sistemas envolvendo oxigênio. O sistema tipo II capaz de produzir oxigênio singlete que danificará preferencialmente o DNA e o sistema tipo I envolvendo outras espécies reativas de oxigênio (Foote, 1991; Henderson e Dougherty, 1992).

Compostos que possuem em sua composição molecular anéis aromáticos são candidatos a fotossensibilizadores, uma vez que esta estrutura tem a capacidade de absorver energia luminosa em uma faixa específica. Zhang e colaboradores (2004) demonstraram esta capacidade para hidrocarbonetos poliaromáticos e seus derivados. Os efeitos fotodinâmicos tais como a destruição de enzimas e ácidos nucleicos, desnaturação de proteínas, inativação celular, hemólise de eritrócitos e sensibilização da epiderme humana, podem ocorrer através da interação de fótons com corantes, como o azul de metileno, a eosina, o laranja de acridina, a hematoporfirina, entre outros, (Blum, 1941; Dougherty *et al.*, 1975; Trindade *et al.*, 1999).

Uma vez que a estrutura molecular apresentando anéis aromáticos é reconhecida como capaz de absorver determinada faixa de radiação, novas moléculas que compartilhem desta estrutura devem ser investigadas quanto a sua aplicabilidade na AF. Neste sentido, compostos como as amidas graxas podem ser considerados.

Amidas graxas são moléculas nitrogenadas formadas a partir de cadeias longas saturadas ou insaturadas de ácidos graxos (Bezuglov *et al.*, 1998) sendo naturalmente encontradas em microrganismos, plantas e no homem (Kangani e Kelley, 2005). Estes compostos estão presentes na estrutura de diversas biomoléculas essenciais à vida, tal como ceramidas, lipídeos e lipoproteínas (Dembitsky *et al.*, 2000).

Baseado em estudos farmacológicos e bioquímicos, as amidas graxas tem demonstrado ser uma classe de lipídios biologicamente ativos, por apresentarem diversas atividades biológicas (Cravatt *et al.*, 1995; Bezuglov *et al.*, 2001), sendo importantes ferramentas para o conhecimento de processos celulares e até mesmo para a descoberta de novos fármacos (Aloe *et al.*, 1993). Já foram descritas na literatura diversas amidas graxas as quais foram isoladas do plasma humano (Arafat *et al.*, 1989), em células de carcinoma de mama humano EFM-19 (Di Marzo *et al.*, 1998), no fluido cefalorradiano de gatos (Akanmu *et al.*, 2007), no tecido adiposo (Zoccali *et al.*, 2006), no cérebro, olhos, fígado, intestino e outros tecidos de ratos e porcos (Deuschel *et al.*, 1993; Hillard *et al.*, 1995; Ueda *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1996; Piomelli *et al.*, 2007) e em espécies de *Streptomyces* (Arafat *et al.*, 1989). Também no reino vegetal as amidas graxas estão presentes em larga escala, por exemplo, na alga *Rizoclonium hieroglyphicum* da qual foram isolados mais de oito tipos de amidas graxas (Bezuglov *et al.*, 1998).

A amida graxa palmitoiletanolamida, biossintetizada pelo organismo durante processos inflamatórios, é responsável por proporcionar o alívio da inflamação e controle da dor (Re *et al.*, 2007; Wallace *et al.*, 2007). Já as amidas graxas anandamida e a oleamida, segundo Bisogno *et al.* (1998), apresentam atividades antitumorais, inibindo a proliferação de células de câncer de mama humano (linhagem EFM-19).

Também De Petrocellis *et al.* (1998) demonstraram que a amida graxa anandamida provocou a inibição da proliferação das células EFM-19, com inibição máxima de 92 %, em 10 μ M, 48 horas após o tratamento de forma dose-dependente. A anandamida provocou este mesmo efeito nas células MCF-7, outra linhagem de câncer de mama, com inibição máxima de 83 %, já na concentração de 5 μ M, após 72 horas de tratamento. A amida graxa anandamida mostrou que, de forma dose-dependente, foi capaz de provocar a inibição do ciclo celular na fase S do ciclo mitótico de forma

significativa. Ainda, Grimaldi *et al.* (2006), trataram a linhagem celular MDA-MB-231 com um análogo da anandamida, o 2-metil-2'-F-anandamide (Met-F-AEA), nas concentrações de 2,5; 5; 10 e 20 μ M de Met-F-AEA. Quando avaliado o efeito deste análogo na proliferação das células de câncer de mama humano, foi verificado a diminuição da proliferação desta linhagem celular, nas duas maiores concentrações.

Cerca de sete amidas graxas diferentes chamadas macamidas foram isoladas da planta herbácea Maca, *Lepidium meyenii* originária do Peru, onde destaca-se a amida graxa tetracosenoilbenzilamida. A esta amida graxa são atribuídas diversas atividades biológicas, dentre elas efeitos antitumorais e antidepressivos, aumento da fertilidade feminina em humanos e em animais domésticos, apresentando também influência na regulação hormonal, imunoestimulação, controle dos distúrbios de memória, e nas desordens de origem sexual (Khan *et al.*, 2005). Embora o exato mecanismo de ação da *Lepidium meyenii* ainda não seja conhecido, estudos sugerem que metabólitos secundários encontrados em extratos desta planta sejam os responsáveis por seus efeitos fisiológicos (macamidas e macaenos) (Khan *et al.*, 2005).

Estudo desenvolvido por Katsifis *et al.* (2007), relatou o efeito das amidas graxas benzamidas no tratamento do melanoma humano. Este trabalho evidenciou a grande eficácia das benzamidas como marcadores radioterápicos em pacientes que apresentavam o melanoma cutâneo e ocular, graças à sua elevada sensibilidade e seletividade à melanina contida nos melanócitos, resultando assim em uma excelente forma de detecção do melanoma e de suas metástases.

Os resultados obtidos através da utilização de amidas graxas na inibição do crescimento de processos tumorais em algumas linhagens celulares como descrito acima, envolvem mecanismos complexos os quais podem estar vinculados a efeitos citotóxicos, indução de apoptose, efeitos anti-metastáticos seguidos pela inibição da

angiogênese e da invasão de células tumorais (Bifulco *et al.*, 2006). Logo, as amidas graxas mostram-se fortemente ligadas a processos intracelulares, os quais podem afetar processos biológicos e várias vias de sinalização envolvidos na patologia câncer (Bifulco, 2009).

Dessa forma, justificamos o interesse da investigação dos efeitos provocados pelas amidas no processo de cancerização. Sabe-se que o tipo de câncer mais freqüente, correspondendo a cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no Brasil, é o câncer da pele. O câncer da pele é constituído por células da pele que sofreram uma transformação e multiplicação de maneira desordenada e anormal, originando um novo tecido (neoplasia)(Lucciet *al.*,2001).

A pele pode apresentar neoplasias de diferentes linhagens celulares por ser um órgão heterogêneo (Gartner e Hiatt, 1997). Dentre elas as mais frequentes são o carcinoma basocelular, responsável por 70% dos diagnósticos de câncer da pele, o carcinoma epidermóide com 25% dos casos e o melanoma, detectado em 4% dos pacientes. Entre os tumores da pele, os tipos não-melanomas são os de maior incidência e mais baixa mortalidade (Schottenfelde Fraumeni, 1982; Rodrigues, 2001).

O melanoma é o tipo de câncer da pele mais agressivo, devido ao seu alto potencial de produzir metástases enviando células tumorais para outros órgãos, onde se desenvolvem. É originado nos melanócitos, células ramificadas que estão localizadas na camada basal da epiderme e que são responsáveis por sintetizar melanina, o pigmento que dá a cor da pele (Gartner e Hiatt, 1997).

A maioria dos casos de melanomas é tratada cirurgicamente quando precocemente diagnosticados. Contudo, a mortalidade causada por esta doença é bastante elevada em pacientes diagnosticados em estágios mais avançados, mesmo após intervenções terapêuticas agressivas. Logo, a identificação de indivíduos que

apresentam uma predisposição genética a esta doença é muito importante na tentativa de reduzir significativamente o número de mortes causadas pela doença através do diagnóstico precoce e tratamento (Demenais, 1996; Costinge Hearing, 2007).

É sabido que a principal causa para o aparecimento do câncer da pele é a exposição excessiva e/ou constante à radiação ultravioleta (UV) (Billhimer, 1989; Haywood, 2006). O sol em excesso, ao longo dos anos, também pode causar queimaduras e envelhecimento precoce da pele (Billhimer, 1989; Haywood, 2006).

