



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GABRIELLA PASQUAL MELO

**ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE NITRO-OXIDATIVO
DURANTE A PROGRESSÃO DA METÁSTASE PULMONAR
EXPERIMENTAL DE MELANOMA MURINO**

GABRIELLA PASQUAL MELO

**ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE NITRO-OXIDATIVO
DURANTE A PROGRESSÃO DA METÁSTASE PULMONAR
EXPERIMENTAL DE MELANOMA MURINO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Lourenço
Cecchini Armani

Londrina
2017

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

Melo, Gabriella.

ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE NITRO-OXIDATIVO DURANTE A PROGRESSÃO DA METÁSTASE PULMONAR EXPERIMENTAL DE MELANOMA MURINO / Gabriella Melo. - Londrina, 2017.

61 f. : il.

Orientador: Alessandra Lourenço Cecchini Armani.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Metástase experimental de melanoma murino - Tese. 2. Estresse nitro-oxidativo - Tese. 3. Estímulo da produção de melanina in vitro - Tese. I. Lourenço Cecchini Armani, Alessandra. II. Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

GABRIELLA PASQUAL MELO

**ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE NITRO-OXIDATIVO DURANTE A
PROGRESSÃO DA METÁSTASE PULMONAR EXPERIMENTAL DE
MELANOMA MURINO**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Sara Santos Bernardes
Universidade Federal da Grande Dourados -
UFGD

Londrina, 07 de abril de 2017.

Dedico este trabalho aos meus pais,
que sempre me incentivaram e me
ampararam em todos os desafios
enfrentados.

AGRADECIMENTOS

São muitos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado e concluído. Em primeiro lugar, agradeço a minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Alessandra Lourenço Cecchini Armani, que desde a minha graduação me acolheu em seu laboratório e me ensinou o que é ser pesquisadora, sempre me incentivando e me auxiliando em todas as faces do meu trabalho.

Gostaria de agradecer imensamente a Dr^a. Sara Santos Bernardes, que com toda a sua paciência e dedicação, me ensinou todos os passos da pesquisa, desde os mais básicos cálculos e pipetagem, até a finalização de um trabalho.

Aos professores Dr^a. Flávia Alessandra Guarnier, Dr. Rubens, Dr. Jair Tonon e Dr. Rodrigo Cabral Luiz que estavam sempre disponíveis no laboratório para discussões.

Aos amigos de laboratório, que compartilharam alegrias, tristezas, angústias, medos, e que com seus conselhos e amizade me incentivaram a chegar até a conclusão do trabalho, em especial a Poliana Marinello, Fernanda Paschoal, Iriana Carrara, Heloiza Bordini, Fernando Pinheiro e Bárbara Previtall que me deram muito suporte científico e emocional durante esses anos.

Aos técnicos do laboratório Pedro Sebastião e Jesus Antonio Vargas que sempre com muita boa vontade, me ajudaram e me ensinaram muitas coisas.

À CAPES e ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Gostaria muito de agradecer a minha família que sempre esteve tão presente. Aos meus pais Marly Genoveva Pasqual e Osmar Loureiro Melo, que me apoiaram incondicionalmente e que me deram todos os suportes possíveis e impossíveis para que eu chegasse aonde cheguei. Ao meu irmão Guilherme Pasqual Melo com quem eu pude compartilhar muitas alegrias e muitos medos ao longo de toda a minha vida, e que estava sempre disposto a me segurar a qualquer deslize.

Aos meus tios Itálo Pasqual, Silvia Maria e Maria Aparecida e primos João Pedro Pasqual e Vitor Pasqual que fazem parte da minha pequena família em número, mas que sempre foram enormemente importantes e dedicados.

E aos meus amigos de longa data Leonardo Pieiro, Letícia Altini, Isabella Rufino, Marina Navarro e Camila Gonçalves que sempre estavam dispostos a me escutar e me aconselhar.

“A persistência é o caminho do exito.”

Charles Chaplin

MELO, Gabriella Pasqual. **Envolvimento do estresse nitro-oxidativo durante a progressão da metástase pulmonar experimental de melanoma murino.** 2017. 61 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O melanoma é o mais grave dos cânceres de pele devido a sua alta capacidade invasiva. Uma vez que o desequilíbrio redox pode modular o comportamento celular, influenciando a resposta do hospedeiro, bem como o crescimento tumoral e sabendo que o melanoma é um câncer altamente sensível a essas mudanças a nível sistêmico e no microambiente tumoral, se torna importante conhecer os fenômenos nitro-oxidativos envolvidos na instalação e progressão da metástase do melanoma. Células de melanoma murino B16F10 foram cultivadas em DMEM 10%SFB e inoculadas 10^5 células viáveis em 50 μ L de DMEM sem soro em camundongos C57BL/6 machos (8-12 semanas), via endovenosa pelo plexo oftálmico. O grupo controle recebeu 50 μ L de DMEM sem soro. Os camundongos foram submetidos à eutanásia após 3, 7, 14 ou 21 dias, e os grupos denominados M3, M7, M14 e M21 respectivamente, com n=8. O pulmão foi retirado e feita a contagem de nódulos metastáticos. O lobo médio do pulmão direito foi separado para inclusão em parafina e posterior análise imunohistoquímica (VEGF, PCNA e 3-NT), o restante foi armazenado a -80°C . O sangue total foi coletado por punção cardíaca e separados plasma e eritrócitos, o primeiro foi armazenado a -20°C e o segundo em tampão alsever a 8°C . Foram feitas análises sistêmicas e no pulmão, de parâmetros pró oxidantes (QL e MDA) e antioxidantes (Catalase, GSH e TRAP) e avaliados estatisticamente por One-Way ANOVA e Tukey como pós teste. Para analisar a célula tumoral livre de interferência sistêmica ou de outras células, avaliamos parâmetros oxidativos *in vitro* (MDA, Catalase, GSH e TRAP) em células B16F10 e as mesmas com estímulo da produção de melanina (L-tirosina $1700\mu\text{M/L}$ e NH_4Cl 10mM/L , em DMEM 10%SFB). Foi feita uma curva de proliferação após 24 e 48 horas de cultivo e as análises de estresse oxidativo após 48 horas. A análise estatística foi realizada com Two-Way ANOVA e Tukey como pós teste, para avaliar proliferação e teste t de student não pareado para os parâmetros antioxidantes ($p < 0,05$ considerado significativo). Existe um aumento na lipoperoxidação plasmática no estágio mais inicial da doença, com progressiva diminuição do dano oxidativo e aumento de defesas antioxidantes. Ao contrário, observamos no microambiente tumoral um aumento da lipoperoxidação e marcação para 3-NT a medida que aumentam os nódulos metastáticos, com diminuição de antioxidantes e aumento progressivo de VEGF como sinalização angiogênica e PCNA como sinal de proliferação. *In vitro*, houve aumento de proliferação após 48 horas nas células produtoras de melanina com aumento dos antioxidantes TRAP, Catalase e GSH, no mesmo grupo. Logo, podemos concluir que o aumento do equilíbrio redox na corrente sanguínea favorece a progressão tumoral, enquanto a redução do equilíbrio redox no tecido, causada em parte pela produção de melanina, favorece a sinalização para a proliferação de células de melanoma e crescimento do tumor, ao mesmo tempo em que o aumento de melanina fornece proteção antioxidante para a célula tumoral.

Palavras-chave: Melanoma. Metástase. Estresse oxidativo. Estresse nitrosativo. Melanina.

MELO, Gabriella Pasqual. **Nitro-Oxidative Stress environment during pulmonary experimental metastasis of murine melanoma progression**. 2017. 61 p. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Melanoma is the most serious of skin cancers due to its high invasive ability. Since redox imbalance can modulate cellular behavior, influencing host response as well as tumor growth. Therefore knowing that melanoma is a cancer highly sensitive to these changes at the systemic level and in the tumor microenvironment, it becomes important to know the phenomena Nitro-oxidative factors involved in the onset and progression of melanoma metastasis. B16F10 murine melanoma cells were cultured in 10% SFB DMEM and inoculated 10^5 viable cells in 50 μ l of serum-free DMEM in male C57BL/6 mice (8-12 weeks), intravenous ophthalmic plexus. The control group received 50 μ L of serum-free DMEM. The mice were submitted to euthanasia after 3, 7, 14 or 21 days, and the groups named M3, M7, M14 and M21 respectively, with n=8. The lung was removed and metastatic nodules were counted. The mean lobe of the right lung was separated for paraffin inclusion and subsequent immunohistochemical analysis (VEGF, PCNA and 3-NT), the remainder was stored at -80 ° C. Whole blood was collected by cardiac puncture and plasma and erythrocytes separated, the first one stored at -20°C and the second one in alsever buffer at 8°C. Were made systemic and lung analyzes of pro-oxidant parameters (QL and MDA) and antioxidants parameters (Catalase, GSH and TRAP). Statistical differences were evaluated by One-Way ANOVA following Tukey's post-hoc testing. In order to analyze the tumor cell *in vitro* without systemic or other cells influence, we evaluated *in vitro* oxidative stress parameters (MDA, Catalase, GSH and TRAP) in B16F10 cells and the same ones with stimulation of melanin production (L-tyrosine 1700 μ M/L and NH₄Cl 10mM/L, in DMEM 10% FBS). A proliferation curve was made after 24 and 48 hours of culture and analyzes of oxidative stress after 48 hours. Statistical analysis was performed with Two-Way ANOVA following Tukey's post-hoc testing, to evaluate proliferation and unpaired Student's t-test for oxidative stress parameters (p<0.05 considered significant). There is an increase in plasma lipid peroxidation at the earliest stage of the disease, with a progressive decrease in oxidative damage and an increase in antioxidant defenses. In contrast, we observed in the tumor microenvironment an increase in lipid peroxidation and 3-NT labeling as the metastatic nodules increase, with decreasing antioxidants and progressive increase of VEGF as angiogenic signaling and PCNA as a sign of proliferation. *In vitro* proliferation increased after 48 hours in melanin-producing cells with increased antioxidant TRAP, Catalase and GSH, in the same group. Thus, we can conclude that increased redox unbalance in the bloodstream favors tumor progression, while reduction of tissue redox balance, caused in part by melanin production, favors signaling for melanoma cell proliferation and tumor growth, while increasing melanin provides antioxidant protection for the tumor cell.

