



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

IRIANA MORATTO CARRARA

**METFORMINA COMO AGENTE PREVENTIVO DO
CARCINOMA ESPINOCELULAR DE PELE INDUZIDO POR
UVB:
PERFIL OXIDATIVO CUTÂNEO E SISTÊMICO**

IRIANA MORATTO CARRARA

**METFORMINA COMO AGENTE PREVENTIVO DO
CARCINOMA ESPINOCELULAR DE PELE INDUZIDO POR
UVB:
PERFIL OXIDATIVO CUTÂNEO E SISTÊMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra
Lourenço Cecchini Armani.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Moratto Carrara, Iriana .

Metformina como agente preventivo do carcinoma espinocelular de pele induzido por UVB : Perfil oxidativo cutâneo e sistêmico / Iriana Moratto Carrara. - Londrina, 2016.
64 f. : il.

Orientador: Alessandra Lourenço Cecchini Arman.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Carcinoma espinocelular de pele experimental - Tese. 2. Estresse oxidativo cutâneo e sistêmico - Tese. I. Lourenço Cecchini Arman, Alessandra. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

IRIANA MORATTO CARRARA

**METFORMINA COMO AGENTE PREVENTIVO DO CARCINOMA
ESPINOCELULAR DE PELE INDUZIDO POR UVB:
PERFIL OXIDATIVO CUTÂNEO E SISTÊMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Lourenço
Cecchini Armani
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Sara Santos Bernardes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 28 de maio de 2016.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora , Profa. Dra. Alessandra L. Cecchini Armani por ter me concedido a oportunidade que transformou minha vida e por ter me orientado durante a realização deste trabalho.

À minha amiga e colega de laboratório Gabriella Pasqual Melo, que me acolheu no primeiro dia de estágio no laboratório e me ensinou tudo o que pode, o que contribuiu imensamente para o desenvolvimento da minha independência dentro do laboratório.

Aos técnicos do laboratório de Patologia Experimental Jesus Antônio Vargas e Pedro Sebastião Dionísio, imprescindíveis para a realização deste trabalho devido à toda ajuda prestada durante a minha jornada, pela atenção e carinho.

À Profa Dra Sara Santos Bernardes e ao Prof Dr Rodrigo Cabral Luiz pela dedicação dada ao presente trabalho e por contribuírem pela melhoria do mesmo.

Aos professores do laboratório de Patologia Experimental Rubens Cecchini, Rodrigo Cabral Luiz, Flávia Alessandra Guarnier e Jair Tonon por sempre serem gentis comigo e por sempre estarem dispostos à responder as minhas dúvidas e compartilharem seu conhecimento. À Profa. Dra. Leandra N. Z. Ramalho por ter realizado a imunohistoquímica do presente trabalho.

À todos os amigos e colegas contemporâneos do laboratório de Patologia Experimental Gabriella Pasqual Melo, Fernanda Paschoal Blegniski, Thâmara Alves, Jean Lucas Kremer, Poliana Marinello, Thamara Nishida, Laís Roberta Sábio, Fernando Pinheiro, Fernando Borges, Adriano Aranome, Heloíza Bordini por sempre ajudarem em questões teóricas e práticas, assim como pela amizade. Eu tenho muita admiração por cada um de vocês.

Aos meus pais Rose e Beto e meus irmãos Rafaella e Mikael, por sempre demonstrarem admiração pelo o que eu faço e por sempre me apoiarem nas minhas decisões.

À Capes pela concessão da bolsa de mestrado e suporte na pesquisa científica.

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos”.

(Friedrich Nietzsche)

CARRARA, Iriana Moratto. **Metformina como agente preventivo do carcinoma espinocelular de pele induzido por UVB: perfil oxidativo cutâneo e sistêmico.** 21016. 64 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

O carcinoma espinocelular de pele (CEC) está fortemente relacionado à exposição crônica ao sol. A exposição à UV induz a produção de espécies reativas de oxigênio e destruição da defesa antioxidante epidérmica levando ao dano oxidativo. Em longo prazo, o dano cumulativo pode desencadear a fotocarcinogênese e desenvolvimento do CEC. Sendo assim, a busca por agentes preventivos tem crescido de maneira significativa. Estudos epidemiológicos indicam que pacientes sob o uso de metformina (MET) – um antihiperlipemizante oral utilizado no tratamento do diabetes *mellitus* tipo 2 – apresentam menor incidência em diversos tipos de câncer em relação a pacientes tratados com outro fármaco. Tendo em vista a relação estabelecida entre o estresse oxidativo (EO) e o câncer, bem como o potencial antineoplásico da MET, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito preventivo da MET sob o CEC experimental induzido por UVB, através da análise dos parâmetros de EO. Camundongos hairless HRS/J foram divididos em dois grupos controle (MET e PBS) e dois grupos experimentais (PBS+UVB e MET+UVB). Os animais foram tratados diariamente com MET i.p. (90 mg/kg) ou PBS e em seguida submetidos à radiação UVB cinco vezes na semana por 16 minutos ($0,228 \text{ J/cm}^2$), durante 15 semanas (dose cumulativa = $17,1 \text{ J/cm}^2$). Coletou-se o sangue e a pele do dorso livre de lesão para as análises sistêmicas e locais de EO, bem como as lesões cutâneas induzidas por UVB para análise histopatológica e imunohistoquímica. Os animais do grupo PBS+UVB que desenvolveram CEC apresentaram aumento dos níveis 3-NT, 4-HNE e p53 no tecido tumoral, acompanhado do aumento dos níveis de MDA e diminuição da atividade da catalase e capacidade antioxidante total (TRAP) na pele adjacente. Sistemicamente nestes animais, o EO foi refletido por diminuição de GSH e aumento de GSSG, acompanhado do aumento dos níveis de AOPP e diminuição da TRAP. O tratamento com MET diminuiu a proliferação epidérmica e o dano epitelial, os níveis de p53, 4-HNE e 3-NT no tecido tumoral e foi capaz de restaurar a defesa antioxidante e prevenir a produção de MDA na pele adjacente. A nível sistêmico, a MET preveniu o aumento dos níveis de AOPP. Este é o primeiro trabalho a fornecer evidências de que um dos mecanismos da MET envolve uma regulação positiva do sistema antioxidante epidérmico. Ainda, o presente estudo evidencia a relação entre o EO induzido por UVB e sugere que, no CEC, o EO ocorre em nível local e sistêmico, fornecendo base para estudos prospectivos a fim de padronizar biomarcadores decorrentes do dano foto oxidativo, no sangue e na pele.

Palavras-chave: Câncer de pele não melanoma. Carcinoma Espinocelular. Metformina. Estresse Oxidativo. Sistema antioxidante. Perfil oxidativo sistêmico.

CARRARA, Iriana Moratto. **Metformin as a preventive agent of UVB-induced squamous skin cell carcinoma**: cutaneous and systemic oxidative profile. 2016. 64 p. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Squamous skin cell carcinoma (SCC) is strongly related to solar chronic exposure. Exposure to UV induces reactive oxygen species production and destruction of epidermal antioxidant defense leading to oxidative damage. Long-term effect, cumulative damage can trigger photocarcinogenesis and SCC development. Thus, preventive agents has been extensively researched. Epidemiological studies indicate that patients treated with metformin (MET) - an oral antihyperglycaemic drug used to treat diabetes mellitus - present lower incidence in several types of cancer than patients treated with another drug. Given the established relationship between oxidative stress (OS) and cancer, as well as the antineoplastic potential of MET, the objective of this study was to evaluate the preventive effect of MET in UVB-induced SCC, by analyzing OS parameters. Hairless HRS/J mice were divided into two control groups (MET and PBS) and two experimental groups (PBS + UVB and MET + UVB). Animals were treated daily with MET i.p. (90 mg / kg) or PBS and then submitted to UVB radiation five times a week for 16 minutes (0.228 J / cm²) for 15 weeks (cumulative dose = 17.1 J / cm²). Blood and adjacent skin from cutaneous lesions were collected for systemic and local OS analyzes as well as UVB-induced cutaneous lesions for histopathological and immunohistochemical analysis. The animals from PBS + UVB group that developed SCC showed increased levels of 3-NT, 4-HNE and p53 in tumor tissue, accompanied by increased MDA levels and decreased catalase activity and total antioxidant capacity (TRAP) in adjacent skin . Systemically, these animals showed OS reflected by decreased GSH and increased GSSG, accompanied by increased AOPP levels and decreased TRAP. MET treatment reduced epidermal proliferation and epithelial damage, p53, 4-HNE and 3-NT levels in tumor tissue and was able to restore antioxidant defense and prevent production of MDA in adjacent skin. At the systemic level, MET prevented increase in AOPP levels. This is the first work to provide evidence that one of the MET mechanisms involves a positive regulation of the epidermal antioxidant system. Furthermore, the present study evidences the relationship between UVB-induced OS and suggests that OS occurs at local and systemic level in SCC, providing a basis for prospective studies to standardize biomarkers due to photo oxidative damage in blood and blood.

Keywords: Non melanoma skin cancer. Squamous skin cell carcinoma. Metformin. Oxidative stress. Antioxidant system. Systemic oxidative profile.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Aspectos macroscópicos do carcinoma espinocelular de pele e queratose actínica.....	12
Figura 2 – Estrutura da pele e camadas da epiderme	13
Figura 3 – Histopatologia da queratose actínica	15
Figura 4 – Histopatologia do carcinoma espinocelular de pele	16
Figura 5 – Fontes endógenas de espécies reativas de oxigênio	18
Figura 6 – Produção de ânion superóxido nos complexos I e III.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Quinase ativada por AMP
CAT	Catalase
CBC	Carcinoma basocelular
CEC	Carcinoma espinocelular
CPNM	Câncer de pele não melanoma
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidermal
EO	Estresse oxidativo
ERK	Quinase regulada por sinais extracelulares
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
GLUT4	Transportador de glicose do tipo 4
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GR	Glutaciona redutase
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MDA	Malondialdeído
MAP kinases	Proteínas kinases ativadas por mitógenos
mTORC1	Complexo 1 da proteína alvo da rapamicina de mamíferos
mTORC2	Complexo 2 da proteína alvo da rapamicina de mamíferos
NFkB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
OCT1	Transportador de cátions orgânicos 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
p53	Supressor tumoral p53
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PTEN	fosfatase homóloga de tensina
QA	Queratose actínica
SOD	Superóxido dismutase

TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
TRAP	Capacidade antioxidante total
UV	Ultravioleta
4-HNE	4-Hidroxinonenal
3-NT	3-nitrotirosina
8-OH-dg	8-hidroxideoxiguanosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVO	29
2.1	OBJETIVO GERAL.....	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
2.2.1	Primeiro Artigo.....	29
2.2.2	Segundo Artigo.....	29
3	HIPÓTESE	31
3.1	HIPÓTESE 1.....	31
3.2	HIPÓTESE 2.....	31
3.3	HIPÓTESE 3.....	31
4	ARTIGO CIENTÍFICO	32
4.1	LOOKING BEYOND THE SKIN: CUTANEOUS AND SYSTEMIC OXIDATIVE STRESS IN UVB-INDUCED SQUAMOUS SKIN CELL CARCINOMA	33
5	CONCLUSÃO	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA

1.1.1 Aspectos Epidemiológicos e Clínicos do Câncer de Pele Não Melanoma

O câncer de pele não melanoma (CPNM) corresponde a 20% das neoplasias cutâneas e é representado por dois principais tipos: o carcinoma basocelular (CBC), que representa 80% dos CPNM e o carcinoma espinocelular (CEC), representando 20% dos casos de CPNM (KRAFT & GRANTER, 2014; INCA, 2015).

No Brasil, O CPNM representa 25% das neoplasias malignas registradas, sendo o tumor mais incidente em ambos os sexos nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste, e o segundo nas regiões Norte e Nordeste (INCA, 2015). A estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para os anos de 2016/2017 é de 80.850 novos casos entre homens e de 94.910 em mulheres, totalizando uma incidência de 175.760 novos casos na população brasileira (INCA, 2015). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), a incidência anual de novos casos de CPNM é 2-3 milhões, em todo o mundo (WHO, 2016).

O fator de risco predominante para o desenvolvimento do CPNM corresponde à exposição crônica a radiação ultravioleta (UV), assim como para lesões cutâneas que podem evoluir para CPNM, como a queratose actínica (QA) (MURAD & RATNER, 2001; ORAZIO, et al., 2013; BARRETTE, et al., 2013; KOYUNCUER, 2014; WILLIAMS, et al., 2014; COSTA, et al., 2015). A radiação UV é um carcinógeno ambiental bem estabelecido e atua como iniciador e promotor desta neoplasia, através da formação de dímeros de pirimidina, produção de espécies reativas por fotosensibilização, inflamação e imunossupressão (CARR, et al., 2012; D'ORAZIO, et al., 2013; WILLIAMS, et al., 2014; DAMIANI & ULLRICH, 2016).

Sendo assim, considerando a etiologia da doença, as regiões do corpo frequentemente expostas ao sol, como cabeça e pescoço são os locais mais frequentes para o aparecimento do tumor (SCHMULTS, et al., 2013), representando 65% das áreas acometidas pelo CEC em indivíduos de pele clara, e 35% em indivíduos de pele mais escura (KRAFT & GRANTER, 2014; KOYUNCUER, 2014).

Os fatores de risco para o CPNM relacionados a exposição solar correspondem a cor da pele e idade. Indivíduos com fenótipo Fitzpatrick I-III e de idade avançada são os mais acometidos por esta neoplasia, em função da menor expressão de eumelanina e dano cumulativo de radiação, respectivamente (D’ORAZIO, et al., 2013; KRAFT & GRANTER, 2014; HAY & FULLER, 2015).

Como mencionado, lesões pré existentes, como a QA, representa um importante fator de risco para progressão do CPNM, em particular, o CEC (COSTA, et al., 2015; DODDS, CHIA & SCHUMAK, 2014). A QA, ou queratose solar, corresponde a uma lesão decorrente da exposição excessiva ao sol, que pode anteceder o CEC. Segundo Costa e colaboradores (2015), a QA pode regredir, permanecer estável ou, em 0,1-20% dos casos, pode progredir para carcinoma in situ ou CEC. Evidências histológicas mostram que a maioria dos CEC se dá a partir da QA, porém não é possível prever qual lesão de QA irá avançar (ZALAUDEK, GIACOMEL, et al., 2012). Porém, pacientes que apresentam 5 ou mais lesões de QA possuem até 80% de chance de desenvolver CEC (DODDS, CHIA & SCHUMAK, 2014). A Figura 1 representa os aspectos macroscópicos da lesão de CEC e QA na pele.

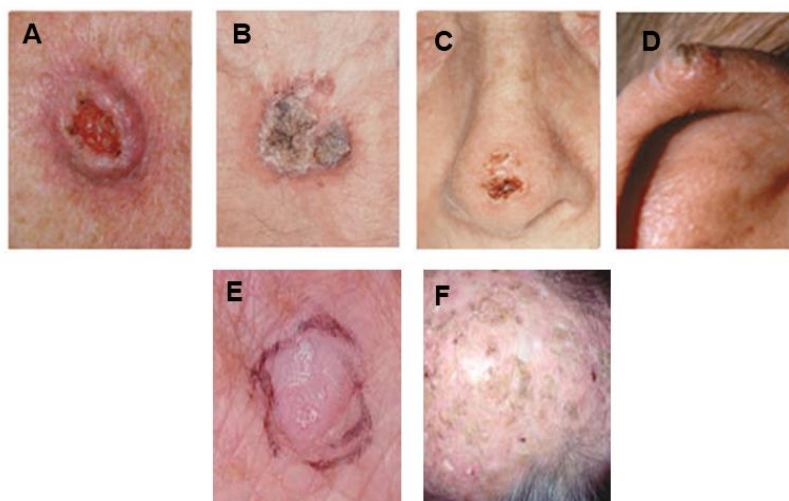


Figura 1 – Aspectos macroscópicos do carcinoma espinocelular de pele e queratose actínica. Clinicamente, as lesões de CEC podem se manifestar como (A) placas escamosas e avermelhadas com bordas irregulares, (B) elevações com depressão central, (C) uma ferida persistente que não cicatriza, (D) assim como na forma de verruga. A QA pode se manifestar como (E) lesões avermelhadas de superfície escamosa e crostosa, bem como (F) múltiplas lesões de textura áspera semelhante

a verrugas. (Fonte: Skin Cancer Foundation, 2016). Disponível em: <<http://www.skincancer.org>> Acesso em 7 de jan. 2016.