Baseado nestes dados é pertinente estudar novos compostos que sejam capazes de interferir nos mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento de processos tumorais. Apesar dos efeitos das amidas graxas terem sido verificados em vários modelos celulares, são escassos os estudos ligados ao efeito destas amidas quando associadas às radiações. As radiações melhores estudadas quanto as suas aplicações nos processos fotodinâmicos são as radiações dos espectros visível, infravermelho e ultravioleta (Kirchoff, 1995; Chapman, 1995).

Além disso, reconhecendo a importância dos efeitos biológicos que amidas graxas apresentam nos mais diversos organismos, é relevante a procura por novas amidas graxas sintéticas que também apresentem atividades biológicas. É inegável a vantagem de estudos envolvendo os efeitos provocados por substâncias sintetizadas, pois o rigor nos processos de síntese e a purificação exigida no produto final, garantem à pesquisa uma relação direta entre efeito/substância sem a participação de compostos adicionais.

As amidas graxas ricinoleilbenzilamida (RIBA) e oleilbenzilamida (OBA) utilizadas neste estudo (Fig.1) passaram pelo processo de síntese resumidamente descrito abaixo:

As amidas graxas oleilbenzilamida (**66c**) e ricinoleilbenzilamida (**66d**), obtidas a partir da conversão dos ácidos carboxílicos oleico (**62c**) e ricinoleico (**62d**) em ésteres

metílicos graxos (**63a-c**) por esterificação com MeOH e catálise ácida por 4 horas a 60°C. Os rendimentos variaram entre 83-94%. O ricinoleato de metila (**63d**), foi obtido a partir da transesterificação da ricinoleína, principal constituinte do óleo de mamona (*Ricinus communis*) (Lakshminarayana *et al.*, 1984; Turner *et al.*, 2004), utilizando NaOH (1%) na proporção molar 1:6, triglicerídeo:álcool sob aquecimento de 60°C por 1 hora. Todos os ésteres foram purificados por coluna cromatográfica e analisados por infravermelho. O desvio da luz polarizada do ricinoleato de metila (**63d**) foi medido para determinar a pureza óptica do composto. Em seguida os ésteres metílicos graxos (**63a-d**) foram submetidos à aminólise com benzilamina (**64**), na proporção molar 1:6, a 130°C por 24 horas. A conversão do éster metílico em amida graxa foi acompanhada por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e os rendimentos variaram entre 52-72%.

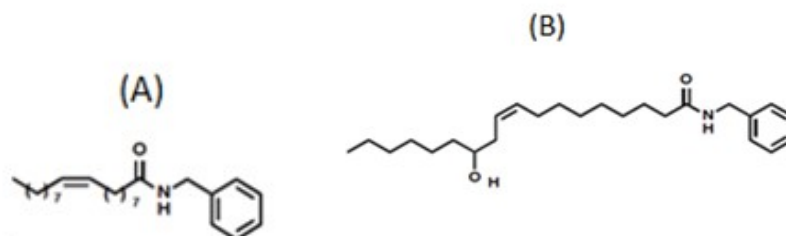
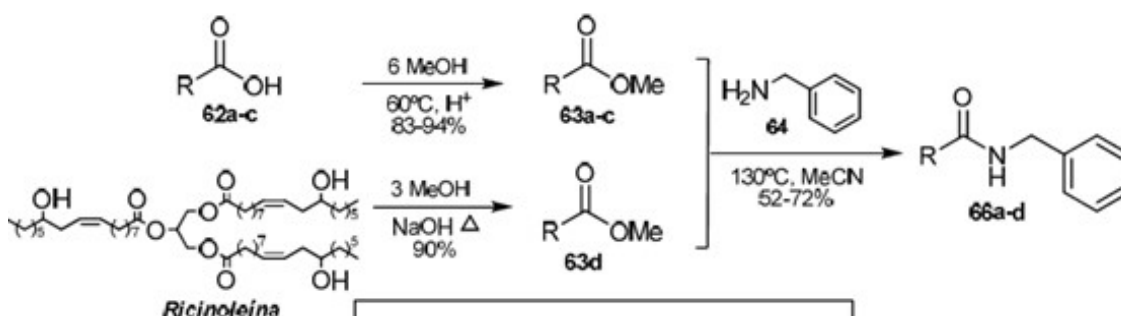
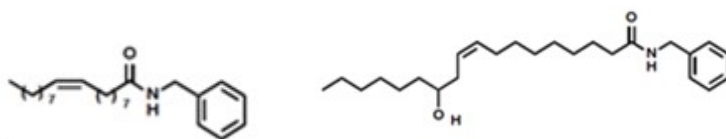


Figura 1: Estrutura química de benzilamidas graxas sintéticas, onde (A) representa oleilbenzamida (OBA) e (B) representa ricinoleilbenzamida (RIBA).





63c (oleilbenzilamida)**63d**(ricinoleibenzilamida)

Figura 2: Síntese de benzilamidas**66c-d** a partir de ésteres graxos **63a-d**

A síntese das benzilamidagraxas (oleilbenzilamida e ricinoleilbenzilamida) utilizadas nesse trabalho,foi baseada na similaridade estrutural com as benzilamidas graxas (59-61) (Fig. 3),também chamadas de macamidas, as quais já foram isoladas do tubérculo vegetal *Lepidiummeyenii* (Gonzaleset al.,2003; Zhaoet al.,2005). A inovação consistiu na variação dos substituintes ligados ao átomo denitrogênio e a sua combinação com as cadeias dos ácidos oléico (**62c**) ericinoleico (**62d**).

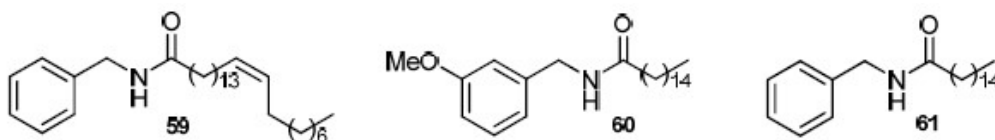


Figura 3: Estrutura química das macamidas.

Se o estudo dos efeitos biológicos produzidos por amidas graxas sintéticas são escassos na literatura, mais raros ainda são estudos destes efeitos quando estas amidas sintéticas estão associadas à radiação. O presente trabalho tentará diminuir essa lacuna de informações.

Objetivos

Objetivo geral

Avaliar os efeitos da ação fotodinâmica da amida graxa sintética oleilbenzilamida (OBA) em células de melanoma (linhagem B16F10).

Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade celular da linhagem B16F10 a diferentes concentrações das amidas graxas sintéticas oleilbenzilamida (OBA) e ricinoleilbenzilamida (RIBA) com o objetivo de construir uma curva dose-resposta, assumindo qual das amidas testadas teve maior efeito.
- Avaliar a viabilidade celular da linhagem B16F10 a diferentes concentrações das amidas graxas sintéticas oleilbenzilamida (OBA) associadas à uma determinada dose de radiação UVB, com o objetivo de construir uma curva dose-resposta.
- Quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) na linhagem B16F10 exposta à ação fotodinâmica de OBA + UVB.
- Avaliar a capacidade antioxidante total na linhagem celular B16F10 exposta à ação fotodinâmica de OBA + UVB.
- Quantificar possíveis danos de DNA na linhagem B16F10 exposta à ação fotodinâmica de OBA + UVB.
- Comparar a viabilidade das linhagens celulares B16F10 e melan-A à ação fotodinâmica de OBA + UVB.

Artigo

**Viability Reduction of Melanoma Cells Under the Photodynamic Action Caused by
Ultraviolet Radiation B Associated to a New Synthetic Fatty Acid Amide**

Artigo a ser submetido à revista PhotochemistryandPhotobiology

1 **Viability Reduction of Melanoma Cells Under the Photodynamic Action Caused by**
2 **Ultraviolet Radiation B Associated to a New Synthetic Fatty Acid Amide**

3 Cíntia Duarte Mirco^{1,2}, Caroline Da Ros^{3,4}, Marcelo Montes D'Oca^{3,4}, Daza de Moraes
4 Vaz Batista Filgueira^{1,2}, Flávio Manoel Rodrigues da Silva Júnior^{2,5}, Gilma Santos
5 Trindade^{1,2*}

6 ¹Laboratório de Cultura Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal
7 do Rio Grande - FURG, Rio Grande, Brazil.