Key words: Melanoma. Metastasis. Oxidative stress. Nitrosative stress. Melanin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Cascata de reações da lipoperoxidação	21
Figura 2 – ERO como reguladora de vias de transdução de sinal	22
Figura 3 – Etapas da síntese de melanina	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE	4-Hidroxi-2-nonenal
5,6-DHI	5-6-Dihidroindol
5,6-DHICA	ácido dihidroindol carboxílico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
O ₂ [•]	Radical ânion superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OH [•]	Radical hidroxila
OH ⁻	Ânion hidroxila
L [•]	Radical lipídico
LO [•]	Radical alcoxila
LOO [•]	Radical peroxila
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i> – Quinase dependente de ciclina
MEC	Matrix Extracelular
ER	Espécies reativas
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
HIFs	<i>Hypoxia Inducible Factors</i> – Fatores indutores de hipóxia
INCA	Instituto Nacional do Cancer
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i> – Proteínas quinase ativadas por mitógenos
MDA	Malondialdeído
MES	Melanoma Extensivo Superficial
MLA	Melanoma Lentiginoso Acral
MLM	Melanoma do Lentigo Maligno
MN	Melanoma Nodular
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa B</i> – Fator nuclear kappa B
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i> – Oxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3 kinase</i> – Fosfatidilinositol 3-quinase

SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results Program</i>
SOD	Superóxido dismutase
TRP2	<i>Tyrosinase protein 2</i> – Proteína tirosinase 2
UV	Ultravioleta
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> - Fator de crescimento endothelial vascular

SUMÁRIO

1			
2			
3	1	INTRODUÇÃO	12
4	1.1	MELANOMA.....	12
5	1.2	MELANOMA METASTÁTICO	14
6	1.3	RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO	16
7	1.4	MELANINA.....	23
8	1.5	ESTRESSE OXIDATIVO NO MELANOMA	25
9	1.6	MODELO EXPERIMENTAL DE MELANOMA MURINO	27
10			
11	2	OBJETIVO	29
12	2.1	OBJETIVO GERAL	29
13	2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
14			
15	3	HIPÓTESE	30
16			
17	4	PRINCIPAIS RESULTADOS	31
18			
19	5	CONCLUSÃO	32
20			
21	6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
22			
23		APÊNDICES	39
24		APÊNDICE A – Artigo Científico	39
25			

1 INTRODUÇÃO

3 1.1 Melanoma

5 O câncer de pele é a neoplasia mais comum em âmbito global, e, com o
6 passar dos anos sua incidência tem aumentado em diversos países. O melanoma
7 corresponde a menos de 5% de todos os cânceres da pele (OMS, 2015), no entanto
8 possui uma alta taxa de mortalidade. De acordo com a American Cancer Society,
9 este câncer é responsável por mais de 73% das mortes por câncer de pele a cada
10 ano. Segundo a organização mundial da saúde cerca de 132.000 novos casos de
11 melanoma são diagnosticados mundialmente a cada ano. No Brasil, as estimativas
12 para 2016 são de 3 mil novos casos em homens e 2670 em mulheres. As maiores
13 taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul, onde são
14 esperados 2410 novos casos em homens e 1890 em mulheres. (INCA, 2016).

15 O melanoma tem origem nos melanócitos, que são células dendríticas
16 derivadas de melanoblastos neuroectodérmicos, e que durante o desenvolvimento
17 embrionário migram para epiderme, derme, membranas mucosas e coróide. A maior
18 parte deles localiza-se na pele, na camada basal da epiderme dispersa entre os
19 queratinócitos. Normalmente os melanócitos formam junções aderentes e
20 regulatórias com cinco a oito queratinócitos vizinhos, por meio da molécula de
21 adesão E-caderina. (SMITH et al., 2002). Essas células produzem o pigmento
22 melanina através da oxidação do aminoácido tirosina, por ação da enzima tirosinase,
23 e transferem os grânulos formados aos queratinócitos, através de seus
24 prolongamentos citoplasmáticos, onde ela vai ser acondicionada em vesículas
25 denominadas melanossomos. (CHU et al., 2008).

26 A etiopatogênese deste câncer é multifatorial, incluindo fatores genéticos e
27 raciais. Dentre os principais fatores que levam ao seu aparecimento, encontram-se a
28 sensibilidade ao sol, pele clara, tendência a sardas, história de melanoma na família,
29 presença de nevos e imunossupressão (GUEDES et al., 2006). Cerca de 26% dos
30 melanomas aparecem sobre nevos, desses, 43% são a partir de nevos displásicos,
31 ou seja, a maioria dos casos aparecem sobre a pele íntegra (BEVONA et al., 2003).
32 Estudos sugerem que a radiação ultravioleta (UV) seja responsável por cerca de
33 40% a 50% do risco de desenvolvimento de melanoma e, ao contrário do câncer de
34 pele não-melanoma, o risco não está correlacionado com sua exposição cumulativa,

1 mas sim com a exposição intermitente, especialmente quando houve graves
2 queimaduras em alguma fase da vida infância e na adolescência. (MEYESKENS
3 et al., 2007). A radiação UV pode atuar principalmente sobre os polimorfismos
4 genéticos que aumentam a susceptibilidade ao desenvolvimento desse tipo de
5 câncer cutâneo. (MILLER; MIHM JR, 2006).

6 A porcentagem de casos de melanoma com predisposição familiar
7 (definida como dois parentes de primeiro grau com melanoma) corresponde a 10-
8 12%. Essa predisposição está ligada principalmente a mutações em um gene que
9 codifica um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDKN2A) (DE SNOO et al.,
10 2005). Localizado no cromossomo 9p21, o gene CDKN2A codifica as proteínas p16
11 e p14 que atuam na parada do ciclo celular, logo, uma mutação nesse gene, pode
12 provocar a proliferação descontrolada das células (PALMIERI et al., 2009).

13 As mutações nos genes das proteínas BRAF e NRAS também são
14 frequentes no melanoma. BRAF é uma proteína serina-treonina quinase,
15 pertencente à família de quinases de RAF, que faz parte da via de sinalização da
16 MAPK. Sob condições normais de sinalização, a ligação de um fator de crescimento
17 a um receptor tirosina quinase, por exemplo o c-KIT, ativa RAS que então ativa as
18 quinases da RAF. Existem três quinases RAF identificadas: ARAF, BRAF e CRAF. A
19 ativação de RAF fosforila MEK levando à ativação de ERK e subsequente
20 fosforilação de vários alvos que resultam na proliferação celular e outros processos
21 biológicos importantes. A desregulação da via MAPK é uma característica chave na
22 maior parte dos melanomas. De fato, cerca de 15% a 30% dos melanomas contêm
23 mutações em NRAS e 50% a 70% de todos os melanomas contêm uma mutação no
24 gene BRAF, geralmente resultando em substituição de ácido glutâmico por valina na
25 posição 600 (V600E) (DAVIES et al., 2002).

26 O melanoma pode ser classificado em quatro padrões de crescimento
27 principais, de acordo com a localização anatômica do tumor primário e as
28 características histopatológicas da lesão. O subtipo mais comum é o melanoma
29 extensivo superficial (MES) com uma frequência de 60% a 70% entre todos os tipos
30 de melanomas cutâneos (FERNANDES et al., 2005). Aparece principalmente entre a
31 quarta e quinta décadas de vida e habitualmente surge no tronco em homens e nos
32 membros inferiores em mulheres, estando associado a locais de foto exposição
33 intermitente. Pode ter início sobre uma neoplasia benigna pré-existente chamada

1 nevo, e tende a apresentar um crescimento radial, com invasão da derme e
2 metástases mais tardias (GOSH; CHIN, 2009).

3 Representando o segundo tipo mais comum, o melanoma nodular (MN)
4 corresponde a 15% dos casos. Surge principalmente no tronco e nos membros
5 sobre a pele íntegra, não possui fase de crescimento radial prévio e é caracterizado
6 por uma rápida evolução, com crescimento estimado de 0,49 mm de profundidade
7 por mês. Acomete, normalmente, homens com idade superior a 50 anos
8 (CHAMBERLAIN et al., 2009). Os dois subtipos mais raros são o melanoma lentigo
9 maligno (MLM) e o melanoma lentiginoso acral (MLA). O primeiro é mais comum em
10 idosos, surgindo em área de foto exposição crônica e apresenta-se como uma
11 mancha acastanhada ou enegrecida, de limites nítidos e irregulares, alcançando
12 vários centímetros de diâmetro, localizada na face (90%), em mãos e membros
13 inferiores (10%) (CHAMBERLAIN et al., 2009). O segundo é mais comum em
14 indivíduos asiáticos, hispânicos e africanos, sem predileção por sexo. Localiza-se
15 essencialmente nas extremidades (palmas, plantas do pé e leito ungueal). É o tipo
16 histológico mais agressivo dentre os melanomas (LEDERMAN; SOBER, 1985).