Existem particularidades entre CBC e CEC, que envolve aspectos estruturais e clínicos. A origem destes dois tipos de CPNM se dá na epiderme na pele. Porém, o CBC é originado a partir das células da camada basal e o CEC a partir dos queratinócitos da camada espinhosa (Figura 2) (KRAFT & GRANTER, 2014; INCA, 2015).

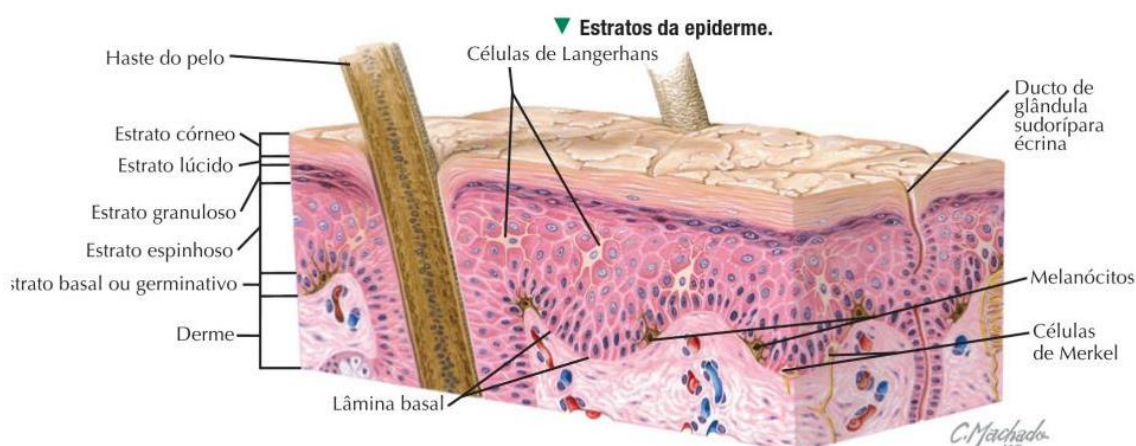


Figura 2 – Estrutura da pele e camadas da epiderme. A pele é dividida em hipoderme, derme e epiderme. A epiderme consiste de um epitélio pavimentoso estratificado, constituída em 95% por células denominadas queratinócitos. Outros tipos celulares, como melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel representam 5% da composição da epiderme. A morfologia e estado de diferenciação dos queratinócitos formam a base para a identificação das quatro camadas da epiderme, denominadas (1) camada basal, (2) camada espinhosa, (3) camada granular e (4) camada cornéa. O CPNM tem sua origem a partir da transformação maligna das células da epiderme. O subtipo CBC é originado a partir das células da camada basal e o CEC a partir dos queratinócitos da camada espinhosa (Fonte: OVALLE, W. NETTER, BASES DA HISTOLOGIA, 2008).

Considerando o padrão de exposição ao sol, o CBC parece estar relacionado a exposições intermitentes ao sol, enquanto o CEC está fortemente associado à exposição cumulativa ao sol (KRAFT & GRANTER, 2004; LUCAS, et al., 2015). Em relação à agressividade do CPNM, O CEC possui maior probabilidade de metastatizar, em comparação ao CBC (ALAM & RATNER, 2001). Quando manifestado em regiões como têmporas, orelhas e lábios, o CEC apresenta caráter mais agressivo, devido ao aumento do risco de recorrência e metástase. Tais

eventos estão associados ao tamanho do tumor (diâmetro maior que 2 cm) e localização, pois favorecem a infiltração nodal (ALAM & RATNER, 2001; MCGUIRE, GE & DYSON, 2009; SCHMULTS, et al., 2013).

Brougham e colaboradores (2012) verificaram ocorrência de metástase em 1,9 - 2,6% em pacientes portadores de CEC. Schmults e colaboradores (2013), ao estudarem fatores de risco associados a um pior prognóstico de CEC, verificaram que os pacientes acometidos por CEC apresentaram risco de metástase de 3-7% e risco de morte correspondente a 2,1% (BROUGHAM, et al., 2012; SCHMULTS, et al., 2013).

O diagnóstico do CPNM inicia-se com a anamnese do paciente e exame físico, no qual é considerado o histórico do paciente sobre a exposição ao sol na infância, exposição à UV ocupacional ou não, bem como outras informações relacionadas a outros fatores de risco em potencial, como produtos químicos carcinogênicos e imunossupressão (ALAM & RATNER, 2001). O diagnóstico diferencial entre CBC e CEC é realizado através da análise histopatológica do tecido tumoral (KRAFT & GRANTER, 2014; KOYUNCER, 2014), conforme descrito no próximo tópico.

Apesar de apresentar um bom prognóstico e possuir baixa taxa de mortalidade em relação ao melanoma, o CPNM pode levar a ulcerações dolorosas e deformidades graves na pele quando não diagnosticado precocemente, uma vez que a remoção cirúrgica do tumor é o tratamento mais indicado para esta neoplasia (PHILLIPS, et al., 2013; INCA, 2015; WHO, 2016; SEBER, et al., 2016). Dependendo da extensão do tumor, a cirurgia torna-se mutilante e causa grandes transtornos psicológicos aos pacientes, dificultando sua sociabilização e qualidade de vida. Sendo assim, os pacientes acometidos necessitam de suporte psicológico e/ou psiquiátrico, antes e após o tratamento cirúrgico, devido ao grande impacto psicológico que estes podem sofrer devido à possibilidade de lesão desfigurante (NICE, 2006; BATH-HEXTALL, et al., 2013; LIU, et al., 2015).

Além disso, dependendo da área afeta, a remoção cirúrgica não é recomendada, em virtude da localização da lesão ou existência de metástase. Nestes casos, existem poucas opções de tratamento (SEBER, et al., 2016). Uma das intervenções terapêuticas corresponde à quimioterapia a base de cisplatina, porém este quimioterápico frequentemente leva a leucopenia e nefrotoxicidade e pode ser letal para indivíduos idosos que são os mais acometidos pelo CEC. O

tratamento com cetuximab, um anticorpo inibidor do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) – que está relacionado ao desenvolvimento da doença – apresenta eficácia no tratamento de CEC, assim como no CEC recorrente (SEBER, et al., 2016). Entretanto, ainda há dúvidas em relação à abordagem terapêutica na doença localizada e avançada e a compreensão dos mecanismos da doença faz-se necessário (PALYCA, et al., 2014).

1.2 Histopatologia da Queratose Actínica e Carcinoma Espinocelular de Pele

A QA corresponde a uma lesão decorrente da exposição excessiva ao sol, com alto potencial de malignização com evolução para CEC. Conforme pode ser observado na Figura 3, histologicamente, a QA é representada por displasia celular, com variação no tamanho e forma celular, núcleos hipercromáticos com volume aumentado e forma irregular. A QA pode apresentar hiperproliferação da camada de córnea, evento denominado hiperqueratose (COCKERELL, 2000; ALAM & RATNER, 2001; DODDS, CHIA & SCHUMAK, 2014).

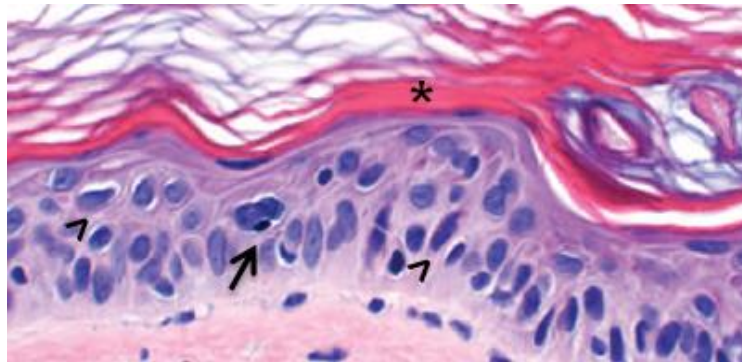


Figura 3 – Histopatologia da queratose actínica. A lesão é caracterizada histologicamente por hiperproliferação da epiderme e queratinócitos apresentando atipias celulares, dentre elas: variação no tamanho e forma celular (cabeça de seta), núcleos hipercromáticos com volume aumentado e forma irregular (seta), comprometendo parcialmente a epiderme, podendo ou não apresentar hiperqueratose (*). H&E 200x (Fonte: KRAFT & GRANTER, 2014).

O carcinoma *in situ* representa forma localizada do CEC. Histologicamente, o carcinoma *in situ* é caracterizado por hiperproliferação de queratinócitos neoplásicos comprometendo a epiderme em sua totalidade, porém a lesão mantém-se confinada

a mesma, sem invasão dérmica. Por outro lado, a lesão de CEC estende-se além da epiderme, invadindo a membrana basal e a derme da pele (Figura 4), representando, dessa forma, a principal característica que leva ao diagnóstico diferencial entre as formas localizada (*in situ*) e invasiva (CEC) (MCGUIRE, GE & DYSON, 2009; DOODS, CHIA & SCHUMAK, 2014; FLORENCE, et al., 2015).

Além de comprometer a integridade da epiderme e apresentar invasão dérmica, o CEC é caracterizado por ninhos eosinofílicos e pontes intercelulares, podendo ou não apresentar atipias celulares, conforme ilustrado na Figura 4A. Um achado frequente desta neoplasia corresponde ao queratocisto, ou perla córnea, estrutura originada pelo excesso de queratinização, que se dá em aspecto concêntrico e que pode se formar na epiderme ou derme, conforme mostra a Figura 4B (ACS, 2013; DOODS, CHIA & SCHUMAK, 2014; KOYUNCUER, 2014; KRAFT & GRANTER, 2014).

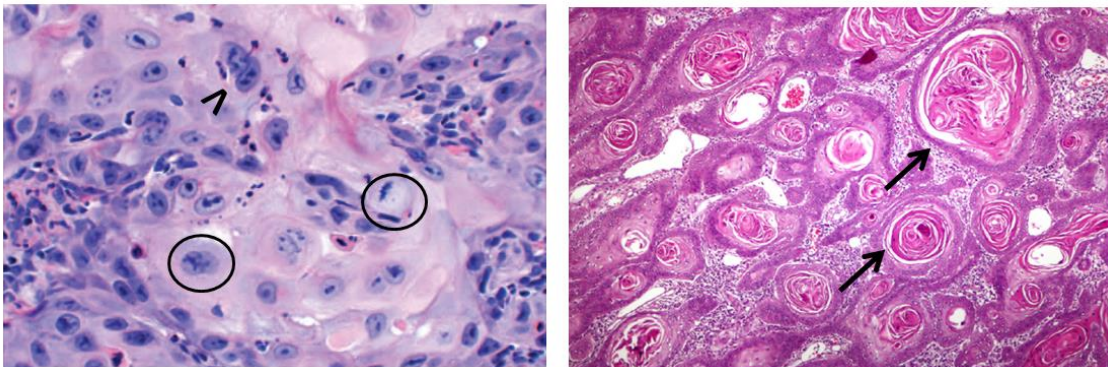


Figura 4 – Histopatologia do carcinoma espinocelular de pele (CEC). O diagnóstico do CEC é feito pela histopatologia do tecido tumoral e diferencia-se histologicamente do carcinoma *in situ* pela perda da integridade da membrana basal e invasão dérmica. A) CEC com presença ninhos eosinofílicos na derme. Observa-se pontes intercelulares (cabeça de seta) e mitose atípica (círculos) (H&E 200x); B) CEC com presença de pérolas córneas de queratinização (setas). H&E 400x. (Fonte: KRAFT & GRANTER, 2014; KOYUNCUER, 2014).

1.2 CARCINOMA ESPINOCELULAR, ESTRESSE OXIDATIVO E FOTO CARCINOGENESE

Como mencionado, o principal fator etiológico do CEC é a exposição crônica à radiação UV (MURAD & RATNER, 2001; ORAZIO, et al., 2013;

BARRETTE, et al., 2013; KOYUNCUER, 2014), e sua incidência aumenta proporcionalmente à exposição solar cumulativa (WILLIAMS, et al., 2014). O mesmo ocorre para a QA e carcinoma in situ (ACS, 2013; KRAFT & GRANTER, 2014; COSTA, et al., 2015).

A radiação UV desencadeia a tumorigênese do CPNM, em particular do CEC, processo denominado fotocarcinogênese, que consiste nas fases de iniciação, promoção e progressão do tumor. Sua patogênese molecular – assim como na grande maioria das neoplasias – é caracterizada pela inibição da apoptose e hiperproliferação celular, resultando na progressão do tumor (KRAFT & GRANTER; KATTA & BROWN, 2015).

Os principais genes mutados no CEC correspondem ao gene de reparo p53, ARF e INK4b e a via PTEN/PI3K/Akt. A alteração da via PI3K/Akt está associada ao aumento da ativação da mTORC1, uma proteína quinase envolvida com o crescimento e proliferação celular, através da regulação síntese protéica, bem como associada com a transdução de sinal do fator de crescimento epidermal (EGF) (ANG & BERKEY, 2002; SEGRELLES, et al., 2007; ATHAR & KOPELOVICH, 2011; DODDS, CHIA & SCHUMAK, 2014; LIN, et al, 2014; FLORENCE, et al., 2015).

1.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio e Sistema Antioxidante

As Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Nitrogênio (ERN) correspondem a átomos ou moléculas derivadas do oxigênio que, em sua grande maioria, possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica, o que proporciona uma alta reatividade a estas espécies. Dentre as ERO e ERN pode-se destacar o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico ($\cdot NO$), peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) e os peróxidos orgânicos (LOOH) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; FERREIRA & MATSUBARA, 2001).

O metabolismo intracelular possui diversas fontes que levam indiretamente ou diretamente à produção de ERO (Figura 5). Através das reações de oxirredução, as ERO atuam como moléculas sinalizadoras em vias de transdução de sinal, necessárias para processos fisiológicos da célula, bem como outras funções. A regulação da homeostase redox é essencial para manter as funções celulares

adequadas, assim como a sobrevivência da célula (GORRINI, HARRIS & MAK, 2013; HOLMSTRÖM & FINKEL, 2014).