8 ²Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Fisiologia Animal Comparada,
9 FURG, Rio Grande, Brazil.

10 ³Laboratório Kolbe de Síntese Orgânica, Escola de Química e Alimentos, FURG, Rio
11 Grande, Brazil.

12 ⁴Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica Ambiental, FURG, Rio Grande,
13 Brazil.

14 ⁵Laboratório de Ensaio Farmacológicos e Toxicológicos - LEFT, Instituto de Ciências
15 Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Brazil.

16 Corresponding author:

17 Phone/Fax: +55 53 32935195 / +55 53 32336848

18 E-mail address: gilma.trindade@gmail.com

19 Instituto de Ciências Biológicas

20 Universidade Federal do Rio Grande - FURG

21 Cx. Postal, 474

22 96201-900 Rio Grande/RS – Brazil

23

24

25 **ABSTRACT**

26 Photodynamic Action (PA) is the oxidation of biological molecules in the presence of a
27 photosensitizer, a certain range of radiation and oxygen. Since the aromatic ring
28 molecular structure is well known for its capability of absorbing a certain range of
29 radiation, new molecules presenting such structure should be investigated for PA
30 applicability. Thus, some compounds, such as fatty acid amides, must be considered.
31 This study raises the interest concerning these compounds in several areas of
32 knowledge, since they have different biological effects in various organisms. Based on
33 these data, the possible effects of PA associated with the synthetic fatty acid amide,
34 oleyl benzyl amide (OBA), in melanoma cells (B16F10 cell line) were investigated.
35 Treatment with OBA (without irradiation) decreased cell viability and an enhanced
36 effect was observed in OBA treatment associated with radiation (OBA+UVB). Such
37 association did not evidence the involvement of oxidative stress (no significant
38 difference in ROS production and total antioxidant activity) in B16F10 cells. On the
39 other hand, the results suggested that DNA damage was the mechanism involved in cell
40 death. The non-tumor cell line was sensitive to OBA+UVB association although the
41 tumor cell-line was more sensitive.

42 Keywords: oleyl amide benzyl (OBA), UVB radiation, photodynamic action, melanoma
43 cells (B16F10).

44

45

46 INTRODUCTION

47 Biological molecules oxidation provoked by a photosensitizer, together with
48 wavelength (radiation) and oxygen presence is known as one mechanism of
49 photodynamic action (1, 2). Compounds presenting aromatic rings in their molecular
50 composition are considered possible photosensitizers, since this structure enables the
51 absorption of a specific light energy range. Fatty amides are naturally found in
52 microorganisms, plants, animals and human beings (3). These compounds are described
53 in the literature as a family of biologically active lipids involved in diverse biological
54 activities (4,5) and are important features for the understanding of cellular processes and
55 even for the discovery of new drugs (6). Various fatty acid amides, which were isolated
56 from human plasma (7), human breast carcinoma EFM-19 cells (8), cephalorachidian
57 fluid of cats (9), adipose tissue (10), brain, eye, liver, intestine and other tissues of rats
58 and pigs (11-15) and *Streptomyces* species (7), have been described in literature. Also,
59 fatty acid amides are largely found in vegetable species such as the algae
60 *Rizoclonium hieroglyphicum*, in which more than eight varieties of fatty acid amides were
61 found (16). Thus, fatty acid amides are strongly associated with intracellular
62 mechanisms that may affect biological processes and several signaling pathways
63 involved in cancer pathology (17).

64 Many studies have aimed to investigate the biological activity attributed to fatty
65 acid amides, as the study of Katsifis et al. (18) that reported the effect of fatty acid
66 amide benzamide in human melanoma treatment. This study has demonstrated high
67 efficacy of benzamides, as markers, in radiotherapy of patients with cutaneous and
68 ocular melanoma, due to its high melanin sensitivity and selectivity, resulting in an
69 excellent way to detect melanoma and their metastases. Other activity was demonstrated

70 by De Petrocellis et al. (19) who reported that the fatty acid amide anandamide caused
71 cell proliferation inhibition in human breast cancer (FSM-19). Anandamide also caused
72 the same effect in MCF-7 cells, another cell line of breast cancer. Still, Grimaldi et al.
73 (20), who treated the cell line MDA-MB-231 with an analog of anandamide, 2-methyl-
74 2'-F-anandamide (Met-F-AEA), have found cells proliferation reduction in a dose-
75 dependent manner. These data reinforce the relevance of studying the use of new
76 compounds which might interfere in cellular mechanisms involved in tumoral processes
77 development.

78 Few data are available in literature concerning new fatty acid amide synthesis, and their
79 activities, although studies involving synthetic substances are relevant. The accuracy of
80 synthesis and purification processes ensures the relation between substance and effects
81 without the participation of additional compounds. Besides, the synthesis of new fatty
82 acid amides presents low cost and can be realized at any time and
83 quantity desired. Therefore, this study investigated and compared the cytotoxic effects
84 of two new synthetic fatty acid amides, oleyl benzyl amide (OBA) and ricinoyl benzyl
85 amide (RIBA), over a melanoma cell line (B16F10) and studied the association between
86 UVB radiation and OBA, as well as searched for the possible involved cytotoxic
87 mechanisms.

88

89

90

91

92

93 MATERIALS AND METHODS

94 Cells and culture conditions

95 B16F10 and melan-A cells were obtained from Poisons and Haemostasis Laboratory at
96 the Medical Biochemistry Department, UFRJ (Federal University of Rio de Janeiro,
97 Brazil). The cells were grown at 37°C in disposable plastic flasks containing DMEM
98 (Gibco) medium supplemented with sodium bicarbonate (0.2 g/L) (Vetec), Hepes (25
99 mM)(Acros), 10% fetal bovine serum (Gibco) and 1% of antibiotics (penicillin (100
100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and antimicotic (0.25 µg/mL)(Gibco).

101 Synthesis of fatty acid amides

102 The synthesis of fatty acid amides were described by D'Oca C. et al. (21). Briefly, the
103 synthesis was performed from the esterification of fatty acid (oleic and ricinoleic acid)
104 or transesterification of triglycerides (ricinoleic acid) using the esters aminolysis as a
105 key step.

106 Treatment of cells

107 Synthetic fatty acid amides exposure

108 B16F10 cells were centrifuged and washed with phosphate buffered saline (Ca^{+2} and
109 Mg^{+2} free) (PBS) to a final concentration of 5×10^5 cells/mL. The cells were treated in
110 DMEM medium with 10, 100 and 1000 µg/mL of synthetic fatty acid amides OBA and
111 RIBA dissolved in absolute ethanol (Vetec). The control group received the same
112 volume of absolute ethanol to achieve maximum ethanol concentration of the treated
113 cells (1%). After these experiments, B16F10 cells were prepared as mentioned above
114 and treated in media with 10, 50, 100 and 150 µg/mL of OBA.

115 UVB exposure after OBA incubation

116 B16F10 cells were incubated for 24 hour in DMEM medium under the same OBA
117 concentrations reported above and irradiated with 0.33 J/cm^2 UVB, which is considered
118 an environmental dose (VL-115L, 30W; VilberLourmat, France). This radiation range
119 was chosen based on the results obtained by spectrophotometric analysis. The UVB
120 irradiance spectrum ranged from 290 to 320 nm with intensity peak of 313 nm with
121 0.233 mW/cm^2 of UVA contamination and $0,27 \mu\text{W/cm}^2$ PAR but no UVC
122 contamination. Irradiations intensity was measured using a radiometer/photometer
123 (model IL 1400A, International Light, MA, USA). Growth medium was replaced by
124 PBS during UVB exposure. Control group was only treated with UVB radiation.

125 Sensitivity assessment of B16F10

126 OBA or RIBA exposed B16F10 cells viability was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-
127 2-yl)2,5-diphenyltetrazolium (MTT)(2) method after 0 h, 24 h and 48 h exposure.
128 Regarding the photodynamic action experiments (OBA + UVB irradiation), the viability
129 was also evaluated after irradiation at 0 h (immediately after irradiation), 24 h and 48h.

130 Assessment of oxidative effects and DNA damage

131 Intending to evaluate oxidative effects generation and DNA damage, the B16F10 cells
132 (5×10^5 cells/mL), after adherence period, were incubated at 37°C during 24h under four
133 experimental conditions: 1) control group (without OBA nor UVB), 2) OBA group
134 (with $10 \mu\text{g/mL}$ of OBA), 3) UVB group (0.33 J/cm^2 UVB) and 4) OBA + UVB group
135 ($10 \mu\text{g/mL}$ of OBA plus 0.33 J/cm^2 UVB).