17 18 **1.2 Melanoma metastático**

19
20 O câncer metastático é o resultado final de uma série complexa de
21 eventos biológicos que conduzem à formação de tumores secundários clinicamente
22 significativos em locais distantes. A formação de metástase envolve cinco etapas
23 que são coletivamente denominadas de cascata metastática e estão descritas a
24 seguir (LEBER et al., 2009):

- 25 1. Invasão e migração: quando células individuais se separaram do tumor
26 primário e invadem o tecido saudável adjacente. Durante este
27 processo, várias enzimas líticas são secretadas e degradam a MEC
28 (matriz extracelular), facilitando a migração.
- 29 2. Entrada no vaso: Células neoplásicas atingem vasos sanguíneos e
30 linfáticos após a ligação às células endoteliais, através de moléculas
31 de adesão. As células neoplásicas secretam enzimas proteolíticas que
32 lhes permitam infiltrar no vaso sanguíneo.

- 1 3. Circulação: a célula invasora migra através da circulação enfrentando
2 condições hostis. Nessa etapa pode ocorrer uma seleção de células
3 neoplásicas resistentes que vencem a barreira imunológica.
- 4 4. Extravasamento: as células muitas vezes ficam presas nos capilares
5 de um órgão e deixam o fluxo sanguíneo através da penetração no
6 endotélio por ação de enzimas proteolíticas.
- 7 5. Colonização, proliferação e angiogênese: as células neoplásicas se
8 instalam em um local de tecido distante e formam um tumor
9 secundário, este se prolifera e pode induzir neoangiogênese a fim de
10 garantir vascularização suficiente.

11
12 Um dos sítios mais frequentes de metástase no melanoma e também em
13 muitos tumores sólidos são os linfonodos de drenagem, em regiões anatômicas
14 próximas ao tumor primário. Na verdade, o grau de envolvimento desses linfonodos
15 é um importante fator prognóstico para o melanoma e outros tumores. A metástase
16 linfonodal é iniciada quando as células tumorais invadem canais linfáticos ou quando
17 são atraídas por quimiocinas específicas. Quando sofre disseminação por via
18 hematogênica, os principais órgãos atingidos pelo melanoma são o cérebro, osso,
19 pulmão, fígado e pele (WILEY et al., 2001).

20 A indução da angiogênese é um ponto crítico no desenvolvimento da
21 maioria dos tumores humanos, incluindo o melanoma. Já foi constatado um aumento
22 na densidade vascular em tumores cutâneos diretamente relacionado com a
23 progressão do melanoma (ERHARD et al., 1997; MARCOVAL et al., 1997). Outros
24 autores em anos subsequentes observaram que existe uma relação inversa entre a
25 densidade microvascular do tumor e a sobrevida global dos pacientes com
26 melanoma, sendo a formação de novos vasos, um fator de pior prognóstico (STREIT
27 et al., 2003).

28 Múltiplos fatores pró angiogênicos são produzidos por células de
29 melanoma. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é o principal regulador
30 da angiogênese em condições normais e patológicas na maioria dos órgãos
31 (DVORAK et al., 1995; FERRARA, 1999), incluindo a pele (DETMAR, 1996). No
32 melanoma cutâneo, já foi demonstrado que o aumento desse fator de crescimento
33 está associado com a transição de crescimento horizontal para vertical contribuindo
34 para o desenvolvimento metastático (ERHARD et al., 1997; MARCOVAL et al., 1997).

1 Células neoplásicas circulantes são frequentemente observadas na
2 corrente sanguínea de pacientes e camundongos com diferentes tipos de cânceres
3 (YU et al., 2013). No entanto, a metástase é um processo muito ineficiente no qual
4 poucas células cancerosas disseminadas conseguem sobreviver e proliferar
5 (VANHARANTA; MASSAGUE, 2013). O melanoma possui uma alta capacidade de
6 atingir órgãos distantes e formar metástases, pois é capaz de utilizar mecanismos
7 importantes de evasão do sistema imune e do estresse oxidativo (PISKOUNOVA et
8 al., 2015)

9 O desenvolvimento de metástase é a principal causa de morte em
10 pacientes com melanoma. São esperados nos Estados Unidos da América, em
11 2016, 10.130 mortes em indivíduos diagnosticados com melanoma, esse número
12 corresponde a aproximadamente 13% da quantidade total de casos (SEER, 2016).
13 No Brasil, a quantidade de mortes esperadas para o mesmo ano é de 1.547,
14 correspondendo a aproximadamente 27% do total de casos (INCA, 2016)

15 Segundo o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América,
16 a porcentagem de pacientes com sobrevida relativa em 5 anos, que possuem o
17 melanoma localizado, é de 98,4%. Esse índice decai para 62,4% quando existe o
18 diagnóstico de doença regional (acometimento de linfonodos), e para 17,9% quando
19 há metástase em órgãos distantes. Apesar dos avanços no tratamento e no
20 surgimento de terapias combinadas que abrangem alvos genéticos e imunológicos,
21 o tratamento medicamentoso da doença disseminada permanece com limitações.

22 23 **1.3 Radicais livres e estresse oxidativo**

24
25 Espécies reativas (ER) são moléculas altamente instáveis que ganham ou
26 perdem elétrons e podem interagir e alterar diversos componentes celulares como,
27 DNA, proteínas e lipídios (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Essas espécies
28 podem ser radicais livres, os quais possuem um número ímpar de elétrons (elétrons
29 não pareados) em seu orbital mais externo ou não radicalares, que apesar de sua
30 configuração estável, podem ser precursores de ER (FERREIRA; MATSUBARA,
31 1997). As ER cujo elétron reativo encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou
32 nitrogênio são denominadas Espécies reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies
33 reativas de Nitrogênio (ERN), respectivamente (VOGT et al., 1995).

1 A geração de espécies reativas faz parte de um processo contínuo e
2 fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Em organismos vivos, sob
3 condições aeróbias, mais de 90% do oxigênio consumido é reduzido diretamente à
4 água pela citocromo-oxidase na cadeia transportadora de elétrons, onde uma
5 molécula de oxigênio molecular recebe quatro elétrons, sendo formada água, sem
6 liberação de ERO (OTT et al., 2007). Menos de 10% do oxigênio consumido é
7 reduzido através do recebimento de apenas um elétron, resultando na formação de
8 radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Este radical pode ser reduzido novamente pelo
9 recebimento de mais um elétron concomitante ao aceite de dois prótons, para formar
10 peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um composto não radicalar, mas com alta
11 capacidade de formar ERO (SEMCHYSHYN et al., 2012).

12 O peróxido de hidrogênio pode aceitar mais um elétron e ser dividido em
13 radical hidroxila (HO^{\bullet}) e, na presença de metal de transição, ânion hidroxila (OH^-) e,
14 finalmente, HO^{\bullet} pode interagir com um elétron e uma molécula de próton
15 hydrogenado e formar água. Em sistemas biológicos esta reação é principalmente
16 realizada pela captura de um átomo de hidrogênio de diferentes compostos como
17 proteínas e lipídios que resultam frequentemente na iniciação de reações em
18 cascata. As ERO incluem não somente as citadas acima, mas também diversos
19 peróxidos, como peróxidos lipídicos, proteicos e de ácidos nucleicos
20 (SEMCHYSHYN et al., 2012).

21 São diversas as fontes de ERO em organismos vivos, no entanto, em
22 células eucarióticas, aproximadamente 90% das ERO intracelulares são produzidas
23 pela mitocôndria, sendo que esse número varia amplamente depende do estado
24 fisiológico dos organismos (SKULACHEV, 2012). Outras fontes são o retículo
25 endoplasmático (principalmente através do sistema de hidroxilação representado por
26 enzimas da família do citocromo P450), membranas plasmáticas e celulares, bem
27 como algumas oxidases (LUSHCHAK et al., 2014). Das fontes de geração externas,
28 a radiação UV é a principal (HOLMSTRÖM; FINKEL, 2014).

29 A homeostase redox também é influenciada por ERN como óxido nítrico (NO),
30 peroxinitrito ($ONOO^-$) e compostos relacionados (FERRARI et al., 2011). No entanto,
31 seu papel nesse contexto muitas vezes é negligenciado. O NO pode reagir
32 rapidamente com o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), em uma reação com constante de
33 velocidade estimada em $9 \times 10^9 \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}$. Essa velocidade é 3 a 4 vezes maior do

1 que a sua catálise pela principal enzima antioxidante eliminadora de $O_2^{\bullet-}$, a SOD-
2 Cu,Zn ($2,4 \times 10^9 \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}$).

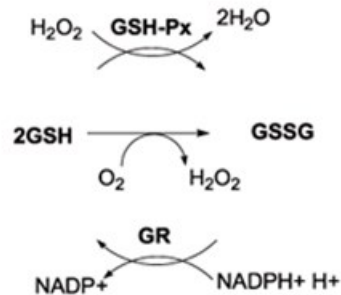
3 O $ONOO^-$ é altamente reativo e responsável pela nitração e nitrosação que
4 desempenham um papel importante no estresse nitrativo e nitrosativo (EN). A
5 nitração ocorre através da reação com resíduos de tirosina e a nitrosação da reação
6 com cisteína (CIPAK GASPAROVIC et al., 2016).