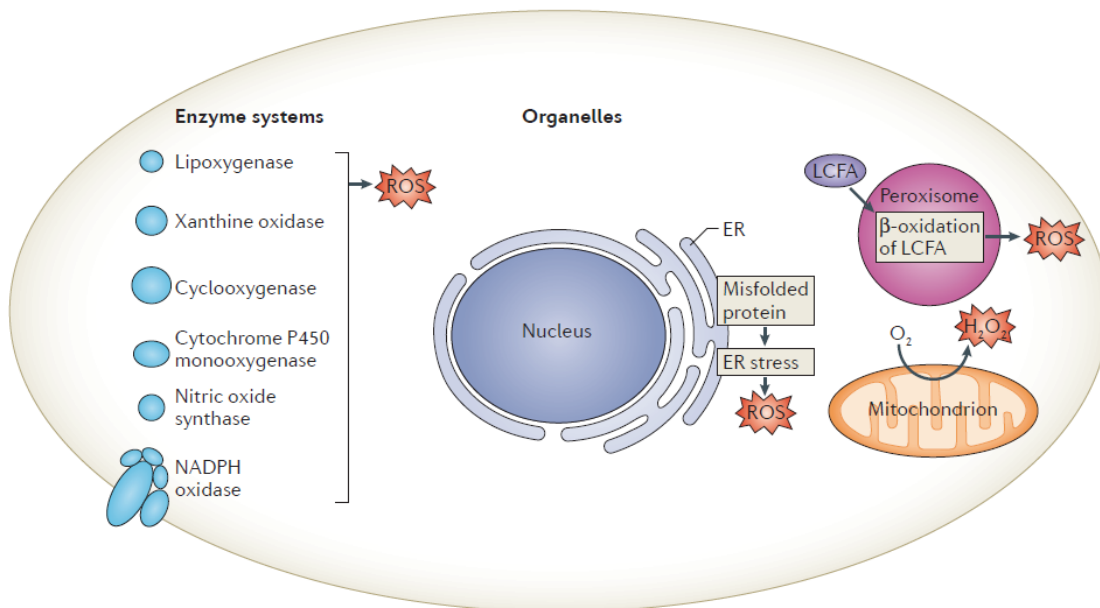


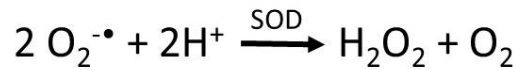
Figura 5 – Fontes endógenas de espécies reativas de oxigênio. O metabolismo intracelular possui sistemas oxidantes enzimáticos e não enzimáticos que levam a produção de ERO. Com exceção do sistema NADPH oxidase, que tem por finalidade a produção de ERO, a geração de espécies reativas ocorre como subproduto de reações biológicas (Fonte: HOLMSTROM & FINKEL, 2014).

Estímulos exógenos também induzem a produção de ERO e contribuem fortemente para o desbalanço redox, que correspondem à radiação UV e ionizante, poluentes ambientais, altas concentrações de O_2 , lesões físicas, microorganismos, entre outros. (KOHEN & GATI, 2000; HOLMSTRÖM & FINKEL, 2014).

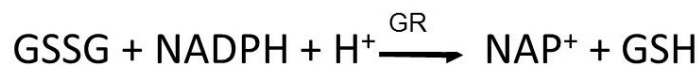
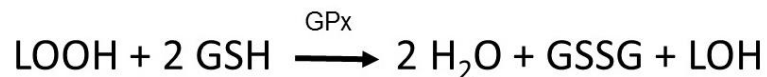
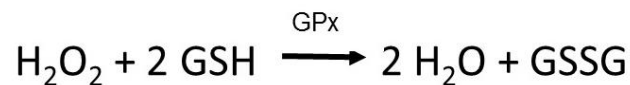
Sendo assim, para manter as ERO em concentrações ideais e prevenir o desequilíbrio redox, a pele possui um sistema de defesa antioxidante endógeno, constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos, que controlam as ERO. Acredita-se que a defesa antioxidante também desempenhe papel sinalizador, em virtude de sua alta especificidade com as espécies reativas, atuando como sensores e transdutores dos sinais dependentes das reações redox. Os principais componentes antioxidantes epidérmicos correspondem às enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), bem como pelo sistema glutatona e

por antioxidantes de baixo peso molecular (ESCOBAR, RUBIO & LISSI, 1995; GUARATINI, MEDEIROS & COLEPICOLO, 2006; HOLMSTRÖM & FINKEL, 2014).

A SOD é responsável pela dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 e a CAT catalisa especificamente a degradação do H_2O_2 em H_2O e O_2 (FERREIRA & MASTUBARA, 2001):



O sistema glutathiona, composto pela glutathiona peroxidase (GPx), que atua na remoção de H_2O_2 e de peróxidos orgânicos, catalisa oxidação da glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSG). A GSH, tiol crucial na manutenção do *status* redox, pode ser recuperada através da ação da enzima glutathiona redutase (GR), reciclando a GSSG em GSH. A GR utiliza NADPH como cofator, dependendo, dessa forma, da integridade das vias da pentose fosfato, que gera NADPH (FERREIRA & MASTUBARA, 2001):



A relação GSH/GSSG pode definir o *status* redox celular, uma vez que estes parâmetros refletem o *status* oxidativo que interagem com o sistema glutathiona, bem como os processos redutores que mantêm a homeostase redox (JONES, 2006).

Os antioxidantes de baixa massa molecular presentes na pele são capazes de prevenir o dano oxidativo por interações diretas e indiretas com as ERO. Eles podem atuar como *scavengers*, doando elétrons para as espécies reativas e estabilizá-las, outros podem atuar como quelantes de metais de transição, em especial o ferro, prevenindo, dessa forma, a participação destes íons nas reações de Haber-Weiss e Fenton, no qual ocorre a formação de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e OH^{\cdot} . Também há antioxidantes de baixa massa molecular que podem atuar como precursores na

síntese de compostos com ação antioxidante. Podem ser destacados o α -tocoferol, ácido ascórbico, peptídeos de histidina, proteínas de ligação ao ferro, como transferrina e ferritina, ácido lipóico, melatonina, urato, ácido uracênico e tióis (KOHEN & GAITI, 2000; GUARATINI, MEDEIROS & COLEPICOLO, 2006).

Em condições anormais no qual há produção desequilibrada de ERO, ocorre o estresse oxidativo, estado pró-oxidante caracterizado pelo desequilíbrio entre ERO e antioxidantes. Esta situação pode ser ocasionada por aumento da produção de ERO, proveniente dos estímulos exógenos ou endógenos, podendo estar associado a distúrbios da defesa antioxidante. Sendo assim, no estresse oxidativo, as ERO passam a atuar de maneira inespecífica e descontrolada, ocasionando lesões oxidativas em células e tecidos (KOHEN & GATI, 2000; JONES, 2006; SENA & CHANDEL, 2012; HOLMSTRÖM & FINKEL, 2014).

As ERO podem reagir prontamente com os sistemas biológicos, como componentes protéicos – estruturais e enzimáticos – lipídeos de membrana celular e de organelas e DNA. O dano oxidativo compromete a estrutura e função das biomoléculas, podendo acarretar em disfunção das vias de sinalização, indução da resposta inflamatória e morte celular. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; FERREIRA & MASTUBARA, 2001).

As membranas celulares e de organelas são altamente susceptíveis à ação das espécies reativas, que interagem com as ligações covalentes da estrutura lipídica, desencadeando um processo em cadeia denominado lipoperoxidação. Esta reação leva a produção de lipoperóxidos e aldeídos, como o 4-hidroxinonenal (4-HNE) e o produto final desta reação em cadeia, o malondialdeído (MDA) (FERREIRA & MASTUBARA; DICKINSON & FORMAN, 2002). O dano oxidativo às proteínas é refletido pela modificação das cadeias polipeptídicas, formando derivados de carbonila que podem se acumular no tecido. Em nível de DNA, ocorre a produção de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OH-dG), que está associado à fase de iniciação do tumor (CHEN, HU & YANG, 2012).

1.2.2 Radiação Ultravioleta

A radiação solar corresponde a um espectro de radiação eletromagnética, dividido basicamente em radiação UV (200 a 400nm), visível (400 a 700nm) e infravermelho (700 a 900nm). Ainda, a radiação UV é subdividida nas

faixas UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (100-290 nm). Cada região deste espectro interage com a pele dependente das propriedades químicas e físicas das moléculas que absorvem a radiação (ORAZIO, et al 2013).

Classicamente, o dano ao DNA induzido pela radiação UV é classificado por dois principais mecanismos, dependente do comprimento de onda (KIELBASSA, ROZA & EPE, 1997):

- a) Mecanismos diretos por excitação direta do DNA induzido pela UVB;
- b) Mecanismos indiretos que envolvem a excitação fotosensibilizadores endógenos, induzido pela UVA (KIELBASSA, ROZA & EPE, 1997).

O espectro da UVB é absorvido principalmente por bases nitrogenadas pirimidinas, as timinas e citosinas, porém também é absorvido pelas duplas ligações conjugadas de ácidos orgânicos nas proteínas. Desta forma, a UVB é capaz de reagir diretamente com o DNA, formando adutos, denominados ciclobutanos de pirimidina e 6,4-pirimidina-pirimidona, que contribuem significativamente pelos efeitos citotóxicos, mutagênicos e cancerígenos da radiação UV de onda curta (UVC, UVB) (KIELBASSA, ROZA & EPE, 1997).

Mecanismos indiretos levam aos efeitos genotóxicos no DNA em função do comprimento de onda da UVA e luz visível, nos quais o DNA absorve apenas um pouco ou não. Ocorre fotosensibilização de compostos endógenos celulares, nos quais transformam energia luminosa em reatividade química com produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Nitrogênio (ERN). Este espectro induz modificações oxidativas no DNA tais como a formação de 8-OH-dG (KIELBASSA, ROZA & EPE, 1997).

Entretanto, estudos indicam que ambos os espectros UVA e UVB levam ao dano oxidativo (MASAKI, et al., 1995; HATTORI, et al., 1996; DELICONSTANTINOS et al., 1996; HECK, et al., 2003; SANDER, et al., 2003; PERES, et al., 2011; TERRA, et al., 2012a, TERRA, et al., 2012b; WILLIAMS, et al., 2014; AMBOTH, et al., 2015).

Heck e colaboradores (2003) demonstraram *in vitro* que o estímulo com UVB é capaz de induzir a liberação de espécies reativas em queratinócitos humanos e camundongos de maneira dose dependente. A inibição de glutathione

utilizando BSO nestas células intensificou a produção de ERO, ocasionando maior susceptibilidade ao dano oxidativo. Ao investigar o mecanismo pelo qual ocorre a fotosensibilização induzida por UVB e geração destas espécies, foi constatado que a molécula fotosensibilizadora correspondia a CAT. Os autores sugerem que o papel de catalase pode ser dependente do status redox dos queratinócitos, podendo atuar como antioxidante ou promover o estresse oxidativo e citotoxicidade. Estes resultados evidenciam o dano foto oxidativo induzido por UVB, o papel da glutatona no combate estresse foto oxidativo, bem como o caráter fotosensibilizador da catalase, além de sua propriedade antioxidante (HECK, *et al.*, 2003).

Além da produção de ERO, foi demonstrado que a UVA e UVB destroem a defesa antioxidante epidérmica, constituída pelas enzimas SOD, CAT e GPx, bem como GSH, α -tocoferol, ácido ascórbico e carotenóides aumentando a susceptibilidade da pele às ações deletérias do estresse oxidativo (PODDA, *et al.*, 1998; HALLIDAY, 2005).

Podda e colaboradores (1998) estudaram os efeitos da UVA e UVB sob parâmetros de estresse oxidativo em um modelo *in vitro* equivalente a pele humana. Baixas doses de UV foram suficientes para diminuir os níveis de antioxidantes lipofílicos (alfa tocoferol e ubiquinol/ubiquinona). A diminuição dos níveis de alfa tocoferol ocorreu de maneira dose dependente. Os antioxidantes hidrofílicos (urato e ácido ascórbico) sofreram diminuição com a irradiação, porém em doses maiores. O aumento dos marcadores de estresse oxidativo e proteínas carboniladas ocorreram em resposta às maiores. Estes resultados evidenciam a capacidade da radiação UV em alterar o status redox celular.

Existem mecanismos de reparo ao dano oxidativo (proteólise, *turn over* de membrana e lisossomos e DNA polimerase), porém os produtos finais destes eventos são mutagênicos e quando gerados em excesso acumulam-se no tecido (BECKMAN & AMS, 1998). Em longo prazo, o acúmulo do dano oxidativo nas células e matriz extracelular pode desencadear a formação de lesões pré-malignas e o desenvolvimento do CEC, uma vez que os produtos oxidativos estão associados à carcinogênese (ALAM & RATNER, 2001; SANDER, *et al.*, 2003; CHEN, HU & YANG, 2012).

De fato, estudos comprovam a presença de produtos oxidativos em amostras de CEC humano, assim como em amostras de pele fotoenvelhecidas (PERES *et al.*, 2011; SANDER, *et al.*, 2002; SANDER, *et al.*, 2003). Entretanto, não

existe uma padronização de marcadores decorrentes do dano oxidativo na pele, que poderiam ser empregadas como biomarcadores de diagnósticos ou prognóstico de CEC (MAMALIS, *et al.*, 2014).

Sander e colaboradores (2002), ao estudar fotoenvelhecimento em amostras de pele humana, evidenciaram por imunohistoquímica a diminuição da expressão das enzimas antioxidantes CAT e SOD, bem como aumento da oxidação de proteínas, indicando uma deficiência da defesa antioxidante por ação foto-oxidativa devido à exposição crônica à UV. Em um segundo trabalho, Sander e colaboradores (2003) demonstraram por imunohistoquímica que amostras de CEC humano apresenta altos níveis de MDA em comparação com a pele adjacente normal e controle de pele jovem.

Williams e colaboradores (2014) detectaram por microarray um aumento significativo de epítomos derivados de MDA em amostras de CEC humano, evidenciando a relação do estresse oxidativo no CPNM. Mamalis e colaboradores (2014) a fim de padronizar biomarcadores oxidativos na pele evidenciaram por imunohistoquímica o aumento da presença de 8-OH-dG e 4-HNE na epiderme de amostras que sofreram exposição crônica à UVB, em comparação à amostra de pele protegidas da UVB.

Em relação aos eventos sistêmicos decorrentes da exposição à UV, os dados na literatura são extremamente escassos, embora haja indícios da relação do estresse oxidativo e CPNM em nível sistêmico. Vural, Canbaz & Selçuki (1999) evidenciaram que pacientes com CBC e QA apresentam uma diminuição da defesa antioxidante sistêmica, representada por diminuição da glutathiona intraeritrocitária, tiol total, ascorbato, α -tocoferol e ceruloplasmina, sugerindo que no CEC ocorre diminuição da defesa antioxidante também a nível sistêmico. Freitas e colaboradores (2015) observaram uma diminuição da capacidade antioxidante total sistêmica de pacientes com CEC e CBC.

Considerando o papel das ERO e o estresse foto oxidativo na iniciação do CPNM, estudos evidenciam a importância da prevenção desta neoplasia e sugerem ação protetora à compostos com capacidade antioxidante, a quimioprevenção é caracterizada pela capacidade prevenir, suprimir ou reverter o processo de carcinogênese (SPORN, 1976; GENSLER, *et al.*, 1999; ATHAR & KOPELOVICH, 2011; YIN, *et al.*, 2013; AMBOTHY, PRASAD & BALLUPILAI, 2015;

CHEN, HU & YANG, 2012; KATTA & BROWN, 2015; REDDI, POWERS & DELLAVALE, 2014).

Apesar de tais estudos demonstrarem a ação preventiva de determinados compostos no câncer de pele, predominando aqueles de aplicação tópica, a incidência do CPNM prevalece alta e crescente. No entanto, os mesmos comprovam a hipótese das espécies reativas na carcinogênese de pele e a importância do sistema antioxidante na manutenção da homeostasia cutânea, porém o emprego dos compostos utilizados como objeto de estudo limita-se à fase experimental.

1.2 METFORMINA

A metformina (1,1-dimetilbiguanida) é um anti-hiperglicemiante oral, pertence à classe das biguanidas e corresponde ao medicamento de primeira escolha para o tratamento de diabetes mellitus tipo 2, havendo aproximadamente 120 milhões de pacientes sob tratamento com este fármaco por todo o mundo. Trata-se de um medicamento bem tolerado e não leva a hipoglicemia (VIOLLET, et al., 2012; CERZO, et al., 2015).

Estudos retrospectivos indicam que pacientes diabéticos sob uso de metformina apresentam menor incidência em diversos tipos de câncer, quando comparados aos pacientes diabéticos tratados com outro fármaco (EVANS, et al., 2005; DECENSI, et al., 2010). A partir destas evidências, a metformina tornou-se alvo de diversos estudos clínicos e experimentais que têm por objetivo evidenciar seu potencial antineoplásico, bem como elucidar os mecanismos pelos quais este medicamento atua interferindo no desenvolvimento das células tumorais, que por sua vez ainda não foram totalmente esclarecidos (WHEATON, et al., 2014; REDDI, POWERS & DELLAVALLE, 2014).