136 Assessment of intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) formation

137 B16F10 cells were washed with PBS (twice) and incubated for 30 min at 37 °C with the
138 fluorogenic compound 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) at a final
139 concentration of 40 μM. After loading with H₂DCF-DA, the cells were washed with
140 PBS twice and then suspended in fresh PBS. Aliquots of 160 μl of each sample (three
141 replicates) were placed into an ELISA plate and fluorescence intensity was determined,
142 during 90 min at 37°C, using a fluorometer (Victor 2, Perkin Elmer) with excitation and
143 emission wavelength of 485 and 520 nm, respectively. ROS levels were expressed in
144 terms of fluorescence area, after fitting fluorescence data to a second-order polynomial
145 and integrating between 0 and 90 min in order to obtain its area.

146 Antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP)

147 The B16F10 cells were washed with PBS (twice) and frozen at -80°C until use. Each
148 pellet was then suspended in PBS and crushed on ice. The homogenate was centrifuged
149 (10,000 x g) at 4°C, for 20 min. Aliquots of 15 μl of each supernatant (three replicates)
150 were placed into an ELISA plate with 120μl buffer (Hepes, KCl, MgCl₂ and water), and
151 10 μl of water or 2,2'-azobis(2 metilpropionamidina) (ABAP) and 20μl of H₂DCF-DA.
152 Fluorescence intensity was determined during 60 min at 37°C, using a fluorometer
153 (Victor 2, Perkin Elmer), with an excitation and emission wavelength of 485 and 520
154 nm, respectively. The fluorescence data was fit to a second order polynomial and
155 integrating between 0 and 60 min in order to obtain the fluorescence area. The
156 antioxidant capacity was expressed as the inverse of the fluorescence area difference
157 with and without ABAP (22).

158

159 DNA damage production

160 DNA damage was evaluated by the alkaline single cell electrophoresis (comet) assay,
161 performed as described by (23,24), with some modifications. An aliquot (80 μ l) of cell
162 suspension of each sample (5×10^5 cell/ml) was mixed with 60 μ l of 1.2% low melting
163 point agarose and added to fully frozen slides that had been covered with a layer of
164 1.5% normal melting point agarose. Following the solidification of the new layer, cells
165 on the slides were lysed with (2.5 M NaOH, 0.1 M EDTA, 0.01 M Tris, 1% Triton X-
166 100, and 10% dimethyl sulfoxide, pH 10) at least 2 h at 4° C. Subsequently, samples
167 were placed in the electrophoresis solution (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 13)
168 for 30 min to allow DNA unwinding. Then, electrophoresis was performed for 20 min
169 (1 V/cm and 280 mA). Finally, the slides were neutralized with 0.4 M Tris buffer (pH
170 7.5), fixed with ethanol, and stained with 50 μ L of Sybr Safe (1:10,000; Molecular
171 Probes) and analyzed using a fluorescence microscope (Olympus BX50) connected to a
172 CCD camera (Pro-Series, High Performance) and coupled to commercial software for
173 image acquisition. A total of 50 nuclei were randomly selected and photographed on
174 each slide. The nuclei were analyzed by CASP software and DNA damage was
175 represented by Olive tail moment (OTM) (25).

176 OBA+UVB association sensitivity comparison for melan-A cells

177 Concerning this experiment, melan-A cells were exposed to 10, 50, 100 and 150 μ g/ml of
178 OBA + UVB (0.33 J/cm²) and cell viability was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-
179 yl)2,5-diphenyltetrazolium (MTT) method (2) after irradiation at times 0 h (immediately
180 after irradiation), 24 h and 48h.

181 Statistical analysis

182 Each experiment was repeated in three independent trials, using triplicates in each trial,
183 for all cases. Data were expressed as mean \pm standard error and analyzed with one way
184 ANOVA followed by Tukey's multiple range test. Significance level was fixed at $p <$
185 0.05.

186 **RESULTS**

187 B16F10 cells sensitivity to OBA and RIBA assessment by MTT assay

188 The results of the present study have shown that OBA fatty acid amide was more
189 cytotoxic than the RIBA fatty acid amide. Regarding OBA, the concentration of 100 $\mu\text{g}/$
190 mL was cytotoxic after 24 hours exposure and maintained this result in 48 hours (Figure
191 1A). Concerning RIBA, cytotoxicity was only observed for the concentration of 1000
192 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after 24 hours exposure and only at 48 hours this effect was observed for 100
193 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 1B). These results were used to determinate the choice of OBA fatty
194 acid amide for posterior tests.

195 B16F10 cells sensitivity to OBA assessment by MTT assay

196 Considering the lower concentrations tested, the cells presented an immediate decrease
197 in cellular viability for 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This effect was observed in 24 h for the
198 concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and in 48 h to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presenting a concentration and
199 time dependent response. The concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ did not present significant
200 difference in relation to control cells up to 48 h after exposition (Figure 2A).

201 Cells sensitivity to OBA + UVB assessment by MTT assay

202 The UVB band was chosen by spectrophotometric analysis of OBA synthetic fatty acid
203 amide, since this band had a greater absorbance (0.151) when compared to the
204 absorbance obtained by UVA band (0.121) and visible light band (0.069). This
205 association between OBA and UVB radiation for B16F10 cell line showed a decrease in
206 cellular viability immediately after treatment for the 50 µg/mL concentration group and
207 such effect remained until 48h after exposure. This effect was concentration dependent
208 but time independent. The concentration of 10µg/mL showed no significant difference
209 when compared with control cells until 48 h of exposure (Figure 2B).

210 Assessment of oxidative effects

211 OBA fatty acid amide alone or associated with UVB did not affected ROS levels when
212 compared to control group although UVB radiation alone was capable to increasing
213 ROS production (Figure 3A). On the other hand, a significant increase in ACAP value
214 by OBA + UVB association was observed. However, OBA or UVB alone did not alter
215 the levels of ACAP when compared to control (Figure 3B).

216 DNA Damage

217 The fatty acid amide, OBA, alone did not cause DNA damage. On the other hand, the UVB
218 radiation and OBA+UVB association caused DNA damage (Figure 4).

219 Sensitivity comparison of OBA+UVB association between B16F10 and melan-A cells

220 Although the melan-A cells were sensitive to OBA+UVB association, it was possible to
221 verify a lower sensibility when compared with the observed in tumor cells (B16F10) for
222 this same treatment. Melan-A cells viability decrease was demonstrated after 24h of

223 treatment (Fig 5) whereas B16F10 cells viability decrease was observed immediately
224 after UVB exposure (Fig 2B).

225 **DISCUSSION**

226 Many studies have been realized concerning the obtainment of products from renewable
227 sources with possible therapeutic purposes (26,27). Such interest is reflected in our
228 research group, which has focused on the investigation of biological effects caused by
229 different synthetic fatty acid amides as pirrolidilstearyl amide (EPA), oleyl amide
230 pirrolidil (OPA), ricinoleilpirrolidil amide (RPA) and pirrolidilpalmitoyl amide (PPA)
231 in different cell lines (K562 and K562-Lucena) (27). Once the importance of fatty acid
232 amides biological effects, which is present in various organisms, is recognized, the
233 search for others synthetic fatty acid amides, also exhibiting biological activities, should
234 be considered. Regarding the present study, the possible effects of OBA and RIBA, two
235 new synthetic fatty acid amides, were investigated in a melanoma cell line in which
236 sensitivity to both amides was observed with increased sensitivity to OBA synthetic
237 fatty acid amide. This sensitivity was demonstrated by decreased cell viability in a time
238 and concentration dependent manner.