7 O NO é um gás solúvel produzido principalmente pelas células endoteliais,
8 por macrófagos e alguns neurônios. Ele age de forma parácrina nas células-alvo
9 através da guanosina monofostato (GMP), que por sua vez inicia uma série de
10 eventos intracelulares. Como a meia vida do NO *in vivo* é de apenas alguns
11 segundos (menos de 5 segundos), em condições fisiológicas normais ele age
12 somente nas células próximas ao local em que é produzido (DUDZINSKI et al.,
13 2006). Sua síntese se dá a partir da L- arginina pela enzima óxido nítrico sintase
14 (NOS) (ADAM et al., 1999). Existem três tipos diferentes de NOS: neural (nNOS ou
15 NOS1), a induzível (iNOS ou NOS2) e a endotelial (eNOS ou NOS3), que se
16 expressam de diferentes maneiras. A eNOS e a nNOS são expressas
17 constitutivamente em níveis baixos e podem ser ativadas pelo aumento do cálcio
18 intracelular. O influxo de cálcio nas células causa rapidamente a produção de NO. A
19 iNOS varia sua expressão, podendo ser induzida quando os macrófagos e outras
20 células são ativadas por citocinas inflamatórias, endotoxinas, hipóxia ou estresse
21 oxidativo (KUMAR et al., 2005).

22 A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos
23 culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesas antioxidante. Estes têm o
24 objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar os
25 danos decorrentes. Uma das classificações dos antioxidantes se refere ao peso
26 molecular (LUSHCHAK et al., 2014).

27 No grupo que inclui os antioxidantes de baixa massa molecular
28 (normalmente menores que um kilodalton) estão contidos diferentes compostos
29 químicos como o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferóis (vitamina E),
30 carotenoides, polifenóis e ácido úrico. A maioria deles são obtidos através da dieta
31 ou suplementação (LUSHCHAK et al., 2014). Um dos principais antioxidantes desse
32 grupo é a glutathione (tripeptídeo γ -glutamil-cistenil-glicina, GSH), sintetizada pela

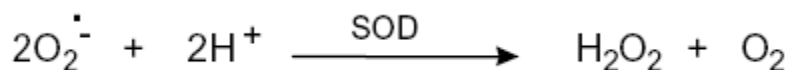
1 maioria dos seres vivos. O sistema glutaciona é composto por enzimas, peptídeos e
2 cofatores que interagem de acordo com a equação a seguir (LUSHCHAK, 2012):



4
5 Reação de oxi-redução da glutaciona.

6
7 A glutaciona é um tripeptídeo que, em sua forma reduzida (GSH), possui
8 um grupamento tiol (SH) capaz de neutralizar moléculas oxidatidantes. Com a
9 transferência de elétrons a espécies oxidativas, ocorre união de duas moléculas
10 oxidadas formando a glutaciona dissulfeto ou glutaciona oxidada (GSSG). Esse
11 processo é facilitado pela enzima glutaciona peroxidase e durante o mesmo, uma
12 molécula de peróxido de hidrogênio é reduzida a água. Fisiologicamente a GSSG
13 pode ser reciclada a GSH, através da enzima glutaciona redutase que é dependente
14 de NADPH (SEDLACK; LINDSAY, 1968).

15 Os antioxidantes de alta massa molecular são amplamente estudados.
16 Seu primeiro membro descrito foi a enzima superóxido dismutase (SOD), em 1969.
17 Sua função é catalisar a dismutação do $\text{O}_2^{\bullet -}$ à H_2O_2 e O_2 , como exemplificado a
18 seguir (MCCORD; FRIDOVICH, 1969):



20
21 Existem três isoformas da enzima SOD, a SOD 1 também conhecida
22 como SOD Cu/Zn, é encontrada no citoplasma; SOD 2, ou SOD Mn se localiza nas
23 mitocôndrias; SOD 3, também Cu/Zn, se localiza no espaço extracelular (ZELKO et
24 al., 2002).

25 O peróxido de hidrogênio formado usualmente é eliminado pela enzima
26 Catalase, que catalisa sua transformação em água e oxigênio molecular, segundo a
27 equação abaixo (AEBI, 1947):

1



2

3

4

5

6

7

8

Essa enzima possui estrutura tetraédrica com um grupo prostético heme em cada uma de suas subunidades, ligados fortemente ao NADPH, o qual não parece ser essencial para a conversão enzimática de H_2O_2 em H_2O e O_2 , mas protege a catalase contra inativação por H_2O_2 . A enzima é encontrada preferencialmente acondicionada em peroxissomos, mas pequenas quantidades podem ser encontradas nas mitocôndrias (PUTNAM et al., 2000).

9

10

11

12

13

14

15

16

17

A homeostase de ER é finamente mantida pelo sistema antioxidante endógeno e exógeno, assim como por estratégias celulares que diminuem sua produção. No entanto sob certas circunstâncias esse controle pode ser quebrado, dando início a um estado conhecido por estresse oxidativo e/ou nitrosativo. Entre suas causas, estão o aumento do nível de compostos endógenos e exógenos que sofrem auto-oxidação produzindo ERO/ERN, esgotamento de reservas de antioxidantes, inativação de enzimas antioxidantes, diminuição da produção de enzimas antioxidantes e antioxidantes de baixa massa molecular, ou até mesmo a combinação de dois ou mais fatores (LUSHCHAK et al., 2014).

18

19

20

21

22

23

24

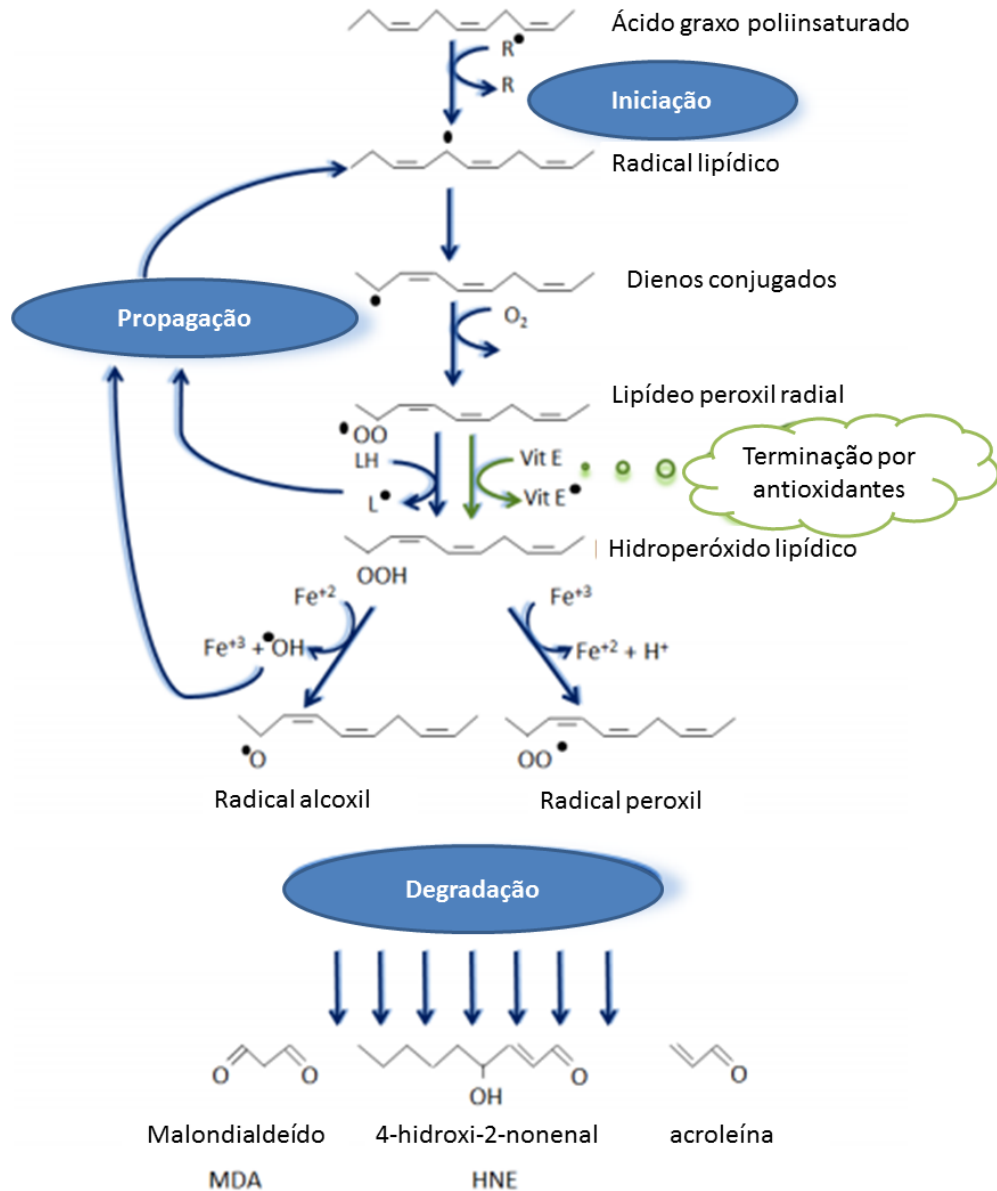
As espécies reativas podem interagir com proteínas, lipídeos e DNA. Todos os componentes celulares são susceptíveis a ação das ERO/ERN, no entanto, a membrana celular é um dos mais atingidos, levando à peroxidação lipídica, com alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas (MELLO FILHO et al., 1983). Consequentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, podendo levar a morte celular (HERSHKO, 1989).

25

26

27

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes:



1
 2 **Figura 1:** Cascata de reações da lipoperoxidação (adaptado de CIPAK
 3 GASPAROVIC et al., 2016).