Apesar de ter sido evidenciado que pacientes diabéticos do tipo 2 apresentam o dobro da prevalência de melanoma e CPNM (Li, et al., 2013), não há dados epidemiológicos que relacionam o uso de metformina e câncer de pele. Porém, estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a ação antineoplásica da metformina em modelos de melanoma (TOMIC, et al. 2011; CERZO, et al., 2013) e CPNM (CHAUDARY, et al., 2012; WU, et al., 2013; CHECKLEY, et al., 2015), sugerindo ação preventiva da metformina no câncer de pele.

1.2.1 Mecanismo de Ação da Metformina

Estudos descrevem que a metformina entra nos hepatócitos através do transportador de cátions orgânicos 1 (OCT1) e atua especificamente no complexo I da cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, inibindo-a em até 40% (SHU, et al., 2007; EL-MIR, et al., 2000; OWEN, DORAN & HALESTRAP, 2000; BATANDIER, et al., 2006; VIOLLET, et al., 2012; WHEATON, et al., 2014).

A mitocôndria é responsável pela geração de ATP através da redução tetravalente do O_2 molecular à H_2O . Conforme ocorre a transferência de elétrons, estes podem “escapar” e se ligarem ao O_2 , gerando ERO (BRAND, 2010). Em suma, este processo consiste na transferência de prótons e elétrons das moléculas de NADH e $FADH_2$ para o O_2 por meio da cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, que por sua vez é constituída por complexos protéicos ligados fortemente a grupos prostéticos, designados centros redox, no qual ocorrem as reações de oxirredução. A cadeia é formada por quatro complexos: complexo I (NADH-coenzima Q oxidoredutase), complexo II (succinato-coenzima Q oxidoredutase), complexo III (coenzima Q-citocromo c oxidoredutase), complexo IV (citocromo c oxidase) (LEHNINGER, 2014), conforme ilustrado na figura 6.

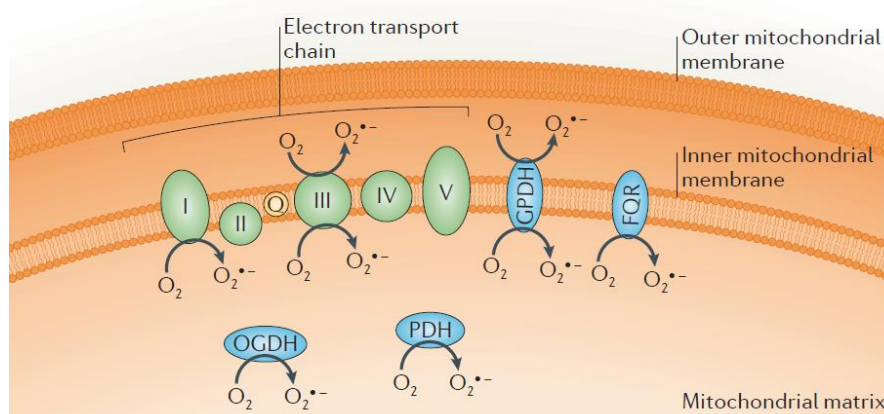


Figura 6 – Produção de ânion superóxido nos complexos I e III. A cadeia respiratória mitocondrial corresponde a uma das fontes endógenas de espécies reativas de oxigênio (ERO), no qual ocorre produção de ânion superóxido nos complexos I e III (HOLMSTRÖM & FINKEL, 2014).

Apesar de este processo ser conhecido há mais de 50 anos, a quantidade de ERO que é gerada e a função exata desta produção não são totalmente esclarecidas. Porém, sabe-se que a produção de O_2^{\bullet} ocorre em maiores quantidades no complexo I e no complexo III da matriz mitocondrial, sendo rapidamente degradado em H_2O_2 pela SOD. Em seguida, ocorre a degradação do H_2O_2 pela catalase em H_2O e O_2 (BRAND, 2010; WHEATON, et al., 2014).

Em relação à regulação deste processo, sugere-se que um aumento da força próton-motriz do potencial de membrana mitocondrial atrase o fluxo de elétrons ao longo da cadeia, aumentando assim a probabilidade de elétrons livres interagirem com o O_2 , aumentando a geração de O_2^{\bullet} . Por outro lado, a diminuição da força próton-motriz levaria a diminuição da produção de ERO (HOLMSTRÖM & FINKEL, 2014).

Sendo assim, a inibição parcial do complexo I da cadeia pela metformina leva a diminuição dos níveis de ATP e aumento dos níveis de monofosfato de adenosina (AMP). O desequilíbrio da relação ATP/AMP é um gatilho para ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), proteína conservada filogeneticamente que possui um papel crucial no status energético celular, ativada em condições de restrição de energia. Logo, a ação da metformina no complexo I levaria a um efeito pleiotrópico, devido à ativação indireta da AMPK. Uma vez fosforilada, a AMPK causa um shift celular, de um estado anabólico para um catabólico, inibindo vias sintéticas que requerem ATP e estimulando vias que geram ATP, a fim de restaurar os níveis de ATP celular (HARDIE, HAWLEY & SCOTT, 2006; VIOLLET, et al., 2012; POLLAK, 2012).

Portanto, os principais mecanismos anti hiperglicemiantes da metformina envolvendo a ativação da AMPK e que estão relacionados ao seu potencial antineoplásico correspondem a (HARDIE, HAWLEY & SCOTT, 2006; HARDIE, 2006; HARDIE, HAWLEY & SCOTT, 2006, POLLAK, 2012):

a) Aumento da captação de glicose, estimulando a translocação do receptor transportador de glicose 4 (GLUT4) para a superfície da membrana, nos tecidos adiposo, cardíaco e estriado esquelético;

b) Inibição da gliconeogênese, através da inibição do complexo 2 da mTOR (mTORC2), impedindo, dessa forma, a expressão de genes envolvidos na gliconeogênese hepática, com consequente diminuição da hiperinsulinemia;

c) Inibição da síntese protéica e proliferação celular, através da inibição da mTORC1.

Portanto, é proposto que, ao nível sistêmico, a metformina impede ou diminui a taxa de desenvolvimento das células tumorais por diminuir os níveis de glicose circulante, considerado substrato para as células neoplásicas, bem como por diminuição da hiperinsulinemia, uma vez que a insulina é mitógeno para certos tipos de tumores. Ao nível celular, este evento ocorre pela falta de capacidade das células em se adequarem à situação de estresse energético, como ocorre em células tumorais com perda de função de p53, e/ou inibição da mTOR. Ainda, os efeitos antineoplásicos da metformina estão relacionados diretamente com a adequação da dose no tecido alvo (POLLAK, 2012; WHEATON, et al., 2014).

O envolvimento do estresse oxidativo no mecanismo da metformina ainda é pouco conhecido, devido à complexidade bioquímica da sinalização redox, bem como a geração de ERO a partir da mitocôndria. Batandier e colaboradores (2006) demonstraram que, no fígado, a metformina prejudica a geração de ERO ocasionada pelo fluxo reverso de elétrons induzido na mitocôndria e que isto ocorre sem afetar o potencial de membrana e consumo de O₂. Kane e colaboradores (2010) verificaram que, no músculo estriado esquelético, a metformina diminui a emissão de H₂O₂ no complexo I.

Wheaton e colaboradores (2014), ao verificarem a inibição reversível do complexo I pela metformina, demonstraram que a mesma não eleva os níveis de ERO no complexo I, sugerindo que também ocorre inibição da geração de ERO no complexo III, devido ao impedimento do fluxo de elétrons.

Entretanto, Marinello e colaboradores (2015) verificaram que, *in vitro*, células de câncer de mama tratadas com metformina apresentam aumento dos níveis de malondialdeído, sugerindo particularidades na resposta de células tumorais tratadas com metformina no que diz respeito aos parâmetros de estresse oxidativo.

1.2.2 Metformina e Carcinoma Espinocelular

O envolvimento do estresse oxidativo no mecanismo de ação da metformina no CEC foi pouco abordado. Man'cheva e colaboradores (2011) demonstraram que o tratamento com metformina diminui a multiplicidade dos

tumores de pele induzido por benzopireno, acompanhado da diminuição de MDA na pele e no plasma.

Existem trabalhos que sugerem o potencial preventivo da metformina no CEC, abordando outros parâmetros. Chaudary e colaboradores (2012) estudaram o potencial antitumoral da metformina em um modelo de aloenxerto de CEC, utilizando células da linhagem A431 em camundongos nude. Neste modelo, a metformina foi capaz de diminuir o tamanho do tumor, acompanhado da diminuição da ativação de vias de sinalização relacionadas ao crescimento e proliferação celular, como NFkB, MAP kinases (ERK e p38) e também mTORC1. Ainda, foi observado diminuição de marcadores de proliferação celular como o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e ciclinas D1/B1 e aumento da apoptose, por aumento da proteína pró apoptótica Bax.

Wu e colaboradores (2013) observaram o efeito quimiopreventivo da metformina em um modelo de exposição crônica à UVB através da ativação da AMPK e inibição do desenvolvimento do tumor, associado a menor expressão do marcador de proliferação celular Ki67.

Checkley e colaboradores (2014) observaram a ação antineoplásica da metformina em um modelo de CEC induzido por TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) na pele de camundongo FVB/N. A metformina preveniu o desenvolvimento do CEC e diminuiu o tamanho de papilomas e carcinomas. Além disso, foi verificado que a metformina ativou a AMPK e atenuou a sinalização da mTORC1.

Lin e colaboradores (2013) verificaram que o tratamento com dasatinib em um modelo de aloenxerto de CEC tem maior eficácia quando administrado em conjunto com metformina, evidenciando o potencial antineoplásico da metformina como adjuvante de quimioterapia de CEC.

Contudo, não há dados em relação ao efeito da metformina sob o status redox em um modelo de CEC induzido por UVB. Considerando, a relação estabelecida entre o estresse oxidativo e o CPNM, bem como o potencial preventivo da metformina no CEC, é relevante estudar os mecanismos pelos quais a metformina atua na regulação do estresse oxidativo no CEC. Além disso, a escassez de trabalhos em relação aos marcadores sistêmicos no CPNM é alarmante, dada sua alta prevalência e impacto social.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho consiste em avaliar o potencial preventivo da metformina sob um modelo de desenvolvimento de CEC de pele experimental induzido por UVB e verificar o comportamento dos parâmetros de estresse oxidativo, a nível local (pele) e sistêmico (sangue).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Primeiro Artigo

- a) Verificar a presença de produtos oxidativos no tecido tumoral, como 4-HNE e 3-NT;
- b) Caracterizar o perfil oxidativo cutâneo no tecido adjacente ao tumor em camundongos que desenvolveram CEC induzido por UVB;
- c) Caracterizar o perfil oxidativo sistêmico em camundongos que desenvolveram CEC induzido por UVB;
- d) Investigar mecanismos pelos quais o estado redox pode atuar na fisiopatologia do CEC;
- e) Investigar a relação entre o estado redox cutâneo e o estado redox sistêmico em camundongos que desenvolveram CEC induzido por UVB;
- f) Investigar biomarcadores cutâneos e sistêmicos de EO em camundongos com CEC induzido por UVB;

2.2.2 Segundo Artigo

- a) Avaliar o efeito da metformina sobre o desenvolvimento de lesões cutâneas neoplásicas (QA e CEC) na pele de camundongos *hairless* HRS/J irradiados cronicamente com UVB;
- b) Relacionar a ação da metformina com estado redox da pele e das lesões cutâneas em camundongos com CEC induzido por UVB;

- c) Relacionar a ação da metformina com estado redox sistêmico em camundongos com CEC induzido por UVB;
- d) Verificar o efeito da metformina sob a presença de produtos oxidativos no tecido tumoral, bem como sob a proteína p53.

3 HIPÓTESE

3.1 HIPÓTESE 1

Camundongos *hairless* HRS/J irradiados cronicamente com radiação UVB (dose cumulativa = 17,1 J/cm²) desenvolvem carcinoma espinocelular de pele (CEC) em função do desbalanço redox epidérmico induzido por UVB.

3.2 HIPÓTESE 2

Camundongos *hairless* HRS/J com carcinoma espinocelular de pele induzido por UVB apresentam desbalanço redox a nível sistêmico.

3.3 HIPÓTESE 3

O tratamento sistêmico com metformina (dose = 90 mg/kg) previne e reduz a progressão do carcinoma espinocelular de pele induzido por UVB na pele de camundongos *hairless* HRS/J, através da alteração dos marcadores de estresse oxidativo.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

O presente trabalho originou dois artigos científicos que serão submetidos a revista *Photochemistry & Photobiology B: Biology*

LOOKING BEYOND THE SKIN: CUTANEOUS AND SYSTEMIC OXIDATIVE
STRESS IN UVB-INDUCED SQUAMOUS SKIN CELL CARCINOMA

Iriana Moratto Carrara^{1,2}, Gabriella Pasqual Melo^{1,2}, Sara Santos Bernardes^{1,3},
Fernando Souza-Neto^{1,2}, Leandra Naira Zambelli Ramalho⁴, Poliana Camila
Marinello¹, Rodrigo Cabral Luiz¹, Rubens Cecchini², Alessandra Lourenço Cecchini¹

1 Laboratory of Molecular Pathology, Londrina State University (UEL), Londrina,
Paraná, Brazil.

2 Laboratory of Pathophysiology and Free Radicals, Londrina State University (UEL),
Londrina, Paraná, Brazil.

3 Laboratory of Healthy Sciences Research, Federal University of Grande Dourados
(UFGD), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil.

4 Department of Pathology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo
(USP).

Corresponding author: Alessandra L. Cecchini.

E-mail: alcecchini@uel.br

Phone: +55 (43) 3371 45 29

Fax: +55 (43) 3371 42 67.

Conflicts of interest: The authors declare there are no conflicts of interest.

Acknowledgements: The authors are grateful to J.A. Vargas and P. S. R. D. Filho for
their excellent technical assistance.

Abstract

Non-melanoma skin cancers (NMSC) correspond to malignant tumors arising from epidermis and are extremely incident worldwide and it is divided in two main types: basal cell carcinoma (BCC) and squamous skin cell carcinoma (SCC). Incidence of SCC and its precursor lesions increase proportionally to cumulative solar exposure and it is intimately related to photo oxidative stress. UV exposure generates reactive species through photosensibilization and impairment of antioxidante defence. Long-term effect, these deleterious oxidation reactions lead to oxidative modifications in biomolecules and may trigger SCC. However, there is a lack of data about systemic redox status in SCC. Considering oxidative stress plays a crucial role in initiation of skin cancer, how does systemic redox status behave towards local tumor development? Here we provide for the first time a systemic redox profile in a UVB-induced SCC animal model. Through a detailed histopathological analyze, we verified the deveopment of actinic keratosis and SCC in animals chronic exposed to UVB Irradiation (cumulative dose = 17.1 J/cm²). After that, SCC-containing tissue was submitted to 4-HNE and 3-NT immunostaining which showed elevated presence of these oxidative products. This was accompanied by a depletion of skin antioxidant defence represented by catalase activity, GSH and TRAP levels. GSH was oxidized reflecting in high GSSG levels and elevated oxidative stress index. Although oxidative parameters carbonyl proteins and AOPP did not show significative alterations, high levels of MDA was deteced by TBARS was observed. In bloodstream, these animals also presented oxidative stress indicated by lower GSH:GSSG ratio and diminished plasma TRAP. Plasma AOPP levels were elevated, suggesting that UVB-induced cutaneous lesions triggers an inflammatory response at a systemic level. A maintenance of erythrocyte catalase activity and plasma total thiol was observed, acompanned by lower levels of plasma MDA, evidencating a modulation of systemic status redox. Taking together, our results indicate that a pro-oxidative feature developed by a site injury may reflect systemically.