239 Studies involving synthetic fatty acid amides are still scarce, as previously
240 mentioned, and even scarcer are the studies associating these synthetic amides with
241 radiation. Several authors have evidenced the effects caused by the association of
242 biological compounds, presenting aromatic rings in its structure, and radiation, a
243 process known as photodynamic action (2, 28). Within this context, the synthetic fatty
244 acid amide OBA, which presents thefore mentioned chemical structure, has stimulated
245 the study of tumor cells (B16F10) exposure, considering its isolated effect as well as its
246 associated effect with UVB. Concerning the results exhibited on Figure 2A, it was

247 possible to verify that the cells were sensitive to OBA treatment. Similar results were
248 demonstrated by De Petrocellis et al. (19). These authors have shown that
249 anandamidefatty acid amide caused cellular proliferation inhibition of human breast
250 cancer cells (FSM-19) with maximum inhibition of 92% in 10 mM, 48 hours after
251 treatment, in a dose-dependent manner. Anandamide caused the same effect on MCF-7
252 cells, another breast cancer cell line, with maximum inhibition of 83%, for the
253 concentration of 5 mM, after 72 hours of treatment. The same results were observed by
254 Grimaldi et al. (20) after treating the cell line MDA-MB-231 with an analog of
255 anandamide, 2-methyl-2'-F-anandamide (F-Met-EEA), at concentrations of 2.5, 5, 10
256 and 20 mM Met-F -AEA.

257 Comparing the figures 2A and 2B, a significant decrease in cell viability can be
258 observed, in cells treated with OBA + UVB association, after cells exposure to
259 photodynamic action mechanism.

260 In this context one question arises: which is the decreased viability mechanism
261 used by OBA synthetic fatty acid amide + UVB association?

262 Given that the oxidative stress produced by an imbalance, between antioxidant
263 defenses and reactive oxygen species production (29,30) is able to induce cell death
264 (30), the present work has examined the ability of the OBA + UVB association to
265 induce oxidative stress in B16F10 cell line. However, the results demonstrated that the
266 antioxidant system was stimulated and it was able to neutralize the reactive oxygen
267 species produced by OBA + UVB association. This fact suggests a protective effect of
268 OBA fatty acid amide once the cells treated only with UVB have shown an increase in
269 the production of these species when compared with control and the other treatments.
270 Sandrini et al. (31) also demonstrated, after analyzing gene expression from DNA repair

271 system of zebrafish (*Danio rerio*) hepatocytes, that UVB radiation can provoke DNA
272 damage by oxidative stress.

273 As stated previously, the antioxidant capacity was significantly increased only in
274 OBA + UVB association. This fact suggests that such association was sufficient to
275 neutralize the reactive oxygen species production. This result opposed to that obtained
276 by MacCarron et al. (32), who described the antioxidant capacity of endogenous fatty
277 acid amide 2-AG alone, and also contradicts Domingues (27), who have demonstrated
278 an antioxidant capacity for PPA fatty acid amide in leukemic MDR (multiple drug
279 resistant) and non-MDR (K562-Lucena and K562) cell lines.

280 After eliminating the involving oxidative stress such as the mechanism
281 responsible for the decrease in cell viability, in combination OBA + UVB was relevant
282 to investigate the role of DNA damage under these conditions. Figure 4 shows that the
283 UVB and OBA+UVB treated cells showed significant DNA damage when compared
284 with control cells and cells treated only OBA. The UVB result was the expected since
285 DNA is known as the primary target of UVB radiation in the cells (33). In relation to
286 OBA, the result of this study was opposed to obtained by Domingues (27), but
287 supported by Contassot et al. (34) that showed that endogenous fatty acid amides caused
288 DNA fragmentation. Furthermore, Hsu et al. (35) have shown that fatty acid amide
289 endogenous anandamide reduced the viability of a cell line of human osteosarcoma cells
290 (MG63) in a dose dependent manner by DNA fragmentation. Although the
291 treatments with UVB and OBA+UVB showed damage DNA, the Figure 4 showed that the
292 damages were of the UVB responsibility, since there is no significant difference between
293 these treatments.

294 Since in vitro studies are a major step in the search for alternative treatment of
295 cancer, it is important to evaluate the sensitivity of a cell line to non-tumor associated
296 OBA + UVB and compared with a tumor cell line under the same conditions. Therefore,
297 the lower sensitivity of Melan-A cell line as compared with the melanoma cell line,
298 stimulates additional studies based on these findings and work suggests the use of
299 synthetic amides of fatty acids associated with the radiation as therapeutic tools.

300

301 **Acknowledgements**

302

303 This work was supported by the Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas –
304 Fisiologia Animal Comparada (FURG) and CAPES Brazilian. The authors are thankful
305 to Dr. Robert Tew Boyle and MSc Bruno Pinto Cruz for revision and correction of the
306 manuscript.

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322 REFERENCES

323

324 1. Blum, M. F (1941) Photodynamic action and diseases caused by light. Reinhold, New
325 York.

326

327 2. Trindade, G. S., V. Rumjanek, M. A. M. Capella, O. R. A. Mitidieri and L. S. Capella
328 (1999) Differences in Sensitivity to UVC, UVB and UVA Radiation of a Multidrug
329 Resistant Cell Line Overexpressing P-glycoprotein. *Photochem. Photobiol.* 69, 694-699.

330

331 3. Kangani, C. O. and D. E. Kelley (2005) One pot direct synthesis of amides or
332 oxazolines from carboxylic acids using Deoxo-Fluor reagent. *Tetrahedron Lett.* 46,
333 8917-8920.

334

335 4. Cravatt, B. F., O. Prospero-Garcia, G. Suizdak, N. B. Gilula, S. J. Henriksen, D. L.
336 Boger and R. A. Lerner (1995) Chemical characterization of a family of brain lipids that
337 induce sleep. *Science* 268, 1506-1509.

338

339 5. Bezuglov, V., M. Bobrov, N. Gretskeya, A. Gonchar, G. Zinchenko, D. Melck, T.
340 Bisogno, V. Di Marzo, D. Kuklev, J. Rossi, J. Vidal and T. Durand (2001) Synthesis
341 and Biological Evaluation of Novel Amides of Polyunsaturated Fatty Acids with
342 Dopamine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 447-449.

343

344 6. Aloe, L., A. Leon and R. Levi-Montalcini (1993) A proposed autacoid mechanism
345 controlling mastocyte behaviour. *Agents Action* 39, 145-147.

346

347 7. Arafat, E. S., J. W. Trimble, R. N. Andersen, C. Dass and D. M. Desiderio (1989)
348 Identification of fatty acid amides in human plasma. *Life Sci.* 45, 1679-1687.

349

350 8. Di Marzo, V., T. Bisogno, K. Katayama, D. Melck, N. Ueda, L. De Petrocellis and
351 S. Yamamoto (1998) Biosynthesis and degradation of bioactive fatty acid amides in
352 human breast cancer and rat pheochromocytoma cells Implications for cell proliferation
353 and differentiation. *Eur. J. Biochem.* 254, 634-642.

354

355 9.Akanmu,M.A.,S. O. Adeosun and O. R. Ilesanmi (2007) Neuropharmacological
356 effects of oleamide in male and female mice. *Behav. Brain Res.* 182, 88–94.
357

358 10.Zoccali, C., M. Macarrone, B. Spoto, G. Parlongo, N. Battista, E. Sgro and V.
359 Gasperi (2006) Human adipose tissue binds and metabolizes the
360 endocannabinoids anandamide and 2- arachidonoylglycerol. *Biochimie* 88, 1889-1897.
361

362 11.Deutsch, D. and S. Chin (1993) Enzymatic synthesis and degradation of anandamide,
363 a cannabinoid receptor agonist. *Biochem. Pharmacol.* 46, 791-796.
364

365 12.Hillard, C., D. Wilkison, W. Edgemo and W. Campbell (1995) Characterization of
366 the kinetics and distribution of N-arachidonylethanolamine (anandamide) hydrolysis by
367 rat brain. *Biochim.Biophys. Acta* 1257, 249-256.
368

369 13.Ueda, N., Y. Kurahashi, S. Yamamoto and T. Tokonuga (1995) Partial Purification
370 and Characterization of the Porcine Brain Enzyme Hydrolyzing and Synthesizing
371 Anandamide. *J. Biol. Chem.* 270, 23823-23827.
372

373 14.Watanabe, K., Y. Kayano, T. Matsunaga, I. Yamamoto and H. Yoshimura (1996)
374 Inhibition of anandamideamidase activity in mouse brain microsomes by cannabinoids.
375 *Biol. Pharmaceut. Bull.* 19, 1109- 1111.
376

377 15.Piomelli, D., J. Fu, G. Astarita, S.Gaetani, J. Kim, B. Cravatt and K. Mackie (2007)
378 Food Intake Regulates Oleylethanolamide Formation and Degradation in the Proximal
379 Small Intestine. *J. Biol. Chem.* 282, 1518-1528.
380