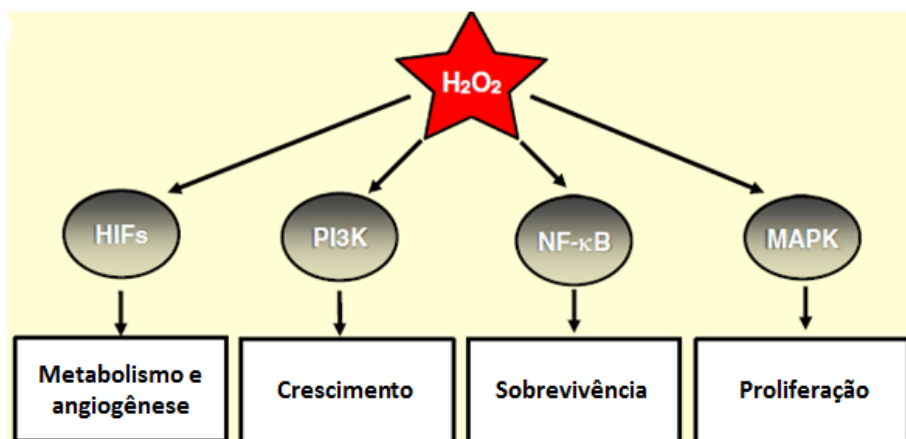
4
 5 A reação se inicia quando ocorre o sequestro do hidrogênio do ácido
 6 graxo polinsaturado (LH) da membrana celular. Tal sequestro pode ser realizado
 7 pelo OH^\bullet ou pelo LO^\bullet (radical alcóxila), com conseqüente formação do L^\bullet (radical
 8 lipídico). Na primeira equação de propagação, o L^\bullet reage rapidamente com o O_2 ,
 9 resultando em LOO^\bullet (radical peroxila), que, por sua vez, sequestra novo hidrogênio
 10 do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o L^\bullet na segunda equação de
 11 propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais (L^\bullet e LOO^\bullet)

1 produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem-se a si próprios.
2 (GARDÈS-ALBERT et al, 1991).

3 Os aldeídos são a classe mais relevante de produtos de peroxidação
4 lipídica em termos quantitativos. As carbonilas formadas durante a peroxidação
5 lipídica compostos por várias subclasses incluindo n-alquenais, 2-alquenais, 2,4-
6 alcadienais, alcatrienais, hidroxialcenais, Hidroxilperoxi-alquenais, α -dicarbonilas,
7 alcanos, alcenos e cetonas. As principais carbonilas produzidas durante a
8 peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados são o malondialdeído (MDA), hexanal,
9 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), e 2-propenal (acroleína) (HERMES-LIMA, 2004).

10 ERO normalmente estão associadas com o princípio deletério do estresse
11 oxidativo, no entanto, nas duas últimas décadas, tornou-se aparente que elas
12 também servem como moléculas de sinalização que regulam processos biológicos e
13 fisiológicos (FINKEL, 2011). Parece que com a evolução, a natureza selecionou
14 ERO como um mecanismo de sinalização da transdução de sinal para permitir a
15 adaptação às mudanças ambientais em um ambiente oxidativo (WOOD et al., 2003).
16 De fato, em procarionatas, existem mecanismos bem descritos onde as ERO ativam
17 diretamente os fatores de transcrição para adaptação ao estresse (KILEY; STORZ,
18 2004).

19 O peróxido de hidrogênio é uma ERO conhecida e além de seu papel
20 como agente lesivo, é requerido para a ativação de algumas vias de transdução de
21 sinal (figura 2) como na ativação de HIFs, que regulam metabolismo e angiogênese,
22 na interação com proteínas da via da PI3K, culminando em crescimento celular, na
23 ativação de NF- κ B que está envolvido com sobrevivência celular, e finalmente com a
24 via das MAP quinases, favorecendo a proliferação (SCHIEBER; CHANDEL, 2014).



1 **Figura 2:** ERO como reguladora de vias de transdução de sinal. (adaptado de
2 SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

3
4 De forma geral, parece que em grandes quantidades as espécies reativas
5 podem causar dano celular, principalmente quando interagem com proteínas,
6 lipídeos e DNA celulares. Em menor quantidade, elas ativam vias de transdução de
7 sinal modificando o metabolismo, proliferação, crescimento e morte celular.

8 9 **1.4 Melanina**

10
11 Os melanócitos possuem estruturas denominadas melanossomos,
12 responsáveis pela síntese e armazenamento da melanina. A enzima limitante da
13 taxa de síntese da melanina é a tirosinase, que oxida o aminoácido L-tirosina
14 produzindo dopa. A dopa é convertida a dopaquinona, uma ortoquinona específica
15 que pode reagir com compostos nucleofílicos tais como tióis ou grupos amino. Essa
16 atividade catalítica da tirosinase leva a produção de anion superóxido ($O_2^{\bullet-}$).
17 (TOMITA et al., 1984; KOGA et al., 1992).

18 Dopaquinona é convertida em dopacromo através de uma troca redox
19 seguida de descarboxilação espontânea onde o dopacromo gera 5,6-Dihidroindol
20 (5,6-DHI) e posteriormente é oxidado em indole quinona produzindo peróxido de
21 hidrogênio (H_2O_2). Dopacromo também pode sofrer tautomerização pela proteína
22 tirosinase 2 (TRP2) e produzir ácido dihidroxindol carboxílico (5,6-DHICA), este
23 composto é então convertido a uma quinona correspondente resultando na formação
24 do principal polímero de melanina, a eumelanina que apresenta coloração marrom
25 (MICHARD et al., 2008).

26

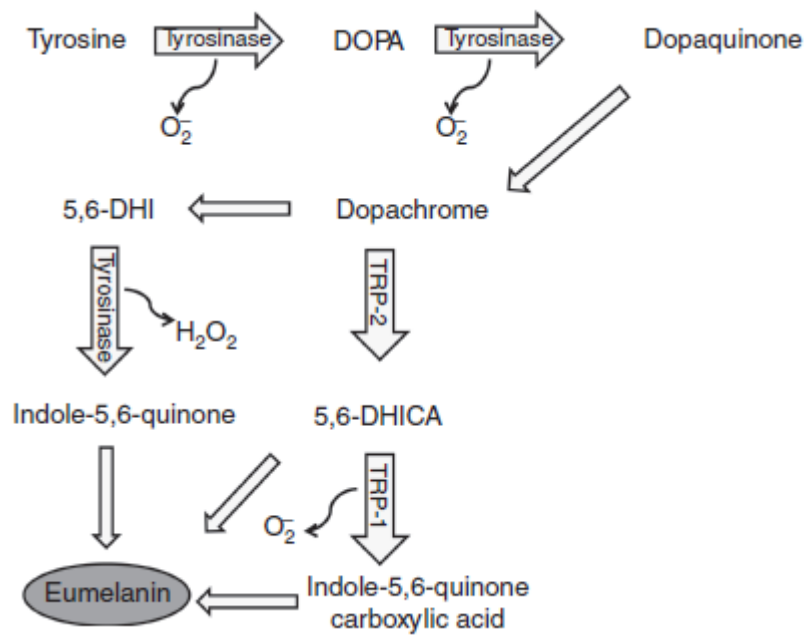


Figura 3: Etapas da síntese de melanina (adaptado de DENAT et al, 2014).

Por um lado, a síntese dos intermediários da melanina produz ERO, por outro, a enzima TRP2 protege a célula contra o estresse oxidativo aumentando os níveis de glutathiona e reduzindo a toxicidade de quinonas e danos ao DNA induzido por radicais livres (MICHARD et al., 2008). Além dos efeitos indiretos, a melanina encontra-se na posição supranuclear, protegendo o núcleo dos queratinócitos contra danos oxidativos causados pela radiação UV, atuando como barreira física e diminuindo a absorção da irradiação UV (GILCHREST et al., 1999), e também possui propriedades de scavenger de ERO (MEREDITH; SARNA, 2006).

Alguns autores têm relacionado da presença da melanina a um pior prognóstico e maior desenvolvimento de metástases. Urbanska e colaboradores (2000) reportaram uma correlação positiva entre melanização e agressividade em melanoma ocular. Brozyna e colaboradores (2013), observaram que pacientes com melanoma em estágios III e IV, com tumor primário melanizado e metástases linfonodais melanizadas, exibiram uma diminuição significativa no tempo livre de doença e sobrevida global em comparação a melanomas com ausência ou pouca melanização. Shields e colaboradores (2015) analisaram características clínicas e fatores prognósticos de um grande número de pacientes com melanoma ocular e demonstraram que a presença de melanina está relacionada a um maior risco de metástases e morte.

1 Em 2015 foi publicado um estudo sobre a indução da melanogênese em
2 linhagens celulares de melanoma humanas e de hamsters amelanóticas. Com o
3 aumento da produção deste pigmento, foram evidenciados alterações no estado
4 metabólico das células e no seu comportamento tanto em níveis bioquímicos como
5 em níveis moleculares, podendo estes fatores estarem envolvidos com o aumento
6 da agressividade e malignidade do tumor (SLOMINSKI et al., 2015). No entanto, são
7 necessários novos estudos para se entender o papel do aumento da produção de
8 melanina sobre as características tumorais do melanoma.