Keywords: Non melanoma skin cancer; Squamous skin cell carcinoma; Photo oxidative stress; UVB; Systemic redox status

Introduction

Non-melanoma skin cancers (NMSC) correspond to malignant tumors arising from epidermis and are extremely incident worldwide. It is divided in two main types: basal cell carcinoma (BCC) and squamous skin cell carcinoma (SCC) (KOYUNCER, 2014). SCC is strongly associated with cumulative solar exposure and skin photo oxidative damage (SANDER, et al 2012a; WILLIAMS, et al 2014). The same is applied to actinic keratosis (AK) – a cutaneous lesion which heralds an increased risk for SCC arising (DOODS, CHIA & SCHUMAK, 2014). Although it has low rates of mortality, the patient suffers from serious psychological consequences depending on the magnitude of the tumor, prior to and after surgical removal, which may lead to disfiguring lesion in both situations (BATH-HEXTALL, et al., 2013). SCC has a high index of recurrence, represented by 30% to 50% increased risk of another primary SCC within 5 years after treatment of the first SCC (SCHMULTS, et al., 2012; BROUGHAM, et al., 2012; KAUVAR et al., 2015). In advanced and metastatic cases, treatment options becomes a challenge once SCC affects elderly population, in which adverse effects may be lethal (PALYCA, KOSHENKOV & MEHNERT, 2014; SEBER, et al 2016).

It has been shown *in vitro* and *in vivo* that both UVA and UVB spectra lead to ROS production, impaired antioxidant defence and thus oxidative damage (MASAKI, et al., 1995; HATTORI, et al., 1996; DELICONSTANTINOS et al., 1996; HECK, et al., 2003; SANDER, et al., 2003; PERES, et al., 2011; TERRA, et al., 2012a, TERRA, et al., 2012b; WILLIAMS, et al., 2014; AMBOTHI, et al., 2015). Photo oxidative stress leads to post-translational oxidative modifications in biomolecules (eg. lipid peroxidation, protein carbonylation, DNA oxidative lesions) (SANDER, et al., 2004; VALKO, et al., 2007) and impairment of physiological redox signaling (eg. H₂O₂ signaling) (SZATROSWKI & NATHAN, 1991; SEN & PARKER, 1996; HOLMSTROM & FINKEL, 2014; LENNICKE, et al., 2015). Accumulation of oxidized products and redox imbalance triggers SCC and it persists in tumor site and adjacent skin during active disease (SANDER et al., 2002; WILLIAMS, et al 2014).

However, blood oxidative profile in SCC remains to be determined. Observations that patients with AK and basal cell carcinoma (BCC) have systemic oxidative stress (VURAL, et al., 1999; CHAISIRIWONG et al., 2016) served as the basis for our hypothesis because it suggests that a systemic redox imbalance may also occur in SCC. Therefore, we sought to determine how does systemic redox

status behave towards local tumor development in UVB-induced SCC in hairless mice experimental model.

Materials and Methods

Reagents

All the chemicals were obtained from Merck or Sigma Aldrich Laboratories.

Animals

Female 20-week-old hairless mice HRS/J were obtained from University of São Paulo (USP), weighing 20 –25 g, with access to water and food ad libitum. They were treated in accordance with the National Institutional of Health guidelines for the welfare of experimental animals and with the approval of the Research Ethics Committee (n° 6738.2015.40) of the State University of Londrina, Paraná State, Brazil.

Groups

To study the oxidative profile in UVB-induced SCC, animals were first divided into a control non-irradiated group (n=8) and an irradiated group (n=15). After the experimental period, animals that developed SCC were named SCC group (n=7) and samples from those and control group were selected to perform immunohistochemistry analysis and redox status of blood and skin. Samples from animals of irradiated group that did not developed SCC were used to skin redox status evaluation and correlation analyze.

UVB irradiation protocol

To simulate a chronic exposure to solar radiation and induce SCC, animals from irradiated group were exposed to 0.228 J/cm² of UV during 16 minutes, five days a week, for 15 weeks (cumulative dose = 17.1 J/cm²) (CHAQUOR, et al., 1995). Irradiation dose was determined using the formula: Irradiance (I) = Dose (D) / Time (T), considering average lamp irradiance = 2.3718.10⁻⁴ W/cm². The light source was a light source a PHILIPSTL/12 40W UVB fluorescent lamp, which emits irradiation from 270 to 400 nm with maximum peak around 313 nm. The lamp was embedded in a 1.30 m x 0.43 m x 0.45 m box, where the animals were placed in cages. UVB

output was measured using a Research Radiometer model IL-1700 (International Light, USA; calibrated by IL service staff) with a radiometer sensor for UV (SED005) and UVB (SED240), which detected that UVB was 73% of the total UV irradiation in the present experimental conditions. The caged mice were placed 15 cm beneath the lamp and contained screens, which allowed the free movement of mice, but ensured that the beam irradiation was directed to their back.

Sample collection

24 hours after the end of experimental period, heparinized blood was collected by cardiac puncture and centrifuged at 1100 G to obtain plasma and erythrocytes. Plasma were stored at -20°C and erythrocytes were washed three times with NaCl 0,09% and maintained at 8°C in Alsever's solution for systemic oxidative stress analysis. Animals were sacrificed and one square centimeter of each dorsal skin cutaneous lesion was removed from irradiated animal for subsequent histopathological and immunohistochemistry analysis. Lesion-free dorsal skin samples (Figure 1) were removed and stored at -80°C for local oxidative stress analysis. The same procedure was performed with control group.

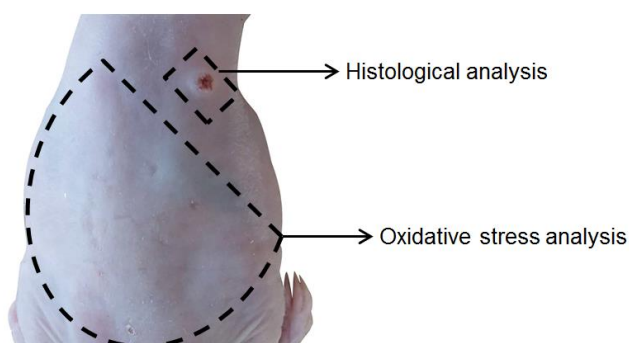


Figure 1. Representative image of samples collection and processing. Animals were exposed to $0,228 \text{ J/cm}^2$ of UVB for 16 minutes, five days a week, for 15 weeks (cumulative dose = 17.1 J/cm^2). Blood was collected and animals were sacrificed. One square centimeter of each dorsal skin cutaneous lesion was removed from irradiated animal with two millimeters of adjacency for subsequent histopathological and immunohistochemistry analysis. Lesion-free dorsal skin samples were removed and stored at -80°C for local oxidative stress analysis. The same procedure was performed with control group.

Histopathological analysis

For SCC assessment, we performed a histopathological analysis of UVB-induced skin lesions. Cutaneous lesions of each irradiated animal was fixed in formalin in 10% neutral buffered-formalin, stored in 70% ethanol and embedded in paraffin prior to sectioning. Sections of 5 μm were cut and stained with Hematoxylin & Eosin (H&E). Histopathological evaluation system of each slide was based on the diagnosis of AK and SCC (MCGUIRE, 2009; KOYUNCER, 2014; KRAFT & GRANTER, 2014; DODDS, CHIA & SCHUMAK 2014).

Immunohistochemistry analysis

Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections were cut to a thickness of 5 μm and stained with hematoxylin and eosin for histological examination. Further skin preparations were also submitted for immunohistochemical analysis. Briefly, 4- μm -thick sections mounted on poly-L-lysine-coated slides were deparaffinized, rehydrated, immersed in 10 mmol/L citrate buffer (pH 6.0) and subjected to heat-induced epitope retrieval using a vapor lock for 45 min. Slides were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and immersed in 3% hydrogen peroxide for 20 min to block endogenous peroxidases. Non-specific protein binding was blocked with normal serum (Vectastain Elite ABC Kit, Universal, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) for 30 min. Sections were then incubated with a monoclonal primary antibody specific for monoclonal anti-4-hydroxynonenal (4-HNE) adduct antibody (A.G. Scientific Inc., CA, USA, diluted 1:100) and 3-Nitrotyrosine (3-NT) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, diluted 1:100) for 2h at room temperature (25°C) in a humid chamber. Following washes in PBS, a biotinylated pan-specific universal secondary antibody (Vectastain Elite ABC Kit, Universal) was applied for 30 min. Next, slides were incubated with avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain Elite ABC Kit, Universal) for 30 min and developed using NovaRed kit (Vector Laboratories Inc.) for 5 min. Slides were counterstained with Harris's hematoxylin, dehydrated and mounted with Permount (Biomedica Co., Foster City, CA, USA). For negative controls, all specimens were incubated with an isotope-matched control antibody under identical conditions. Analysis was performed on 5 randomly chosen High Power Field (HPF) (x400 magnification). Immunoreactivity to 4-HNE and 3-NT was evaluated as the percentage of positive labeling/HPF using Image J software (Image J, 1.33u, NIH, USA).

Sample preparation

Tissue homogenate

Irradiated dorsal lesion-free skin from mice were defrosted and homogenized using Ultra Turrax homogenizer containing 10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, or 50 mg/mL of tissue in buffer and centrifuged. The 50 mg/mL supernatant was used for carbonyl protein, catalase activity and glutathione assays, while the 30 mg/mL supernatant was used for the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, 20 mg/mL to determine the total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) and 10 mg/mL to advanced oxidation protein products (AOPP) levels.

Erythrocyte and plasma dilution

Erythrocytes were maintained at 8° in Alsever's solution and assays were performed less than two weeks to ensure viability of compounds. Before use, erythrocytes were washed again and diluted in deionized water. For GSH quantification and catalase activity a dilution ratio 1:100 and 1:80 was used, respectively. Plasma samples were defrosted and dilutions were prepared as follows: TRAP (1:90), AOPP (1:5), total thiol (1:10), malondialdehyde (MDA) (1:2).

Oxidative Stress Assays

Carbonyl protein content

Carbonyl protein in supernatant skin homogenate was determined according to the method of Reznick and Parker (1994), modified by Bernardes, et al. (2014). The concentration of carbonyls was calculated by the equation: $C = \text{Abs (355–390 nm)} \times 45.45 \text{ nmol/mL}$, where C is the concentration of DNPH/mL, and 45.45 is its absorption coefficient.

Thiobarbituric Acid-Reactive Substances Assay

TBARS levels in supernatant skin homogenate was determined as described by Oliveira and Cecchini (2000). MDA formed during lipid peroxidation reacts in the TBARS assay to generate a colored product (TBA)₂-MDA adduct. The organic phase was read at 535 and 572 nm in a spectrophotometer (Shimadzu UV-1650PC) and concentrations were obtained from the difference between these absorbances considering the molar extinction coefficient of MDA at 535 nm. The results are expressed in nM/mg protein.

Plasma Malondialdehyde

Plasma MDA was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC), as described by Victorino et al. (2012). Readings were obtained at 535 nm over 11 min at a flow rate of 0.8 mL/min at 35°C. The results were expressed as nM/mg protein of MDA.

Advanced protein oxidation products

Advanced protein oxidation products (AOPP) in supernatant skin homogenate or plasma were measured as described by Descamps-Latscha, et al. (2004). AOPP levels in plasma were calculated using a chloramine-T calibration curve. The results were expressed in $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ protein.

Glutathione Levels

GSH and total glutathione (GT) levels in supernatant skin homogenate or erythrocyte were determined according to the method described by Tietze (1969) adapted by Locatelli et al. (2009) and measured using a Multiskan GO® microplate reader. By quantifying GT and GSH levels it is possible to calculate GSSG and oxidative stress index (OSI), taking into account the stoichiometry of the reaction, when two GSH are required to form a GSSG. Therefore, GSSG and OSI levels were determined, respectively, by the equations: $\text{GSSG} = (\text{GT} - \text{GSH}/2)$; $\text{OSI} (\%) = (\text{GSSG}/\text{GSH}) \times 100$. The results were expressed in $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein.

Catalase Activity

Catalase activity in supernatant skin homogenate or erythrocyte was determined according to Aebi (1984). The decrease absorbance of a hydrogen peroxide (H_2O_2) was monitored with a UV-1650 PC® UV-visible spectrophotometer (Shimadzu) at 240 nm. The results were expressed in absorbance/minute/mg protein. The decomposition of H_2O_2 is directly related to the decrease in absorbance and reflects catalase activity.

Total Thiol

Plasma total thiols were measured by the method of Hu (1994) at 412 nm in a microplate reader. Total thiol groups were calculated using a calibration curve

prepared with GSH (Sigma Aldrich®, Saint Louis, MO, USA). The results were expressed as μM of thiol.

Total Radical-trapping Antioxidant Parameter

TRAP levels in supernatant skin homogenate or plasma were measured as described by Reppeto et al. (1996) modified by de Souza Neto et al (2017). Chemiluminescence curves were obtained in a GloMax® luminometer. The results were expressed as μM trolox.

Total protein concentration

Total protein concentration in supernatant skin homogenate or plasma was determined by the method of Lowry et al. (1951) modified by Miller (1959). Both methods used bovine serum albumin (BSA) as standard.

Statistical Analysis

The obtained values are presented as Mean \pm Standard Errors of Mean (SEM). Differences in statistical significance were analyzed by using Student's unpaired T test. Correlation test was performed using Spearman's correlation. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. All the statistical analyses were performed using Graphpad Prism®, version 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Results

Histological analysis: H&E staining and immunohistochemistry

Figure 2 shows the histopathological analysis by H&E staining to verify SCC development in mice submitted to chronic UVB exposure. Skin from control group is represented in Figure 2A. From 15 animals exposed to chronic UVB irradiation in the conditions described above, 8 animals developed AK (Figure 2B) and 7 animals SCC (Figure 2C).

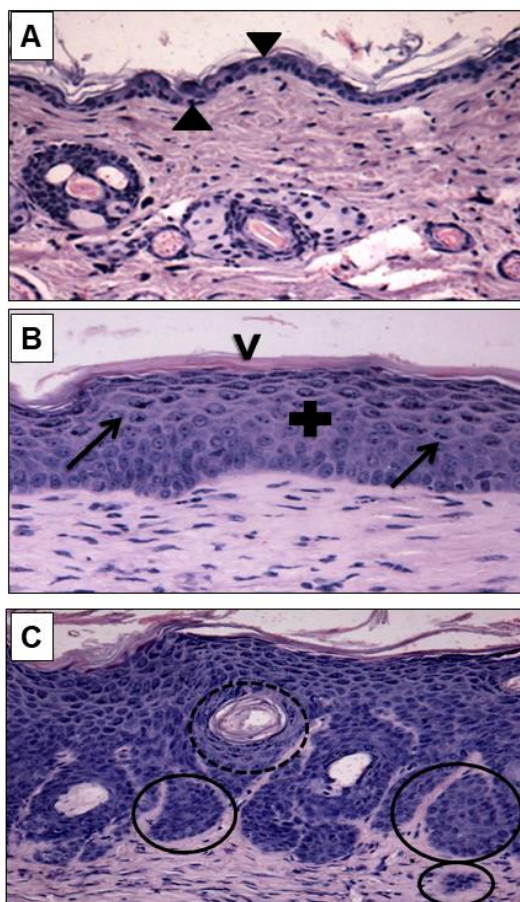


Figure 2. Histopathological evaluation of actinic keratosis and squamous skin cell carcinoma. Histopathological score evaluation system of each slide was based on the diagnosis of AK and SCC. (A) Control, shows epidermis (triangle) composed of a thin layer and dermis (upsidown triangle); (B) AK showing hyperkeratosis (v), hyperproliferation of epidermal layer (cross) with keratinocytes showing nuclear abnormalities (arrows); (C) SCC shows nests of dysplastic squamous cells (circles) reaching the dermis with presence of keratocysts (dotted circle). B and C represents two different animals from irradiated group. Animals were exposed to $0,228 \text{ J/cm}^2$ of UVB for 16 minutes, five days a week, for 15 weeks (cumulative dose = 17.1 J/cm^2). H&E staining, 200x.