381 16.Bezuglov, V.V., M.Y. Bobrov and A.V. Archakov (1998) Bioactive amides of fatty
382 acids. *Biochemistry (Moscow)* 63, 22-30.
383

384 17.Bifulco, M. (2009) The endocannabinoid system: From biology to therapy.
385 *Pharmacol. Res.* 60, 75-76.
386

387 18.Katsifis, A., T. Pham, I. Greguric, X. Liu, P. Berghofer, P. Ballantyne, J. Chapman,
388 F. Mattneer, B. Dikic, T. Jackson and C. Loc'h, (2007) Synthesis and evaluation of
389 NovelRadioiodinatedBenzamides for Malignant Melanoma. *J. Med. Chem.*50, 3561-
390 3572.
391

392 19.De Petrocellis, L., D. Melck, A. Palmisano, T. Bisogno, C. Laezza, M.Bifulco and V.
393 Di Marzo (1998) The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast
394 cancer cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8375-8380.
395

396 20.Grimaldi, C., S. Pisanti, C. Laezza, A. M. Malfitano, A. Santoro, M. Vitale, M.G.
397 Caruso, M. Notarnicola, I. Iacuzzo, G. Portella, V. Di Marzo and M. Bifulco (2006)
398 Anandamide inhibits adhesion and migration of breast cancer cells. *Exp. Cell Res.*312,
399 363-373.
400

401 21.D Oca, C. Da R. M., T.M. Coelho, G.H. Tamara,R,L. Carolina, da C. D. Rodrigo ; da
402 S. P. Almeida ; D Oca, Marcelo Gonçalves Montes ; D'Oca, C.R.M.
403 (2010)Synthesisandantituberculosisactivityof new fattyacidamides. *Bioorg.& Med.*
404 *Chem. Lett.* 20, 5255-5257.
405

406 22.Amado, L.L., M. L. Garcia, P. B. Ramos, R.F. Freitas, B. Zafalon, J.L.R. Ferreira, J.
407 S. Yunes and J. M. Monserrat (2009) A method to measure total antioxidant capacity
408 against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins
409 toxicity. *Sci. Total Environ.* 407, 2115-2123.
410

411 23.Singh, N.P., M.T. McCoy,R.R.Ticeand E.L. Scheider (1988) A simple technique
412 for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 237, 3-
413 4.
414

415 24.Steinert S.A, R. Streib-Montee and J.M Leather (1998) DNA damage in mussels at
416 sites in San Diego Bay. *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mut.* 399, 65-85.
417

418 25. Konca, K., A. Lankoff, A. Banasik, H. Lisowski, T. Kuszewski, S. Gozdz, Z. Koza
419 and A. Wojcik (2003) A cross-platform public domain PC image-analysis program for
420 the comet assay. *Mutat. Res.* 534, 15-20.
421

422 26. Azevedo, L. G., A. L. Baisch, D. DE M. V. B. Filgueira, R. T. Boyle, D. F. Ramos, A.
423 D. Soares, C. Lerner, P. A. Silva and G. S. Trindade (2008) Comparative cytotoxic and anti-
424 tuberculosis activity of *Aplysina caissara* marine sponge crude extracts. *Comp. Biochem.*
425 *Physiol.* 1, 36-42.
426

427 27. Domingues, B. S. 2010. Sensibilidade de Linhagens Eritroleucêmicas Humanas a
428 Novas Amidas Graxas Sintéticas. MSc. Dissertation, Universidade Federal do Rio
429 Grande, Rio Grande, RS, Brasil.
430

431 28. Filgueira, D. DE M. V. B., D. P. S. Freitas, A. P. S. Votto, G. Filmann, J. M.
432 L. Gesracitano and G. S. Trindade (2007) Photodynamic Action of Benzo[a]pyrene in
433 K562 Cells. *Photochem. Photobiol.* 83, 1358-1363.
434

435 29. Storey, K. B. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian J*
436 *Med. Biol. Res.* 29, 1715-1733.
437

438 30. Livingstone, D. R. (2001). Contamination-stimulated reactive oxygen
439 species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656-
440 666.
441

442 31. Sandrini, J. Z., G. S. Trindade, L. E. M. Nery and L. F. Marins
443 (2009) Time-course Expression of DNA Repair-related Genes in Hepatocytes of
444 Zebrafish After UV-B Exposure. *Photochem. Photobiol.* 85, 220-226.
445

446 32. MacCarron, R. M., E. Shohami, D. Panikashvili, Y. Chen, S. Golech, A. Strasser, R.
447 Mechoulam and M. Spatz (2003) Antioxidant properties of the vasoactive
448 endocannabinoid, 2- Arachidonoylglycerol (2-AG). *Acta Neurochir.* 86, 271-275.
449

- 450 33.Godar, D.E., D.P. Thomas, A.S. Miller and W. Lee (1993) Long-
451 wavelengthUVAradiation induces oxidative stress, cytoskeletal damage and hemolysis.
452 Photochem.Photobiol. 57,1018-1026.
453
- 454 34.Contassot, E., Tenan, M., Schnüriger, V., Pelte, M-F. and Dietrich, P-Y. (2004)
455 Arachidonylethanolamide induces apoptosis of uterine cervix cancer cells via aberrantly
456 expressed vanilloid receptor-1. Gynecol. Oncol.**93**, 182-188.
457
- 458 35.Hsu, S-S., Huang, C-J., Cheng, H-H., Chou, C-T., Lee, H-Y., Wang, J-L., Chen, I-S.,
459 Liu, S-I., Lu, Y-C., Chang, H-T., Huang, J-K., Chen, J-S. and Jan, C-R. (2007)
460 Anandamide-induced Ca²⁺ elevation leading to p38 MAPK phosphorylation and
461 subsequent cell death via apoptosis in human osteosarcoma cells.Toxicology**231**, 21-29.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Optical density of B16F10 cells exposed to different concentrations (10, 100 or 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of oleyl benzyl amide - OBA (A) and ricinoyl benzyl amide - RIBA (B) by the MTT assay, immediately (0 h), 24 h and 48 h after exposure to fatty acid amides. Data are expressed as mean \pm 1 standard error. * - indicates significant difference from the respective control at each exposure time ($p < 0.05$).

Figure 2. Optical density of B16F10 cells exposed to different concentrations (10, 50, 100 or 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of oleyl benzyl amide - OBA (A) and exposed to different concentrations (10, 50, 100 or 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of OBA associated with 0.33 J/cm^2 of UVB - OBA + UVB (B) by the MTT assay, immediately (0), 24 h and 48h after each treatment. Data are expressed as mean \pm 1 standard error. * - indicates significant difference from the respective control at each exposure time ($p < 0.05$).

Figure 3. Reactive oxygen species (ROS) production (A) and antioxidant capacity against peroxyl radicals (ACAP) (B) in B16F10 cells exposed to oleyl benzyl amide (OBA; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 24 h), or UVB (irradiated with 0,33 J/cm^2) or co exposed to OBA + UVB compared to control cells. Data are expressed as mean \pm 1 standard error. Similar letters indicate absence of significant differences ($p > 0.05$).

Figure 4. Quantification of DNA damage expressed by Olive tail moment (OTM) values in B16F10 cells exposed to oleyl benzyl amide (OBA; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 24 h), or UVB (irradiated with 0.33 J/cm^2) or coexposed to OBA + UVB compared to control cells. Data are expressed as mean \pm 1 standard error. Similar letters indicate absence of significant differences ($p > 0.05$).

Figure 5. Optical density of melan-A cells by the MTT assay, exposed to different concentrations (10, 50, 100 or 150 $\mu\text{g/mL}$) of oleyl benzyl amide for 24 h and irradiated with 0.33 J/cm^2 UVB (OBA + UVB), immediately (0 h), 24 h and 48 h after the treatment. Data are expressed as mean \pm 1 standard error. * - indicates significant difference from the respective control at each exposure time ($p < 0.05$).