10 **1.5 Estresse oxidativo no melanoma**

11
12 As ERO possuem dois diferentes potenciais de ação sobre a célula,
13 sendo considerado como pró-cancerígenas ou supressores tumorais. Por um lado,
14 elas podem causar danos ao DNA favorecendo o aparecimento e a perpetuação de
15 uma mutação promovendo tanto a iniciação como a progressão tumoral. Porém,
16 dependendo da quantidade de ERO, o tipo do estímulo e o tipo de célula, elas
17 podem promover estase do ciclo celular, senescência, apoptose, necrose ou outros
18 tipos de morte (HALLIWEL, 2007).

19 A participação das ERO na fisiopatologia do câncer é bem relatada na
20 literatura, porém seu papel na fisiopatologia do melanoma ainda não está totalmente
21 claro. Diversos estudos sugerem que o estresse oxidativo esteja envolvido em todas
22 as fases de desenvolvimento deste tipo de câncer, sendo altamente associado à
23 transformação da célula normal em célula cancerosa, além de participar da
24 proliferação e disseminação de células malignas (GADJEVA et al., 2008).

25 Sander e colaboradores (2003) analisaram biópsias de melanoma e
26 observaram que essas células possuíam um aumento de um marcador de
27 lipoperoxidação, o MDA, acompanhado de aumento de Catalase, SOD Mn e SOD
28 Cu/Zn. Hambright e colaboradores (2015) demonstraram que células de melanoma
29 apresentam um fenótipo de estresse oxidativo em comparação com melanócitos
30 normais, evidenciado pelo aumento de ERO totais, aumento na atividade da via
31 KEAP1 / NRF2, maior dano a proteínas e glutatona oxidada elevada. Bernardes e
32 colaboradores (2015) encontraram maior quantidade de 3-nitrotirosina, um marcador
33 de estresse nitrosativo, em biópsias tumorais de melanoma em pacientes

1 diagnosticados com tumores cutâneos diagnosticados com maior espessura e pior
2 prognóstico.

3 Esse aumento pronunciado de estresse oxidativo observado em tumores
4 primários de melanoma pode ser o responsável pela falta de sucesso em sua
5 terapia. Melanossomas transformados geram altas quantidades de ERO que
6 favorecem o dano celular, ao mesmo tempo em que aumentam sua capacidade
7 antioxidante (SANDER et al., 2003). Além disso ativam vias de transdução de sinal
8 que previnem a morte celular e estão envolvidos com resistência a quimioterapia
9 (FRUEHALF; TRAPP, 2007). O gene supressor tumoral p53 é altamente sensível a
10 alterações redox, suas funções incluem a parada do ciclo celular quando são
11 detectados danos ao DNA através da regulação positiva de p21, indução de
12 apoptose via regulação positiva de BAX, e supressão da angiogênese via super-
13 regulação de trombospondina-1, um inibidor endógeno da formação de novos vasos
14 (SEKULIC et al., 2008).

15 Como mencionado anteriormente, o maior número de óbitos em pacientes
16 com melanoma é decorrente de metástases. Piskounova e colaboradores (2015)
17 analisaram diferenças nas células encontradas no tumor primário, no momento em
18 que estão na corrente sanguínea e quando estão crescendo no foco metastático.
19 Observaram que estas células sofrem mudanças e adaptações reversíveis durante
20 esse processo. Células de melanoma no sítio metastático possuem maiores níveis
21 citoplasmáticos e mitocondriais de ERO e quando estão na corrente sanguínea,
22 possuem mecanismos que a permitem gerar menores quantidades de ERO.

23 O corpo humano utiliza-se de diversas estratégias para conter o
24 desenvolvimento de metástases, uma delas é o aumento do estresse oxidativo
25 sistêmico na tentativa de induzir a morte celular. Gal e colaboradores (2015) e
26 Piskounova e colaboradores (2015) relataram que o uso do antioxidante N-
27 acetilcisteína favorece o processo metastático constatando que a habilidade das
28 células em entrar na corrente sanguínea e permanecerem viáveis, dependem de sua
29 capacidade em resistir ao estresse oxidativo sistêmico. Piskounova e colaboradores
30 (2015) também demonstraram que células de melanoma são capazes de aumentar
31 sua capacidade antioxidante, através da modulação de vias bioquímicas que
32 aumentam a geração de NADPH, o qual participa da regeneração de GSH, além
33 disso quando estão em circulação, essas células reduzem sua função mitocondrial e

1 dessa forma diminuem a geração de ERO intracelular, sendo mais um mecanismo
2 de evasão ao estresse oxidativo e implantação em órgãos distantes

3 Trabalhos recentes do nosso laboratório mostram maiores níveis de EO
4 em pacientes com melanoma cutâneo (BERNARDES et al., 2015) e aumento da
5 capacidade antioxidante total e tiós totais em pacientes com melanoma
6 metastático(BERNARDES et al., 2016). Conhecendo a ampla participação do
7 estresse oxidativo (EO) no melanoma, podem-se estudar novas estratégias
8 terapêuticas e buscar marcadores de prognóstico para a doença.

10 **1.6 Modelo experimental de melanoma murino**

11
12 O estudo de diversas condições patológicas se apoia no manuseio de
13 modelos experimentais. Nesse contexto, modelos animais contribuem para melhor
14 entendimento da fisiopatologia de uma doença e também são úteis como ferramenta
15 para testar novos e potenciais tratamentos.

16 Como modelo experimental para melanoma, uma linhagem amplamente
17 utilizada nos laboratórios é a linhagem F10 do melanoma B16, que é altamente
18 agressiva e que possui grande capacidade de gerar metástase pulmonar (MENON et
19 al., 1995).

20 As células B16F10 foram obtidas por Fidler e Nicolson (1973)
21 selecionando as com maior capacidade de colonizar os pulmões a partir de uma
22 variante parental menos metastática. Para o procedimento, uma linhagem não
23 selecionada de melanoma murino, B16, foi colhida de um tumor subcutâneo primário
24 de um camundongo C57BL/6 e reproduzidas em meio de cultura (linhagem B16-F0).
25 Posteriormente, foram inoculadas por injeção endovenosa em camundongos
26 C57BL/6. Quando se observou a presença de nódulos nos pulmões (confirmado
27 pela presença de melanina), as células foram removidas para meio de cultura. Essa
28 linhagem que se desenvolveu no meio de cultura após a primeira inoculação *in vivo*
29 foi denominada B16-F1. Então, essas células foram colhidas e novamente
30 inoculadas via endovenosa em um novo grupo de animais no qual, posteriormente,
31 os novos nódulos formados nos pulmões foram removidos e novamente cultivados,
32 gerando a linhagem B16-F2. Esse ciclo foi repetido até se chegar nas linhagens
33 mais agressivas e com maior capacidade de invasão e metástase (B16F10).

1 Sendo apresentado todo contexto fisiopatológico do melanoma, bem
2 como os resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, este trabalho se insere
3 dentro de uma ótica de continuidade do estudo do melanoma, sendo a compreensão
4 do estado metastático quanto às alterações oxidativas sistêmicas e no
5 microambiente tumoral, processos chave para se desenhar uma terapêutica mais
6 eficaz e com maiores índices de sucesso, bem como melhor entendimento da
7 patogenia do melanoma.

8

9

10

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as mudanças no status oxidativo/nitrosativo sistêmico e no microambiente tumoral durante a progressão da metástase pulmonar experimental de melanoma.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as alterações sistêmicas em parâmetros pró e antioxidantes durante a instalação e progressão da metástase experimental de melanoma murino;
- Avaliar as alterações em parâmetros pró e antioxidantes no pulmão, principal foco metastático acometido pela inoculação endovenosa de células de melanoma murino B16F10;
- Verificar a presença de marcadores no microambiente tumoral tipicamente encontrados em células anaplásicas e que indicam angiogênese (VEGF) e proliferação (PCNA) e relacioná-los ao status redox.
- Analisar a influência do aumento da produção de melanina *in vitro*, sob a proliferação e estresse oxidativo de células de melanoma murino B16F10.

1 **3 HIPÓTESE**

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

Alterações no status redox em nível sistêmico e no microambiente tumoral facilitam a instalação e progressão da metástase pulmonar experimental de melanoma murino.

4 PRINCIPAIS RESULTADOS

1. Em nível sistêmico ocorre um desbalanço oxidativo no início da doença, evidenciado pelo aumento da lipoperoxidação plasmática no grupo 3 dias, e ao longo da progressão esse EO diminui pelo aumento de antioxidantes nos grupos 7 dias (quantidade de GSH e atividade da catalase eritrocitárias), 14 dias (capacidade antioxidante total plasmática, quantidade de GSH e atividade da catalase eritrocitárias) e 21 dias (capacidade antioxidante total plasmática e atividade da catalase eritrocitária).
2. No microambiente tumoral observamos uma diminuição nos níveis de LPO no grupo 3 dias e progressivo aumento no desequilíbrio redox evidenciado por aumento na marcação de 3-Nitrotirosina que acompanha o desenvolvimento de nódulos metastáticos e diminuição de antioxidantes nos grupos 14 dias (quantidade de GSH) e 21 dias (quantidade de GSH e capacidade antioxidante total).
3. A análise dos marcadores típicos de células anaplásicas, por imunohistoquímica, evidenciou um aumento progressivo nos marcadores de angiogênese (VEGF) e proliferação celular (PCNA), que acompanha o aumento de estresse nitro-oxidativo.
4. Observamos que células com estímulo na produção de melanina proliferam mais em 48 horas, do que as células sem estímulo, e essa característica está acompanhada de aumento na capacidade antioxidante total, na atividade da catalase e na quantidade de GSH.