Once verified SCC development, we performed an immunohistochemical analysis of cutaneous lesions from SCC group in order to verify *in situ* participation of reactive oxygen species. Immunostaining of these samples showed elevated presence of 3-NT and 4-HNE compared to the control group (4-HNE = Control: $2.750 \pm 0.4787\%$, SCC $22.75 \pm 0.8539\%$, $p < 0.0001$; 3-NT = Control: $4.750 \pm 0.4787\%$; SCC: $22.25 \pm 0.8539\%$, $p < 0.0001$) (Figure 3).

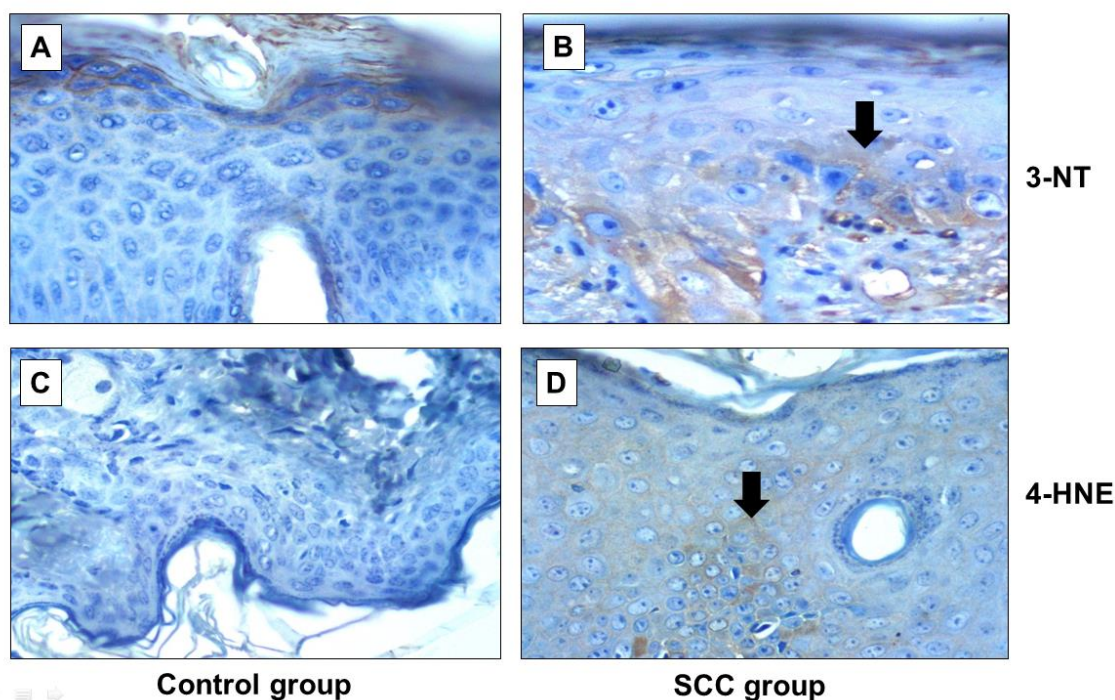


Figure 3. 4-HNE and 3-NT labeling in tumor tissue. Skin photomicrographs of control group (A, C) and SCC group (B, D). (A) Control group presents discrete marking by 3-NT, (C) No marking of 4-HNE can be observed in control group. SCC group shows increased expression of 3-NT and (B) 4-HNE (D) in epidermal areas (full arrow). Immunohistochemistry, 400x.

Adjacent skin of cutaneous lesions redox status

Skin antioxidant defence and oxidative products in control and SCC group was evaluated. Decreased catalase activity was observed in SCC group, compared to control group (Control: 1.493 ± 0.2201 Abs/min, SCC: 0.3880 ± 0.07453 Abs/min, $p=0.0022$) (Figure 4A). GSH levels was lower in SCC, compared to control group, but not statistically significant (Control: 0.8892 ± 0.03274 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein; SCC: 0.7989 ± 0.01234 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein, $p=0.0501$) (Figure 4B) and GSSG was higher in SCC group, compared to control group (Control: 0.4364 ± 0.04677 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein; SCC: 0.7359 ± 0.03051 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein, $p=0.0007$) (Figure 4C), reflecting in elevated oxidative stress index (Control: $50.62\% \pm 8.944$; SCC: $92.06\% \pm 3.247$, $p=0.0024$) (Figure 4D). TRAP also decreased in SCC group (0.5820 ± 0.1352 μM Trolox) in comparison to control group (1.053 ± 0.1325 μM Trolox, $p=0.0444$) (Figure 4E). Lipid peroxidation product MDA was elevated in SCC group, compared to control group (Control: 1.795 ± 0.1284 nM/mg protein; SCC: 5.643 ± 1.345 nM/mg protein) (Figure 4F). Protein

oxidation parameter carbonyl protein (CP) showed no significant alteration between groups (Control: 12.71 ± 0.4452 nM carbonyl/mg protein; SCC: 11.74 ± 0.2078 nM carbonyl/mg protein, $p=0.0994$) (Figure 4G), neither (AOPP), another protein oxidation parameter (Control: 0.2190 ± 0.01958 μ M AOPP/mg protein; SCC: 0.2195 ± 0.004747 μ M AOPP/mg protein, $p= 0.9839$) (Figure 4H).

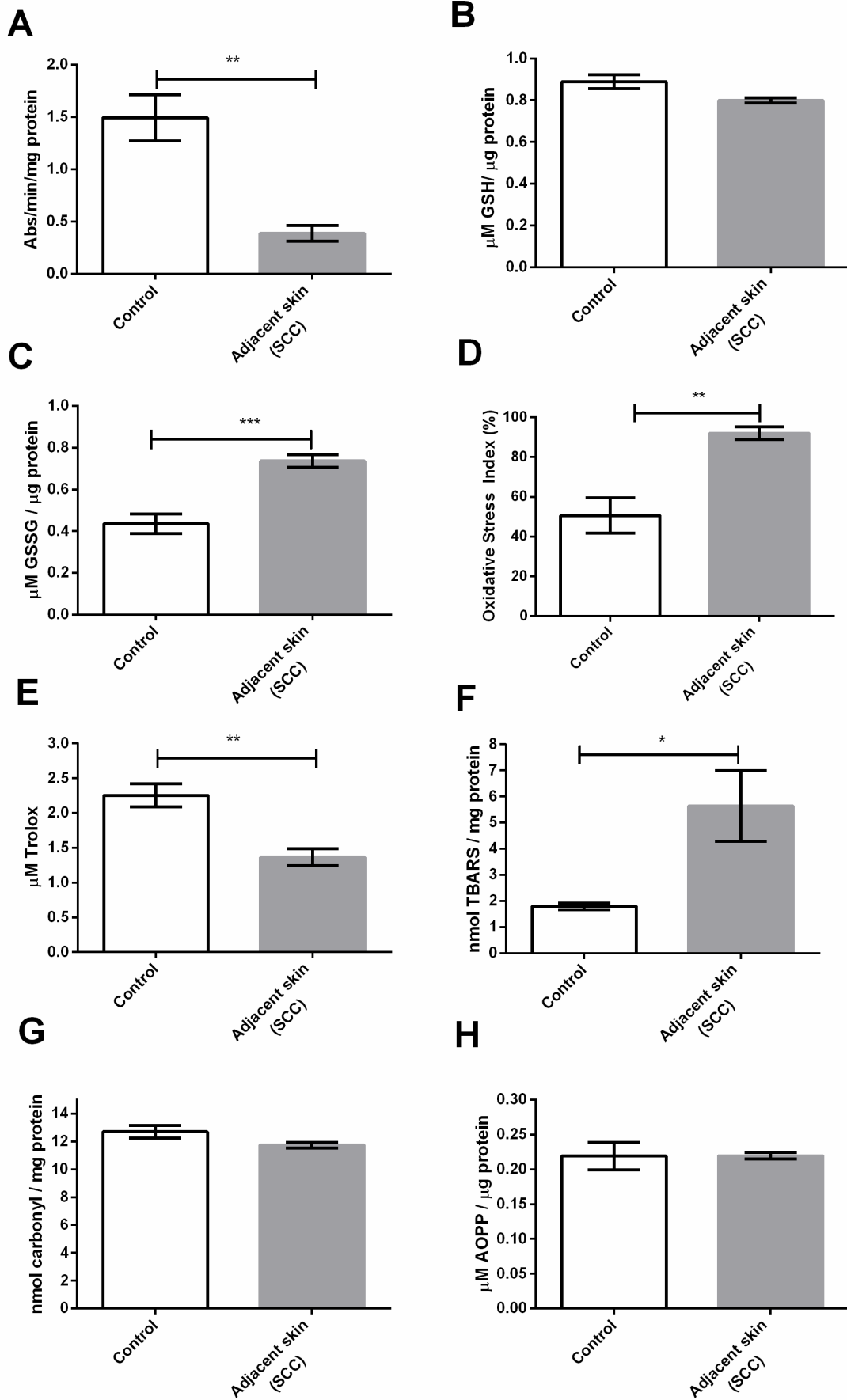


Figure 4. Skin redox status from SCC group. These data was obtained from an homogenate of the adjacent skin of cutaneous SCC. (A) Catalase activity, (B) GSH levels, (C) GSSG levels, (D) Oxidative Stress Index, (E) TRAP levels, (F) TBARS levels, (G) Carbonyl protein content, (H) AOPP levels. Animals were exposed to 0.228 J/cm² of UVB for 16 minutes, five days a week, for 15 weeks (cumulative dose = 17.1 J/cm²). *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0001 significantly different from Control group. Differences in statistical significance were analyzed using Student's unpaired T test.

Animals that did not developed SCC, but AK instead, were submitted to TBARS, catalase and GSH analyzes. The results are show in Table 1. We performed a correlation analyze between TBARS and catalase, TBARS and GSH among premalignant lesion (AK) and SCC. TBARS was inverselly correlated with catalase activity in Spearman's test (Figure 5A, Table 1), but not stastically significative between TBARS and GSH levels (Figure 5B, Table 1).

Table 1. TBARS, catalase and GSH levels in adjacent skin of cutaneous lesions in AK group

	Control	Adjacent skin (AK)
TBARS (nM/mg protein)	1.795 ± 0.1284	3.885 ± 0.6708
Catalase (Abs/min/mg protein)	1.493 ± 0.2201	0.8292 ± 0.1357*
GSH (µM/mg protein)	0.8892 ± 0.03274	0.7608 ± 0.03414*

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; GSH: glutathione reduced. *p<0.05 compared to Control group.

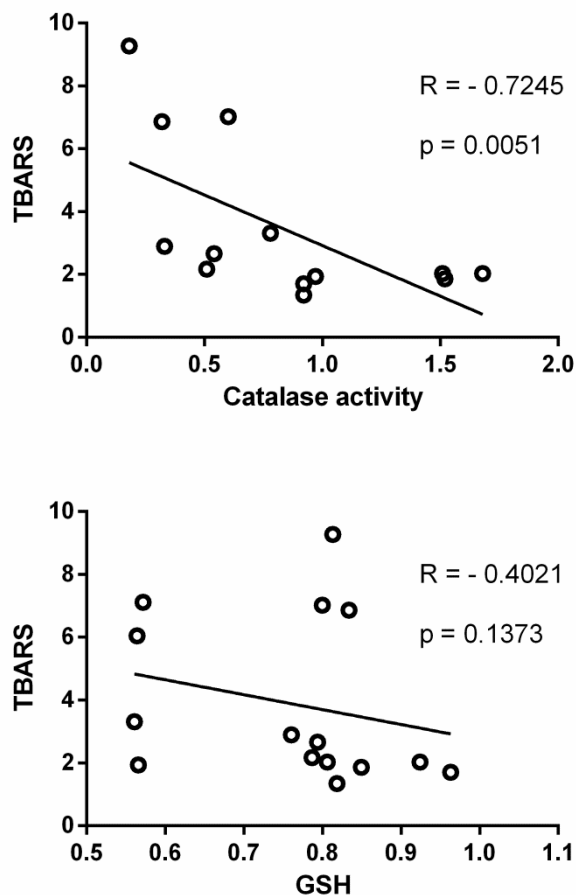


Figure 5. Correlation between TBARS levels and antioxidant defence from irradiated group. These data was obtained from the skin homogenate of mice from irradiated group and provide local characterization of UVB-chronic irradiated skin in AK and SCC lesions. (A) Correlation between TBARS levels and catalase activity, (B) Correlation between TBARS and GSH levels. Animals were exposed to 0.228 J/cm^2 of UVB for 16 minutes, five days a week, for 15 weeks (cumulative dose = 17.1 J/cm^2).

Systemic redox status

Systemic evaluation was performed measuring antioxidant and oxidative parameters in plasma and red blood cells from control and SCC group. Erythrocyte catalase was lower in SCC group, but not statistically significant, compared to control group (Control: $701.7 \pm 74.97 \text{ Abs/min}$; SCC: $571.8 \pm 76.77 \text{ Abs/min}$, $p=0.2607$) (Figure 6A). Erythrocyte GSH showed decreased levels in SCC group, compared to control group (Control: $2.389 \pm 0.1740 \text{ } \mu\text{M/mg protein}$; SCC: $1.149 \text{ } \mu\text{M/mg protein} \pm 0.01740$, $p<0.0001$) (Figure 6B) and increased levels of GSSG (Control: $1.345 \pm 0.01533 \text{ } \mu\text{M/mg protein}$; SCC: $2.232 \pm 0.1194 \text{ } \mu\text{M/mg protein}$, $p<0.0001$) (Figure 6C).

Elevated oxidative stress index was observed in the SCC group compared to the control group (Control: $57.65 \pm 3.754\%$; SCC: $194.2 \pm 9.347\%$, $p < 0.0001$) (Figure 6D). Significant decrease in plasma TRAP was observed in SCC group, compared to control group (Control: $1.053 \pm 0.1325 \mu\text{M Trolox}$; SCC: $0.5820 \pm 0.1352 \mu\text{M Trolox}$, $p = 0.044$) (Figure 6E). No significant alteration was observed in plasma total thiol levels in SCC group ($21.60 \pm 0.6355 \mu\text{M Thiol}$) compared to the control group ($21.51 \pm 2.849 \mu\text{M Thiol}$, $p = 0.9751$) (Figure 6F). Plasma MDA from SCC group presented a significant decreased ($165100 \pm 15460 \text{ nM/mg protein}$), compared to control group ($246400 \pm 19040 \text{ nM/mg protein}$, $p < 0.05$) (Figure 6G). Significantly higher levels of plasma AOPP were observed in SCC group, compared to the control group (Control: $0.4761 \pm 0.03706 \mu\text{M/mg protein}$; SCC: $0.6914 \pm 0.07907 \mu\text{M/mg protein}$) (Figure 6H).