Figure 1

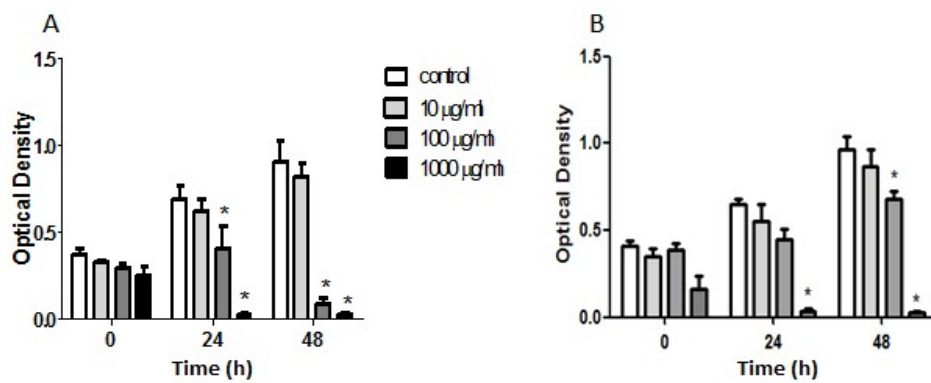


Figure 2

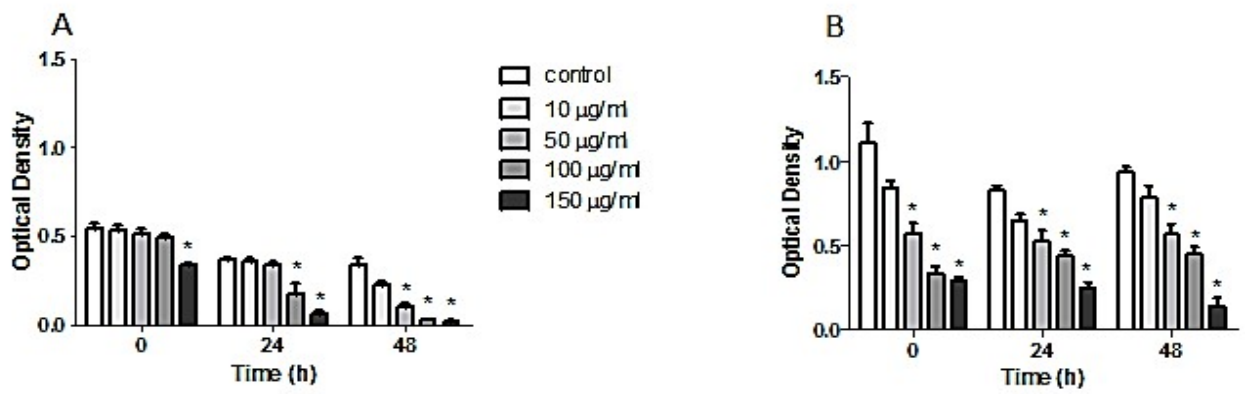


Figure 3

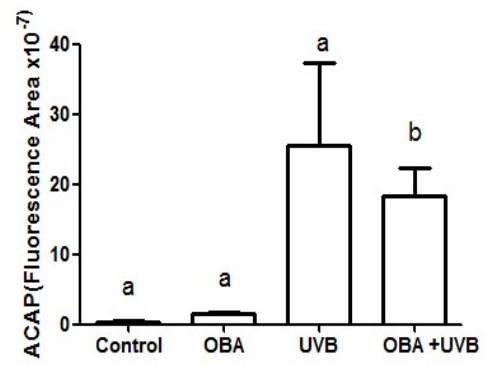
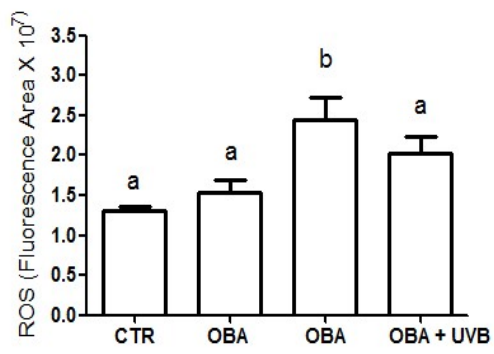


Figure 4

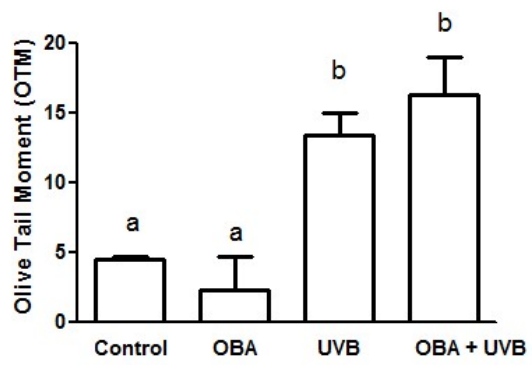
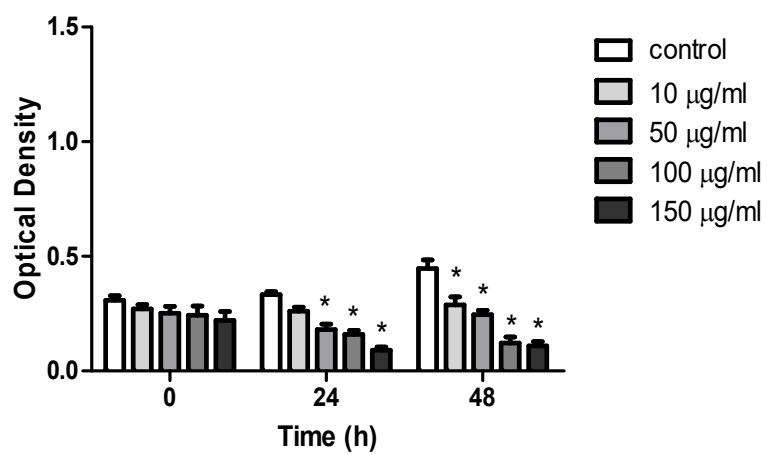


Figure 5



CONCLUSÃO GERAL

- A amida graxa sintética OBA foi mais citotóxica que a amida graxa sintética RIBA na linhagem celular B16F10. Por esse motivo tal amida foi escolhida para os testes posteriores.

- A amida graxa sintética OBA mostrou uma diminuição no número de células viáveis dependente da concentração e do tempo.

- A associação entre a amida graxa sintética OBA e a radiação UVB (OBA+UVB) para a linhagem de células B16F10 mostrou uma diminuição no número de células viáveis de maneira dependente da concentração, mas independente do tempo.

- Os resultados obtidos para produção de ROS e ACAP demonstram uma capacidade antioxidante da associação OBA+UVB, sugerindo que o estresse oxidativo não está envolvido na citotoxicidade da amida graxa sintética utilizada.

- Os danos ao DNA foram provocados pela associação da amida graxa sintética OBA e a radiação UVB (OBA+UVB).

- As células melan-A apresentaram uma menor sensibilidade quando expostas a associação OBA+UVB do que a observada para as células tumorais (B16F10).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akanmu, M. A.; Adeosun, S. O.; Ilesanmi O. R. 2007. Neuropharmacological effects of oleamide in male and female mice. *Behav. Brain Res.* 182: 88-94.
- Aloe, L.; Leon, A.; Levi-Montalcini, R. 1993. A proposed autacoid mechanism controlling mastocyte behaviour. *Agents Action.* 39: 145-147.
- Arafat, E. S.; Trimble, J. W.; Andersen, R. N.; Dass, C.; Desiderio, D. M. 1989. Identification of fatty acid amides in human plasma. *Life Sci* 45: 1679-1687.
- Bezuglov, V.V.; Bobrov, M.Y.; Archakov, A.V. 1998. Bioactive amides of fatty acids. *Biochemistry – Moscow* 63: 22-30.
- Bezuglov, V.; Bobrov, M.; Gretskaya, N.; Gonchar, A.; Zinchenko, G.; Melck, D.; Bisogno, T.; Di Marzo, V.; Kuklev, D.; Rossi, J.; Vidal, J.; Durand, T. 2001. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Amides of Polyunsaturated Fatty Acids with Dopamine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 447-449.
- Bifulco, M., Laezza, C., Pisanti, S. and Gazerro, P. 2006. Cannabinoids and cancer: pros and cons of an antitumor strategy. *Br J Pharmacol.* 148: 123-135.
- Bifulco, M. 2009. The endocannabinoid system: From biology to therapy. *Pharmacol. Res.* 60: 75-76.