5 CONCLUSÃO

Com a progressão da metástase de melanoma ocorre, em nível sistêmico, uma diminuição do dano oxidativo e aumento de antioxidantes. Por outro lado, no microambiente tumoral observamos um aumento no perfil pro-oxidante e diminuição dos antioxidantes que alteram o equilíbrio redox local. A produção de melanina contribui com a geração de espécies reativas ao mesmo tempo em que aumenta a capacidade antioxidante da célula tumoral *in vitro*. Este comportamento favorece a sinalização para proliferação e crescimento do tumor, observado como focos metastáticos nos pulmões a partir do dia 7.

Dessa forma, este trabalho contribui para a compreensão de estratégias do melanoma usado para superar as defesas do hospedeiro contra a metástase, fornecendo dados importantes sobre a patogenia desse processo.

1 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2

Adam, L; Bouvier, M; Jones, T.L.Z. Nitric oxide modulates β 2-adrenergic receptor palmitoylation and signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 37, p. - 26343, 1999.

American Cancer Society (2016) Cancer Facts & Figures 2012. American Cancer Society. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/sunanduvexposure/skin-cancer-facts>. Acessado em 15 julho de 2016.

Bernardes, S. S., de Souza-Neto, F. P., Melo, G. P., 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. 1, n. 9, 2016.

Bernardes, S. S., de Souza-Neto, F. P., Ramalho, L. N. Z., Derossi, D. R., Guarnier, F. A., da Silva, C. F. N., ... & 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.

Bevona, C., Goggins, W., Quinn, T., Fullerton, J., & Tsao, H. Cutaneous melanomas associated with nevi. **Archives of dermatology**, v. 139, n. 12, p. 1620-1624, 2003.

Brozyna A. A., Jozwicki W., Carlson J.A., Slominski A.T. Melanogenesis affects overall and disease-free survival in patients with stage III and IV melanoma. **Human pathology**, v. 44, n. 10, p. 2071-2074, 2013.

Chamberlain, A., & Ng, J. (2009). Cutaneous melanoma: Atypical variants and presentations. **Australian family physician**, v. 38, n. 7, p. 476, 2009.

Chu, D. H. Overview of Biology, development and structure of skin. In: Wolff, K.; Goldsmith, L. A.; Katz, S. I.; Gilchrist, B. A.; Paller, A. S.; Leffell, D. J (Eds). **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. 7th edition. New-York: McGraw-Hill, p. 57-72, 2008.

Cipak Gasparovic, A., Zarkovic, N., Zarkovic, K., Semen, K., Kaminsky, D., Yelisyeyeva, O., & Bottari, S. P. Biomarkers of oxidative and nitro-oxidative stress: conventional and novel approaches. **British Journal of Pharmacology**, 2016.

Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., ... & Davis, N. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 892, p. 949-954, 2002.

de Snoo, Femke A., and Nicholas K. Hayward. "Cutaneous melanoma susceptibility and progression genes." **Cancer letters** v. 230, n. 2, p. 153-186, 2005

Denat, L., Kadekaro, A. L., Marrot, L., Leachman, S. A., & Abdel-Malek, Z. A. Melanocytes as instigators and victims of oxidative stress. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 6, p. 1512-1518, 2014.

Detmar, M., Brown, L. F., Berse, B., Jackman, R. W., Elicker, B. M., Dvorak, H. F., & Claffey, K. P. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 108, n. 3, p. 263-268, 1997.
Dudzinski, David M., et al. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** V. 46, p. 235-276, 2006.

Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M., & Dvorak, A. M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **The American journal of pathology**, v. 146, n. 5, p. 1029, 1995.

Erhard, H., Rietveld, F. J., van Altena, M. C., Bröcker, E. B., Ruiter, D. J., & de Waal, R. M. Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. **Melanoma Research**, v. 7, p. S19-S26, 1997.

Fernandes, N. C., Calmon, R., Maceira, J. P., Cuzzi, T., & da Silva, C. S. C. Melanoma cutâneo: estudo prospectivo de 65 casos Cutaneous melanoma: prospective study of 65 cases. **An bras dermatol**, v. 80, n. 1, p. 25-34, 2005.

Ferrara, Napoleone, and Kari Alitalo. "Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors." **Nature medicine** v. 5, n. 12, 1999.

Ferrari, C. K., Souto, P. C., França, E. L., & Honorio-França, A. C. Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: from effective defense to immunity evasion mechanisms. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 59, n. 6, p. 441-448, 2011.

Ferreira, A. L. A.; Matsubara, A. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

Fidler IJ, Nicolson GL. Organ selectivity for implantation survival and growth of b16 melanoma variant tumor lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 57, p. 1199-1202, 1973.

Finkel, Toren. "Signal transduction by reactive oxygen species." **The Journal of cell biology** v. 194, n. 1, p. 7-15, 2011.

Fruehauf, John P., and Valerie Trapp. Reactive oxygen species: an Achilles' heel of melanoma? **Expert review of anticancer therapy**, v. 8, n. 11, p. 1751-1757, 2008.

Gadjeva, V., A. Dimov, and N. Georgieva. Influence of therapy on the antioxidant status in patients with melanoma. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 33, n. 2, p. 179-185, 2008.

Gal, L.K., Ibrahim, M.X., Wiel, C., Sayin, V.I., Akula, M.K., Karlsson, C., Dalin, M.G., Akyurek, M.L., Lindahl, P., Nilsson, J., Bergo, M.O.B. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. **Science translational medicine**, v. 7, n. 308, 2015.

Gardès-Albert M, Jore D, Ferradini C. Membrane lipid peroxidation: pulse and g-radiolysis in oxyradical research. In Vigo- Pelfrey C (ed): **Membrane lipid oxidation**. 1th ed. Santa Clara, CRC Press, 2-301991.

Gilchrest, B. A.; Eller, M. S.; Geller, A. C.; Yaar, M. Mechanisms of disease: The Pathogenesis of Melanoma Induced by Ultraviolet Radiation. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 17, p. 1341-1348, 1999.

Ghosh, Papia, and Lynda Chin. Genetics and genomics of melanoma. **Expert review of dermatology**, v. 4, n. 2, p. 131-143, 2009.

Guedes, A.C.N. Pele e anexos. In: Filho G.B., Ed. **Bogliolo Patologia**, 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. **Free Radicals Biology & Medicine**. 4th ed. New York: Oxford University Press, 2007.

Halliwell, Barry. Oxidative stress and cancer: have we moved forward?. **Biochemical Journal**, v. 401, n. 1, p. 1-11, 2007.

Hermes-Lima, Marcelo. "Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals." **Functional metabolism: Regulation and adaptation** v.1, p. 319-66, 2004.

Hershko, Ch. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in hematology**, v. 26, n. 4, 1989.

Holmstrom, K. M., and Toren Finkel. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 6, p. 411-421, 2014

INCA - Instituto Nacional do Câncer, Brasil. **Estimativa 2016 de Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/> Acessado em: 17 de junho de 2016

Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos. Disponível em: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html> Acessado em 16 de julho de 2016.

Kiley, Patricia J., and Gisela Storz. Exploiting thiol modifications. **PLoS Biol** v. 2, n. 11, p. 400, 2004.

Koga, Satoshi, Minoru Nakano, and Shozo Tero-Kubota. Generation of superoxide during the enzymatic action of tyrosinase. **Archives of biochemistry and biophysics** v. 292, n. 2, p. 570-575, 1992.

Kumar. V.; Abbas. A.K.; Fausto. N. Inflamação Aguda e Crônica. Robbins e Contran Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 7^a ed. Rio de Janeiro, **Elsevier Editora Ltda**, p. 74-75, 2005.

Leber, Mathias Felix, and Thomas Efferth. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). **International journal of oncology**, v. 34, n. 4, p. 881, 2009

Lederman, Josiane S., and Arthur J. Sober. Does biopsy type influence survival in clinical stage I cutaneous melanoma?. **Journal of the American Academy of Dermatology** v. 13, n. 6, p. 983-987, 1985.

Lushchak, Volodymyr I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-biological interactions** v. 224, p. 164-175, 2014.

Lushchak, Volodymyr I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions, **Journal of amino acids**, 2012.

Marcoval, J., Moreno, A., Graells, J., Vidal, A., Escribà, J. M., Garcia-Ramirez, M., & Fabra, A.. Angiogenesis and malignant melanoma. Angiogenesis is related to the development of vertical (tumorigenic) growth phase. **Journal of cutaneous pathology**, v. 24, n. 4, p. 212-218, 1997

MCCORD, Joe M.; FRIDOVICH, Irwin. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

Mello Filho, A. C., M. E. Hoffmann, and R. Meneghini. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**, v. 218, n. 1, p. 273-275, 1984

Menon, L. G.; Kuttan, R.; Kuttan, G. Inhibition of Lung metastasis by in mice induced by B16/F10 melanoma cells by polyphenolic compounds. **Cancer Letters**, n. 95, p. 221-225, 1995

Meredith P, Sarna T. The physical and chemical properties of eumelanin. **Pigment Cell Res**, v. 19, p. 572–594,2006.

Meyskens Jr, F. L., Farmer, P. J., Yang, S., & Anton-Culver, H. New perspectives on melanoma pathogenesis and chemoprevention. **Cancer Prevention**, p. 191-195, 2007.

Michard, Q., Commo, S., Belaidi, J. P., Alleaume, A. M., Michelet, J. F., Daronnat, E. & Bernard, B. A TRP-2 specifically decreases WM35 cell sensitivity to oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 6, p. 1023-

1031, 2008.

Miller, A.J.; Mihm, M. C. Jr. Mechanism of disease: Melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 355. n.1, p.51-65, 2006.