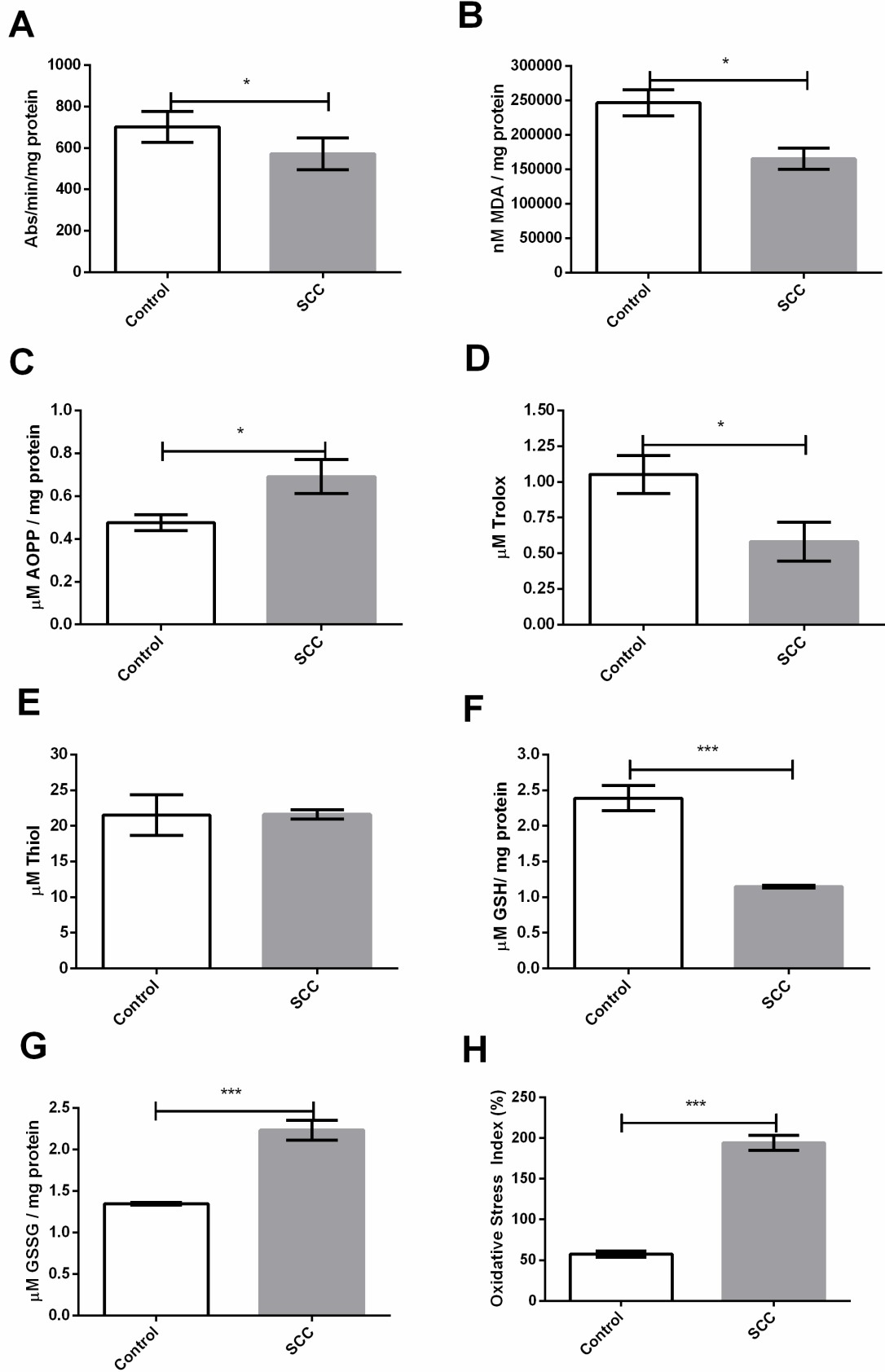


Figure 6. Systemic redox status from SCC group. These data was obtained from plasma or red blood cell of mice diagnosed with SCC and provide systemic characterization of oxidative profile in animals who developed SCC. (A) Erythrocyte catalase activity, (B) Erythrocyte GSH levels, (C) Erythrocyte GSSG levels, (D) Oxidative Stress Index, (E) Plasma TRAP levels, (F) Plasma total thiol levels, (G) Plasma AOPP levels, (H) Plasma MDA levels. Animals were exposed to 0.228 J/cm² of UVB for 16 minutes, five days a week, for 15 weeks (cumulative dose = 17.1 J/cm²). *p<0.05, ***p<0.0001 significantly different from Control group. Differences in statistical significance were analyzed using Student's unpaired T test.

Discussion

Tissue and blood oxidative stress profile has been a subject of study in cancer, providing valuable data about the mechanisms involved in the disease and characteristics of patient's prognosis (NAVARRO, et al., 1998; VURAL, et al., 1999; AYDIN, et al., 2006; PANIS, et al., 2011; PISKOUNOVA et al., 2015; BERNARDES et al., 2015a, BERNARDES et al., 2015b; QUINTANILHA, et al., 2017). Considering the void regarding redox status at systemic level in SCC, we performed a cutaneous and systemic oxidative profile in a UVB-induced SCC experimental model in order to investigate events that may occur in the blood in consequence of tumor development.

Investigating redox status in SCC becomes more relevant when we take into account two sources of oxidative stress in this disease. The first one is induced by chronic UV exposure, which occurs in a constant manner (low doses of radiation, but constantly - characterizing a chronic oxidative stress), critical in initiating the disease. The second one is present in tumoral microenvironment, from epidermal malignant cells and inflammation. At a certain point in the pathophysiology of SCC, these two sources of oxidative stress may add up and act together in tumor promotion and progression, which may reflect systemically (SANDER, et al., 2004; HALLIWELL, 2007).

This reasoning can be applied in the decreased catalase activity observed in SCC group, which could be explained by: (1) exposure to UVB induces H₂O₂ production by keratinocytes leading to catalase consumption (MASAKI, et al., 1995), (2) UVB may direct destroy skin catalase (PODDA, et al., 1997; TERRA, et al., 2012a) or (3) malignant keratinocytes may produce large amounts of H₂O₂, leading to

catalase consumption (LENNICKE, et al., 2015), or a sum of these three events. Therefore, this impairment in catalase activity may lead to a flood of H_2O_2 which may react with iron to form hydroxyl radicals ($\cdot OH$), by Fenton's reaction (VALKO, et al., 2007). This is aggravated when skin cells are exposed to UV radiation, which leads to release of iron from ferritin and another iron-containing molecules (BRENNEISEN, et al., 1998). Radical hydroxyl is the most effective trigger of lipid peroxidation and oxidative DNA damage (ŁUCZAJ, GĘGOTEK & SKRZYDLEWSKA, 2017). Corroborating with this, high levels of MDA – an aldehyde formed in consequence of late lipid peroxidation indirectly quantified by TBARS technique – was detected in adjacent skin of cutaneous lesions. GSH does not react directly with peroxides, but it is used as substrate for glutathione peroxidase (GPx) (DICKINSON & FORMAN, 2002). Thus, catalase decrease impairs H_2O_2 scavenging by GPx and may contribute to GSSG accumulation in favor of GPx action, observed in SCC group. Besides catalase, low molecular weight antioxidants (LWMA) were also consumed, quantified by TRAP technique. LWMA are radical scavengers and metal chelators, thus, UV-induced oxidative stress, especially lipid peroxidation of cellular membrane, can lead to their consumption in skin (ABUJA & ALBERTINI, 2001; KOHEN & GAITI, 2000; TERRA, et al., 2012a; TERRA et al., 2012b). Therefore, even without lesion, adjacent epidermis shows photo oxidative damage, evidencing the free radical hypothesis in skin photocarcinogenesis and representing the UV-indirect mechanisms of DNA oxidation and carcinogenesis (KIELBASSA, ROZA & EPE, 1997; HALLIWELL, 2007).

Skin is rich in proteins, one of the major targets of oxidative damage (SANDER, et al 2003). However, we did not observe any alterations in the content of carbonyl proteins (CP) and AOPP levels between the SCC and control group. Peres et al (2011) observed an increase of CP in chronologic-aged mice skin, but not in chronic irradiated mice skin. Terra et al (2012), using acute doses of UVB irradiation, did not verify any alterations of CP content right after irradiation in mice skin. Corroborating with this, it was recently demonstrated that keratinocytes has an effective proteolysis mechanism against UV-induced protein oxidation, which is triggered in keratinocytes by acute doses of UV and it is increased in sun damaged-human skin samples (CHEN, et al 2016), suggesting that, in adjacent epidermis, occurred an adaptive mechanism over the chronic irradiation process, which overwhelmed the accumulation of oxidized proteins.

However, on the other hand, elevated presence of 3-NT was observed in tumor tissue. It has been demonstrated that acute UVB exposure leads to NO[•] formation in hairless mice skin (TERRA, et al 2012b, TERRA et al 2015). The oxidative environment promoted by UV favors NO[•] to rapidly react with O₂^{•-}, forming peroxynitrite (ONOO[•]). ONOO[•] is a potent oxidant that induces nitration of tyrosine residues in proteins, leading to the formation of 3-NT, a nitrosative stress biomarker used to indirectly evaluate the production of NO[•], O₂^{•-} and ONOO[•] (RADI, 2003). In agreement with this, Terra et al (2012) showed increased NO levels and lipid peroxidation in hairless mice skin after 24h of an acute dose of UVB. This event was accompanied by low levels of catalase and elevated presence of 3-NT in the tissue (TERRA, et al 2012b). Thus, low levels of catalase in AK animals which persists in SCC strongly suggests that H₂O₂ imbalance gives rise to the highly reactive radicals and impairs redox signaling, portrayed by neoplastic tissue with accumulation of 3-NT.

Besides tyrosine nitration, ONOO[•] may induce lipid peroxidation (PRYOR & SQUADRITO, 1995; ŁUCZAJ, GĘGOTEK & SKRZYDLEWSKA, 2017), indicated by elevated presence of 4-HNE in tumor tissue. 4-HNE corresponds to another aldehyde end-product of lipid peroxidation, reflecting decomposition of hydroperoxides formed at initiation of lipid peroxidation cascade. It may form adducts with proteins, lipids and DNA. At physiological levels, 4-HNE-protein adducts is related to cell signaling (e.g. cell proliferation). Thus, its uncontrolled formation may promote tumor growth, evidenced by SCC development (FAZIO, et al 1993; CHAUDARY et al 2013; ŁUCZAJ, GĘGOTEK & SKRZYDLEWSKA, 2017). These data evidences that skin photo carcinogenesis is associated with ONOO[•] effects which leads to the accumulation of oxidized products in a long-term effect, probably triggered by impaired catalase activity, highlighting the importance of skin redox balance promoted by the antioxidant system.

Because skin lipid peroxidation was shown to be a strong marker of UVB-induced oxidative DNA damage and it is related to cell proliferation, we verified whether increasing TBARS levels in premalignant lesions correlates with skin antioxidant levels of catalase and GSH. GSH and catalase levels showed an inversely proportional correlation with TBARS levels, in which GSH showed moderately inversely correlation (although not statistically significant) and catalase strong inversely correlation (statistically significant). This could be explained by O₂^{•-}

generation through UV photosensibilization, which is dismuted to H_2O_2 and forms $\cdot OH$, as mentioned above (KIELBASSA, ROZA & EPE, 1997). Considering this, it can be suggested that catalase plays a role against cutaneous malignization and its depletion favors SCC carcinogenesis more sharply than GSH depletion, once catalase activity decreases in premalignant and malignant lesions, whereas TBARS levels increase in the same proportion. This antioxidant imbalance appears to be the first steps to occur in SCC development, in which an UVB-induced catalase deficiency allowing H_2O_2 to act in an unspecific way initiates a cascade of events which remains continuously in this chronic process.

Damaged skin due to cutaneous lesions attributed to chronic UVB exposure attracts inflammatory cells which undergo to respiratory burst performed by myeloperoxidase, producing hypochlorous acid (HOCl) and yielding oxidized proteins such as AOPP (LAMBETH, 2004). Although AOPP levels in skin did not change, high levels of plasma AOPP was detected. HOCl is a highly reactive specie that oxidizes cysteine residues from thiol and also interacts with another radical scavengers, such as the LWMA albumin, here represented by plasma TRAP levels (ABUJA & ALBERTINI, 2001; HAENEN & BAST, 2014). Thus, systemic inflammatory response leading to AOPP formation may explain GSH oxidation (HOCl oxidizes its thiol group) and diminished TRAP levels (HOCl oxidizes albumin). In contrast to the observed in cutaneous analyzes, it appears that systemic GSH plays a central role in counteracting redox imbalance, maintaining thiols in its reduced state and also "saving" catalase through GPx-detoxifying peroxides, reflecting the unaltered total thiol levels and catalase activity, respectively. Decreased MDA levels could be explained by this maintenance of antioxidants compounds in order to counteract redox imbalance. Taking together, these data suggest that SCC lesion amplifies a local oxidative stress response induced by UV exposure, that reaches bloodstream and leads to inflammation, evidencing an interplay between tumor microenvironment and bloodstream.

Our results indicates that, in skin, UVB-chronic irradiation leads to local redox imbalance in order to promote tumor development. Corroborating with our hypothesis, this was reflected by a modulation of systemic oxidative parameters. However, it rises the questioning about the relevance of this event. Considering the constantly exposure to UV radiation as the causative factor for SCC and oxidative damage underlying its pathogenesis, it can be suggested that tissue-bloodstream

communication discussed above may be present in the early steps of the carcinogenesis process, and perhaps precedes tumor development per se, making blood biomarkers as a valuable method for SCC clinical follow-up. Recently, Chaisiriwong et al. (2016) showed that BCC causes systemic oxidative stress in humans, once one month after skin tumor removal the systemic antioxidant defense and DNA damage was restored. This reinforces the possible use for oxidative biomarkers in NMSC prevention and accompaniment, which must be also characterized in SCC-bearing patients.

In conclusion, the present data shows for the first time that UVB chronic irradiation leads not only to adjacent and tumoral oxidative stress in skin, but it reverberates systemically through the blood. These new findings can bring some light on the pathogenesis of SCC to design better a chemoprevention strategy and also to avoid another primary SCC development and metastasis.

References

ABUJA, P. M.; ALBERTINI, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clinica Chimica Acta**, v. 306, n. 1–2, p. 1–17, 2001. DOI: 10.1016/S0009-8981(01)00393-X

AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 121–126, 1984. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3

AMBOTHI, K.; PRASAD, N. R.; BALUPILLAI, A. Ferulic acid inhibits UVB-radiation induced photocarcinogenesis through modulating inflammatory and apoptotic signaling in Swiss albino mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 82, p. 72–78, 2015. DOI: 10.1016/j.fct.2015.04.031

AYDIN, A.; ARSOVA-SARAFINOVSKA, Z.; SAYAL, A.; EKEN, A.; ERDEM, O.; ERTEN, K.; ÖZGÖK, Y.; DIMOVSKI, A. Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. **Clinical Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 176–179, 2006. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2005.11.018

BATH-HEXTALL, F.; JENKINSON, C.; KUMAR, A.; LEONARDI-BEE, J.; PERKINS, W.; COX, K.; GLAZEBROOK, C. Longitudinal, mixed method study to look at the experiences and knowledge of non melanoma skin cancer from diagnosis to one year. *BMC Dermatology*, v. 13, n. 1, p. 1, 2013. DOI: 10.1186/1471-5945-13-13

BERNARDES, S. S.; GUARNIER, F. A.; MARINELLO, P. C.; ARMANI, A.; SIMÃO, A. N. C.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A. L. Reactive oxygen species play a role in muscle wasting during thyrotoxicosis. *Cell and Tissue Research*, v. 357, n. 3, p. 803–814, 2014. DOI: 10.1007/s00441-014-1881-1

BERNARDES, S. S.; SOUZA-NETO, F. P. DE; PASQUAL MELO, G.; GUARNIER, F. A.; MARINELLO, P. C.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A. L. Correlation of TGF- β 1 and oxidative stress in the blood of patients with melanoma: a clue to understanding melanoma progression? *Tumor Biology*, v. 37, n. 8, p. 10753–10761, 2016. DOI: 10.1007/s13277-016-4967-4

BERNARDES, S. S.; SOUZA-NETO, F. P. DE; RAMALHO, L. N. Z.; DEROSI, D. R.; GUARNIER, F. A.; SILVA, C. F. N. DA; MELO, G. P.; SIMÃO, A. N. C.;

CECCHINI, R.; CECCHINI, A. L. Systemic oxidative profile after tumor removal and the tumor microenvironment in melanoma patients. *Cancer Letters*, v. 361, n. 2, p. 226–232, 2015. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.03.007

BRENNEISEN, P.; WENK, J.; KLOTZ, L. O.; WLASCHEK, M.; BRIVIBA, K.; KRIEG, T.; SIES, H.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. Central Role of Ferrous / Ferric Iron in the Ultraviolet B Irradiation-mediated Signaling Pathway Leading to Increased Interstitial Collagenase (Matrix-degrading Metalloprotease (MMP)-1) and Stromelysin-1 (MMP-3) mRNA Levels in Cultured Human Dermal Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 9, p. 5279–5287, 1998.