- Bisogno, T.; Katayama, K.; Melck, D.; Ueda, N.; De Petrocellis, L.; Yamamoto, S.; Di Marzo, V. 1998. Biosynthesis and degradation of bioactive fatty acid amides in human breast cancer and rat pheochromocytoma cells: Implications for cell proliferation and differentiation. *Eur. J. Biochem.* 254: 634-642.
- Billhimer, W. L. 1989. Avaliação de filtros solares em seres humanos: proteção contra queimadura solar. *Cosmet.Toilet.* 1: 41-44.
- Blum, M.F., 1941. Photodynamic action and diseases caused by light. Reinhold, New York.
- Costing, G. E. and Hearing, V. J. 2007. Human Skin Pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *The FASEB Journal.* 21:976-998
- Chapman, R.S. 1995. Solar Ultraviolet Radiation and the risk of infectious disease: summary of a workshop. *Photochem.Photobiol.*61: 223-247.
- Cravatt, B.F.; Prospero-Garcia , O.; Suizdak , G.; Gilula, N.B.; Henriksen, S.J.; Boger, D.L.; Lerner, R.A. 1995. Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science* 268: 1506-1509.
- De Petrocellis, L.; Melck, D.; Palmisano, A.; Bisogno, T.; Laezza, C.; Bifulco, M.; Di Marzo, V. 1998. The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*95: 8375-8380.
- Dembitsky, V. M.; Shkrob, I.; Rozentsvet, O. A. 2000. Fatty acid amides from freshwater green alga *Rhizoclonium hieroglyphicum*. *Phytochemistry* 54: 965-7.
- Deménais, F. 1996. Interactions between genetic and epidemiological risk factors in cutaneous malignant melanoma in France. *Am. J. Hum. Genet.* v.59

- Deutsch, D.; Chin, S. 1993. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem. Pharmacol.* 46: 791-796.
- Di Marzo, V.; Bisogno, T.; Katayama, K.; Melck, D.; Ueda, N.; De Petrocellis, L.; Yamamoto, S. 1998. Biosynthesis and degradation of bioactive fatty acid amides in human breast cancer and rat pheochromocytoma cells Implications for cell proliferation and differentiation. *Eur. J Biochem.* 254: 634-642.
- Dougherty, T.J.; Gplndey, G.B.; Plel, R.; Welshaupt, K.R.; Boyle, D.G. 1975. Photoradiation therapy II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J. Natl. Cancer Inst.* 55: 115-21.
- D' Oca, C. R. M.; Coelho, T.M.; Tamara, G.H.; Carolina, R.L.; Rodrigo, da C. D.; Almeida, da S. P.; D Oca, M.G.M. 2010. Synthesis and antituberculosis activity of new fatty acid amides. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 20, 5255-5257.
- Foote, C.S. 1991. Definition of type-I and type-II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* 54: 659-872
- Gartner, L. P. and Hiatt .L. 1997. *Tratado de Histologia: em cores.* Guanabara Koogan p.34 - 257.
- Gonzales, G.F.; Cordova, A.; Vega, K.; Chung, A.; Villena, A., C. Gones 2003. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca), a root with aphrodisiac and fertility-enhancing properties, on serum reproductive hormone levels in adult healthy men. *J. Endocrinol.* 176: 163-168.
- Grimaldi, C.; Pisanti, S.; Laezza, C.; Malfitano, A.M.; Santoro, A.; Vitale, M.; Caruso, M.G.; Notarnicola, M.; Iacuzzo, I.; Portella, G.; Di Marzo, V.; Bifulco, M. 2006.

- Anandamide inhibits adhesion and migration of breast cancer cells. *Exp. Cell Res.* 312: 363-373.
- Haywood, R. 2006. Relevance of Sunscreen Application Method, Visible Light and Sunlight Intensity to Free-radical Protection: A Study of *ex vivo* Human Skin. *Photochem.Photobiol.* 82: 1123-1131.
- Henderson, B.W. and Dougherty, T.J. 1992. How does photodynamic therapy work? *Photochem.Photobiol.* 1: 145-157.
- Hillard, C.; Wilkison, D.; Edgemond, W.; Campbell, W. 1995.Characterization of the kinetics and distribution of N-arachidonylethanolamine (anandamide) hydrolysis by rat brain. *BiochimBiophys Acta* 1257: 249-256.
- Katsifis, A.; Pham, T.; Greguric, I.; Liu, X.; Berghofer, P.; Ballantyne, P.; Chapman, J.; Mattneer, F.; Dikic, B.; Jackson, T.; Loc'h, C. 2007. Synthesis and evaluation of Novel Radioiodinated Benzamides for Malignant Melanoma. *J.Med.Chem.* 50:3561-3572.
- Kangani, C. O.; Kelley, D. E. 2005.One pot direct synthesis of amides or oxazolines from carboxylic acids using Deoxo-Fluor reagent. *Tetrahedron Lett* 46: 8917-8920.
- Khan,I.; Zhao, J.; Muhammad, I.; Dunbar, D.; Mustafa, J. 2005. New Alkamides from Maca. *J.Agric Food Chem.* 53: 690-693.
- Kirchoff, V. W. J. H.1995. Ozônio e radiação UVB. São José dos Campos, São Paulo: Transtec.

- Lakshminarayana, G.; Paulose, M.M.; Kumari, N.B. 1984. Characteristics and composition of newer varieties of Indian castor seed and oil. *JAOCS* . 61: 1871-1872.
- Lucci, A.; Citro, H.W.; Wilson, L. 2001. Assessment of knowledge of melanoma risk factors, prevention and detection principles in Texas teenagers. *J. Surg. Res.* 97:179-83.
- Piomelli, D.; Fu, J.; Astarita, G.; Gaetani, S.; Kim, J.; Cravatt, B.; Mackie, K. 2007. Food Intake Regulates Oleoylethanolamide Formation and Degradation in the Proximal Small Intestine. *The J. Biol. Chem.* 282: 1518-1528.
- Re, G.; Barbero, R.; Miolo, A.; Di Marzo, V. 2007. Palmitoylethanolamide, endocannabinoids and related cannabimimetic compounds in protection against tissue inflammation and pain: Potential use in companion animals. *Vet J* 173: 21-30.
- Rodrigues, O. 2001. A dermatologia em dez anos de diagnósticos no laboratório de anatomia e patologia da FURG. *Vittale*. 13: 51-57.
- Schottenfeld, D. and Fraumeni, J.F. 1982. Cancer epidemiology and prevention. Philadelphia Saunders.
- Turner, C.; Whitehand, L.C.; Nguyen, T.; McKeon, T. 2004. Optimization of a supercritical fluid extraction/reaction methodology for the analysis of castor oil using experimental design. *J. Agric. Food Chem.* 52:26-32.
- Trindade, G. S., V. Rumjanek, M. A. M. Capella, O. R. A. L.S. Capella (1999) Differences in Sensitivity to UVC, UVB and UVA Radiation of a Multidrug

- Resistant Cell Line Overexpressing P-glycoprotein. *Photochem. Photobiol.* 69, 694-699.
- Ueda, N.; Kurahashi, Y.; Yamamoto, S.; Tokonuga, T. 1995. Partial Purification and Characterization of the Porcine Brain Enzyme Hydrolyzing and Synthesizing Anandamide. *J Biol. Chem.* 270: 23823-23827.
- Watanabe, K.; Kayano, Y.; Matsunaga, T.; Yamamoto, I.; Yoshimura, H. 1996. Inhibition of anandamide amidase activity in mouse brain microsomes by cannabinoids. *Biol. Pharm. Bull* 19: 1109- 1111.
- Wallace, V.; Segerdahl, A.; Lambert, D.; Vandevord, S.; Blackbeard, D.; Pheby, T.; Hasnie, F.; Rice, A. The effect of the palmitoylethanolamide analogue, palmitoylallylamide (L-29) on pain behaviour in rodent models of neuropathy. 2007. *Br J Pharmacol* 151: 1117-1128.
- Zhao, J.; Muhammad, I.; Dunbar, D. C.; Mustafa, J.; Khan, I. A. 2005. New alkamides from maca (*Lepidium meyenii*). *J. Agric. Food Chem.*, 53: 690-693.
- Zhang, X.; Wu, R.S.S.; Fu, W.; Xu, L.; Lam, P.K.S. 2004. Production of reactive oxygen species and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in KB cells co-exposed to Benzo[a]pyrene and UV-A radiation. *Chemosphere* 55: 1303-1308.
- Zoccali, C.; Macarrone, M.; Spoto, B.; Parlono, G.; Battista, N.; Sgro, E.; Gasperi, V. 2006. Human adipose tissue binds and metabolizes the endocannabinoids anandamide and 2- arachidonoylglycerol. *Biochimie* 88: 1889-1897.