BROUGHAM, N. D. L. S.; DENNETT, E. R.; CAMERON, R.; TAN, S. T. The incidence of metastasis from cutaneous squamous cell carcinoma and the impact of its risk factors. *Journal of Surgical Oncology*, v. 106, n. 7, p. 811–815, 2012. DOI: 10.1002/jso.23155

CHASIRIWONG, L.; WANITPHAKDEEDECHA, R.; SITTHINAMSUWAN, P.; SAMPATTAVANICH, S.; CHATSIRICHAROENKUL, S.; MANUSKIATTI, W.; PANICH, U. A Case-Control Study of Involvement of Oxidative DNA Damage and Alteration of Antioxidant Defense System in Patients with Basal Cell Carcinoma: Modulation by Tumor Removal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016. DOI: 10.1155/2016/5934024

CHAQOUR, B.; SEITÉ, S.; COUTANT, K.; FOURTANIER, A.; BOREL, J. P.; BELLON, G. Chronic UVB- and all-trans retinoic-acid-induced qualitative and quantitative changes in hairless mouse skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 28, n. 2, p. 125–135, 1995. DOI: 10.1016/1011-1344(94)07080-8

CHAUDHARY, P.; SHARMA, R.; SAHU, M.; VISHWANATHA, J. K.; AWASTHI, S.; AWASTHI, Y. C. 4-Hydroxynonenal induces G2/M phase cell cycle arrest by activation of the ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related protein (ATR)/checkpoint kinase 1 (Chk1) signaling pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 28, p. 20532–20546, 2013. DOI: 10.1074/jbc.M113.467662

CHEN, C. Y.; CHEN, C. J.; LAI, C. H.; WU, B. Y.; LEE, S. P.; JOHNSON, M. D.; LIN, C. Y.; WANG, J. K. Increased matriptase zymogen activation by UV irradiation protects keratinocyte from cell death. **Journal of Dermatological Science**, v. 83, n. 1, p. 34–44, 2016. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2016.03.006

DELICONSTANTINOS, G.; VILLIOTOU, V.; STAVRIDES, J. C. Increase of particulate nitric oxide synthase activity and peroxynitrite synthesis in UVB-irradiated keratinocyte membranes. **Biochemical Journal**, v. 320, n. Pt3, p. 997–1003, 1996.

DESCAMPS-LATSCHA, B.; WITKO-SARSAT, V.; NGUYEN-KHOA, T.; NGUYEN, A. T.; GAUSSON, V.; MOTHU, N.; CARDOSO, C.; NOËL, L. H.; GUÉRIN, A. P.; LONDON, G. M.; JUNGERS, P. Early prediction of IgA nephropathy progression: Proteinuria and AOPP are strong prognostic markers. **Kidney International**, v. 66, n. 4, p. 1606–1612, 2004. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2004.00926.x

DICKINSON, D. A.; FORMAN, H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 5–6, p. 1019–1026, 2002. DOI: 10.1016/S0006-2952(02)01172-3

DODDS, A.; CHIA, A.; SHUMACK, S. Actinic Keratosis: Rationale and Management. **Dermatology and Therapy**, v. 4, n. 1, p. 11–31, 2014. DOI: 10.1007/s13555-014-0049-y

FAZIO, V. M.; RINALDI, M.; CIAFRÈ, S.; BARRERA, G.; FARACE, M. G. Control of neoplastic cell proliferation and differentiation by restoration of 4-hydroxynonenal physiological concentrations. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 14, n. 3, p. 217–228, 1993. DOI: 10.1016/0098-2997(93)90008-2

HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **Biochemical Journal**, v. 401, n. 1, p. 1–11, 2007. DOI: 10.1042/BJ20061131

HATTORI, Y.; NISHIGORI, C.; TANAKA, T.; UCHIDA, K.; NIKAIDO, O.; OSAWA, T.; HIAI, H.; IMAMURA, S.; TOYOKUNI, S. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 107, n. 5, p. 733–737, 1996. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12365625

HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. Glutathione revisited: A better scavenger than previously thought. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, n. NOV, p. 1–5, 2014. DOI: 10.3389/fphar.2014.00260

HECK, D. E.; VETRANO, A. M.; MARIANO, T. M.; LASKIN, J. D. UVB light stimulates production of reactive oxygen species: Unexpected role for catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 25, p. 22432–22436, 2003. DOI: 10.1074/jbc.C300048200

HOLMSTRÖM, K. M.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 411–421, 2014. DOI: 10.1038/nrm3801

HU, M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. **Methods in Enzymology**, v. 233, n. C, p. 380–385, 1994. DOI: 10.1016/S0076-6879(94)33044-1

KAUVAR, A. N. B.; ARPEY, C. J.; HRUZA, G.; OLBRICHT, S. M.; BENNETT, R. Consensus for Nonmelanoma Skin Cancer Treatment, Part II. **Dermatologic Surgery**, v. 41, n. 11, p. 1214–1240, 2015. DOI: 10.1097/DSS.0000000000000478

KIELBASSA, C.; ROZA, L.; EPE, B. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 4, p. 811–816, 1997. DOI: 10.1093/carcin/18.4.811

KOHEN, R.; ORON, M.; ZELKOWICZ, A.; KANEVSKY, E.; FARFOURI, S.; WORMSER, U. Low molecular weight antioxidants released from the skin's epidermal layers: An age dependent phenomenon in the rat. **Experimental Gerontology**, v. 39, n. 1, p. 67–72, 2004. DOI: 10.1016/j.exger.2003.09.022

KOYUNCUER, A. Histopathological evaluation of non-melanoma skin cancer. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 12, n. 1, p. 1–6, 2014. DOI: 10.1186/1477-7819-12-159

KRAFT, S.; GRANTER, S. R. Molecular pathology of skin neoplasms of the head and neck. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 138, n. 6, p. 759–787, 2014. DOI: 10.5858/arpa.2013-0157-RA

LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 181–189, 2004. DOI: 10.1038/nri1312

LENNICKE, C.; RAHN, J.; LICHTENFELS, R.; WESSJOHANN, L. A.; SELIGER, B. Hydrogen peroxide – production, fate and role in redox signaling of tumor cells. **Cell Communication and Signaling**, v. 13, n. 1, p. 39, 2015. DOI: 10.1186/s12964-015-0118-6

LOCATELLI, C.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. **Chemico-Biological Interactions**, v. 181, n. 2, p. 175–184, 2009. DOI: 10.1016/j.cbi.2009.06.019

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L. A.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951. DOI: 10.1016/0304-3894(92)87011-4

ŁUCZAJ, W.; GĘGOTEK, A.; SKRZYDLEWSKA, E. Antioxidants and HNE in redox homeostasis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 111, n. November 2016, p. 87–101, 2017. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.033

MASAKI, H.; ATSUMI, T.; SAKURAI, H. Detection of Hydrogen Peroxide and Hydroxyl Radicals in Murine Skin Fibroblasts under UVB **Irradiation biochemical and biophysical research communications**, 1995.

MCGUIRE, J. F.; GE, N. N.; DYSON, S. Nonmelanoma skin cancer of the head and neck I: histopathology and clinical behavior. **American journal of otolaryngology**, v. 30, n. 2, p. 121–33, 2009. DOI: 10.1016/j.amjoto.2008.03.002

MILLER, G. L. Protein Determination for Large Numbers of Samples. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 5, p. 962–964, 1959. DOI: 10.1021/ac60149a610

NAVARRO, J.; OBRADOR, E.; CARRETERO, J.; PETSCHEN, I.; AVIÑÓ, J.; PEREZ, P.; ESTRELA, J. M. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 3–4, p. 410–415, 1999. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00213-5

OLIVEIRA, F. J.; CECCHINI, R. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) chagasi*. **The Journal of parasitology**, v. 86, n. 5, p. 1067–72, 2000. DOI: 10.1645/0022-3395(2000)086[1067:OSOLIH]2.0.CO;2

PAUL PALYCA, VADIM P. KOSHENKOV, AND J. M. M. Developments in the Treatment of Locally Advanced and Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Skin: A Rising Unmet Need. **Am Soc Clin Oncol Educ Book**, 2015, p. 42–50, 2016. DOI: 10.14694/EdBook

PANIS, C.; VICTORINO, V. J.; HERRERA, A. C. S. A.; FREITAS, L. F.; ROSSI, T. DE; CAMPOS, F. C.; SIMÃO, A. N. C.; BARBOSA, D. S.; PINGE-FILHO, P.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A. L. Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 3, p. 881–888, 2012. breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Jun;133(3):881-8. 10.1007/s10549-011-1851-1

PERES, P. S.; TERRA, V. A.; GUARNIER, F. A.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A. L. Photoaging and chronological aging profile: Understanding oxidation of the skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 103, n. 2, p. 93–97, 2011. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2011.01.019

PISKOUNOVA, E.; AGATHOCLEOUS, M.; MURPHY, M. M.; HU, Z.; HUDDLESTUN, S. E.; ZHAO, Z.; LEITCH, A. M.; JOHNSON, T. M.; DEBERARDINIS, R. J.; MORRISON, S. J. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. **Nature**, v. 527, n. 7577, p. 186–191, 2015. DOI: 10.1038/nature15726

PODDA, M.; TRABER, M. G.; WEBER, C.; YAN, L. J.; PACKER, L. UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 1, p. 55–65, 1998. DOI: 10.1016/S0891-5849(97)00142-1

PRYOR, W. A.; SQUADRITO, G. L. The chemistry of peroxyxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. **Am J Physiol**, v. 268, n. 5 Pt 1, p. L699-722, 1995.

QUINTANILHA, J. C. F.; VISACRI, M. B.; SOUSA, V. M.; BASTOS, L. B.; VAZ, C. O.; GUARNIERI, J. P. O.; AMARAL, L. S.; MALAGUTI, C.; LIMA, C. S. P.; VERCESI, A. E.; MORIEL, P. Cisplatin-induced human peripheral blood mononuclear cells'

oxidative stress and nephrotoxicity in head and neck cancer patients: the influence of hydrogen peroxide. **Molecular and Cellular Biochemistry**, n. November 2016, 2017. DOI: 10.1007/s11010-017-3162-2

RADI, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 12, p. 4003–8, 2004. DOI: 10.1073/pnas.0307446101

REPETTO, M.; REIDES, C.; GOMEZ CARRETERO, M. L.; COSTA, M.; GRIEMBERG, G.; LLESUY, S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 255, n. 2, p. 107–17, 1996. DOI: 10.1016/0009-8981(96)06394-2

SANDER, C. S.; CHANG, H.; SALZMANN, S.; MÜLLER, C. S. L.; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S.; ELSNER, P.; THIELE, J. J. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. **The Journal of investigative dermatology**, v. 118, p. 618–625, 2002. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2002.01708.x

SANDER, C. S.; HAMM, F.; ELSNER, P.; THIELE, J. J. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. **The British journal of dermatology**, v. 148, n. 5, p. 913–922, 2003. DOI: 10.1046/j.1365-2133.2003.05303.x

SANDER, C. S.; CHANG, H.; HAMM, F.; ELSNER, P.; THIELE, J. J. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. **International Journal of Dermatology**, v. 43, n. 5, p. 326–335, 2004. DOI: 10.1111/j.1365-4632.2004.02222.x

SEBER, S.; GONULTAS, A.; OZTURK, O.; YETISYIGIT, T. Recurrent squamous cell carcinoma of the skin treated successfully with single agent cetuximab therapy. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 945–948, 2016. DOI: 10.2147/OTT.S96227

SCHMULTS, C. D.; KARIA, P. S.; CARTER, J. B.; HAN, J.; QURESHI, A. A. Factors predictive of recurrence and death from cutaneous squamous cell carcinoma: A 10-

year, single-institution cohort study. **JAMA Dermatology**, v. 149, n. 5, p. 541–547, 2013. DOI: 10.1001/jamadermatol.2013.2139

SEN, C. K.; PACKER, L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 10, n. 7, p. 709–20, 1996.

SZATROWSKI, T. P.; NATHAN, C. F. Production of Large Amounts of Hydrogen Peroxide by Human Tumor Cells¹. **Cancer research**, p. 794–799, 1991. DOI:

SOUZA NETO, F. P. DE; BERNARDES, S. S.; MARINELLO, P. C.; MELO, G. P.; LUIZ, R. C.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A. L. Metformin: oxidative and proliferative parameters in-vitro and in-vivo models of murine melanoma. **Melanoma Research**, v. 27, n. 6, p. 536–544, 2017. DOI: 10.1097/CMR.000000000000039

TERRA, V. A.; SOUZA-NETO, F. P.; PEREIRA, R. C.; SILVA, T. N. X.; COSTA, A. C. C.; LUIZ, R. C.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A. L. Time-dependent reactive species formation and oxidative stress damage in the skin after UVB irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 109, p. 34–41, 2012. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2012.01.003

TERRA, V. A.; SOUZA-NETO, F. P.; PEREIRA, R. C.; XAVIER DA SILVA, T. N.; RAMALHO, L. N. Z.; LUIZ, R. C.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A. L. Nitric oxide is responsible for oxidative skin injury and modulation of cell proliferation after 24 hours of UVB exposures. **Free Radical Research**, v. 46, n. 7, p. 872–882, 2012. DOI: 10.3109/10715762.2012.686036

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502–522, 1969. DOI: 10.1016/0003-2697(69)90064-5

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSNER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human

disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001

VICTORINO, V. J.; PANIS, C.; CAMPOS, F. C.; CAYRES, R. C.; COLADO-SIMÃO, A. N.; OLIVEIRA, S. R.; HERRERA, A. C. S. A.; CECCHINI, A. L.; CECCHINI, R. Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women. **Age**, v. 35, n. 4, p. 1411–1421, 2013. DOI: 10.1007/s11357-012-9431-9

VURAL, P.; CANBAZ, M.; SEKÇUKI, D. Plasma antioxidant defence in actinic keratosis and basal cell carcinoma. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 38, n. 6, p. 439–442, 1999.

WILLIAMS, J. D.; BERMUDEZ, Y.; PARK, S. L.; STRATTON, S. P.; UCHIDA, K.; HURST, C. A.; WONDRAK, G. T. Malondialdehyde-derived epitopes in human skin result from acute exposure to solar UV and occur in nonmelanoma skin cancer tissue. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 132, p. 56–65, 2014. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2014.01.019

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho corrobora com as evidências da participação do estresse oxidativo induzido por UVB na fisiopatologia do carcinoma espinocelular de pele (CEC), uma vez que os animais que desenvolveram carcinoma espinocelular induzido por UVB apresentam estresse oxidativo na pele adjacente ao tumor, assim como no tecido tumoral. Ainda, este trabalho mostra pela primeira vez que, no CEC experimental, ocorre estresse oxidativo a nível sistêmico, sugerindo que o estresse oxidativo sistêmico deve ser caracterizado em pacientes portadores de CEC a fim de contribuir em estratégias terapêuticas e preventivas.

Corroborando com o potencial quimiopreventivo da metformina, este trabalho demonstrou que o tratamento com metformina é capaz de diminuir a proliferação epidérmica e o dano epitelial em camundongos irradiados cronicamente com UVB, assim como diminuir a presença da proteína p53, parâmetros que relacionados à carcinogênese, e que estes eventos estão associados à regulação do sistema antioxidante da pele. Este é o primeiro trabalho a fornecer evidências de que um dos mecanismos da metformina envolvidos na patogênese do CEC envolve uma regulação positiva do sistema antioxidante epidérmico.