Organização mundial da Saúde, 2016. Em:
<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>. Acessado em 15 julho de 2016.

Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**, v. 12, n. 5, p. 913-922, 2007.

Palmieri, G., Capone, M., Ascierto, M. L., Gentilcore, G., Stroncek, D. F., Casula, M., & Ascierto, P. A. Main roads to melanoma. **Journal of translational medicine**, v. 7, n. 1, p. 86, 2009.

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.

Putnam, C. D., Arvai, A. S., Bourne, Y., & Tainer, J. A. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. **Journal of molecular biology**, v. 296, n. 1, p. 295-309, 2000.

Sander, C. S., Hamm, F., Elsner, P., & Thiele, J. J. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. **British Journal of Dermatology**, v. 148, n. 5, p. 913-922, 2003.

Schieber, Michael, and Navdeep S. Chandel. "ROS function in redox signaling and oxidative stress." **Current Biology** v. 24, n. 10, p.453-462, 2014.

Sedlak, Jozef, and Raymond H. Lindsay. "Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent." **Analytical biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

Sekulic, A., Haluska, P., Miller, A. J., De Lamo, J. G., Ejadi, S., Pulido, J. S., ... & Pockaj, B. A. (2008, July). Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. In **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 7, p. 825-846, 2008.

Semchyshyn, Halyna M., and Liudmyla M. Lozinska. "Fructose protects baker's yeast against peroxide stress: potential role of catalase and superoxide dismutase." **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 7, p. 761-773, 2012.

Shields CL, Kaliki S, Cohen MN, Shields PW, Furuta M, Shields JA. Prognosis of uveal melanoma based on race in 8100 patients: The 2015 Doyne Lecture. **Eye** v. 29, p. 1027–1035, 2015.

Skulachev, Vladimir P. Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 28,

n. 2, p. 283-289, 2012

Slominski RM, Zmijewski MA, Slominski AT. The role of melanin pigment in melanoma. **Exp Dermatol**, v. 24, p. 258–259, 2015

Smith, S. H., M. H. Goldschmidt, and P. M. McManus. A comparative review of melanocytic neoplasms. **Veterinary Pathology Online**, v. 39, n. 6, p. 651-678, 2002.

Streit, Michael, and Michael Detmar. Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3172-3179, 2003

Tomita, Y., Hariu, A., Kato, C., & Seiji, M. Radical production during tyrosinase reaction, dopa-melanin formation, and photoirradiation of dopa-melanin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 82, n. 6, p. 573-576, 1984.

Urbanska K, Romanowska-Dixon B, Elas M, Pajak S, Paziewski E, Bryk J, Kukielczak B, Slominski A, Zygulska-Mach H, Lukiewicz S. Experimental ruthenium plaque therapy of amelanotic and melanotic melanomas in the hamster eye. **Melanoma Res**.v. 10, p. 26–35, 2000.

Vanharanta, Sakari, and Joan Massagué. "Origins of metastatic traits." **Cancer cell**, v. 24, n. 4, p. 410-421, 2013.

Vogt, W. Oxidation of methionyl residues in proteins: Tools, targets, and reversal. **Free Radical Biology and Medicine**. v.18, n. 1, p.93-105, 1995.

Wiley, H. E., Gonzalez, E. B., Maki, W., Wu, M. T., & Hwang, S. T. Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 21, p. 1638-1643, 2001.

Wood, Zachary A., Leslie B. Poole, and P. Andrew Karplus. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. **Science**, v. 300, n. 5619, p. 650-653, 2003.

Yu, M., Bardia, A., Wittner, B. S., Stott, S. L., Smas, M. E., Ting, D. T.,... & Conannon, K. F. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. **Science**, v. 339, n. 6119, p. 580-584, 2013.

Zelko, Igor N., Thomas J. Mariani, and Rodney J. Folz. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 3, p. 337-349, 2002.

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

APÊNDICE

11

12

13

14

15

16

17

18

19

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

APÊNDICE A

Artigo Científico

Tumor microenvironment and systemic oxidative and nitrosative stress during the progression of melanoma pulmonary metastasis: understand to treat.

Gabriella Pasqual Melo^{a,b}, Sara Santos Bernardes^a, Fernando Pinheiro Souza-Neto^{a,b}, Iriana Moratto Carrara^{a,b}, Leandra Z. N. Ramalho^c, Rodrigo Cabral Luiz^a, Rubens Cecchini^b & Alessandra Lourenço Cecchini^a

^a *Laboratory of Molecular Pathology, State University of Londrina, Brazil.*

^b *Laboratory of Pathophysiology and Free Radicals, State University of Londrina, Brazil.*

^c *Departament of Patology and Legal Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.*

Corresponding author: Alessandra Lourenço Cecchini Armani

Email: alcecchini@uel.br

Fax: +55 (43) 3371 42 67

Phone: +55 (43) 3371 45 29

Laboratory of Molecular Pathology, State University of Londrina, Brazil

State University of Londrina. Road Celso Garcia Cid, PR-445, km 380, University Campus, 86051-990 Londrina, PR, Brazil

1
2 Abstract

3
4 Melanoma is the most serious of skin cancers due to its high invasive ability. Since
5 redox imbalance can modulate cellular behavior, influencing host response as well as
6 tumor growth. Therefore knowing that melanoma is a cancer highly sensitive to these
7 changes at the systemic level and in the tumor microenvironment, it becomes
8 important to know the phenomena Nitro-oxidative factors involved in the onset and
9 progression of melanoma metastasis. B16F10 murine melanoma cells were cultured
10 in 10% SFB DMEM and inoculated 10^5 viable cells in 50 μ l of serum-free DMEM in
11 male C57BL/6 mice (8-12 weeks), intravenous ophthalmic plexus. The control group
12 received 50 μ L of serum-free DMEM. The mice were submitted to euthanasia after 3,
13 7, 14 or 21 days, and the groups named M3, M7, M14 and M21 respectively, with
14 n=8. The lung was removed and metastatic nodules were counted. The mean lobe of
15 the right lung was separated for paraffin inclusion and subsequent
16 immunohistochemical analysis (VEGF, PCNA and 3-NT), the remainder was stored
17 at -80 ° C. Whole blood was collected by cardiac puncture and plasma and
18 erythrocytes separated, the first one stored at -20°C and the second one in alsever
19 buffer at 8°C. Were made systemic and lung analyzes of pro-oxidant parameters (QL
20 and MDA) and antioxidants parameters (Catalase, GSH and TRAP). Statistical
21 differences were evaluated by One-Way ANOVA following Tukey's post-hoc testing.
22 In order to analyze the tumor cell *in vitro* without systemic or other cells influence, we
23 evaluated *in vitro* oxidative stress parameters (MDA, Catalase, GSH and TRAP) in
24 B16F10 cells and the same ones with stimulation of melanin production (L-tyrosine
25 1700 μ M/L and NH₄Cl 10mM/L, in DMEM 10% FBS). A proliferation curve was made
26 after 24 and 48 hours of culture and analyzes of oxidative stress after 48 hours.
27 Statistical analysis was performed with Two-Way ANOVA following Tukey's post-hoc
28 testing, to evaluate proliferation and unpaired Student's t-test for oxidative stress
29 parameters ($p < 0.05$ considered significant). There is an increase in plasma lipid
30 peroxidation at the earliest stage of the disease, with a progressive decrease in
31 oxidative damage and an increase in antioxidant defenses. In contrast, we observed
32 in the tumor microenvironment an increase in lipid peroxidation and 3-NT labeling as
33 the metastatic nodules increase, with decreasing antioxidants and progressive
34 increase of VEGF as angiogenic signaling and PCNA as a sign of proliferation. *In*
35 *vitro* proliferation increased after 48 hours in melanin-producing cells with increased
36 antioxidant TRAP, Catalase and GSH, in the same group. Thus, we can conclude
37 that increased redox unbalance in the bloodstream favors tumor progression, while
38 reduction of tissue redox balance, caused in part by melanin production, favors
39 signaling for melanoma cell proliferation and tumor growth, while increasing melanin
40 provides antioxidant protection for the tumor cell.

41
42 **Keywords:** Melanoma, Systemic metastasis, Oxidative Stress, Nitrosative Stress.,
43 Antioxidant System.

44
45
46
47

1. Introduction

Cutaneous melanoma is the most dangerous form of skin cancer and originates from melanocytes. According to the World Health Organization, about 132,000 new cases of malignant melanoma are diagnosed globally each year and this number seems to be increasing (OMS, 2015). This cancer is a highly curable in early stages but unfortunately holds serious consequences when metastasis develops with 5-year survival rate from 98.4% for tumor diagnosis located, 62.4% for patients with regional disease and to only 17.9% for metastatic melanoma (U.S. National Cancer Institute, 2016). Although skin cancer is the most prevalent in Brazil, corresponding 30% of all malignant cancer, melanoma index only to 3% of cutaneous malignant neoplasia. Despite its low incidence, melanoma is very harmful because of the high chance of metastasis.

Malignant melanoma is a cancer known to be sensitive to changes in redox status. The main environmental factor involved in the genesis and development of this type of cancer is ultraviolet (UV) radiation (Brash et al., 2015), which has the capacity to alter the redox unbalance in the skin (Terra et al., 2012) and at the systemic level (Carrara et al., 2016). The UV injury signature is the presence of cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) which are DNA photoproducts produced after UV exposure, and is usually found in melanoma cells (Brash et al., 2015). In addition, melanin production leads to reactive oxygen species (ROS) generation with production of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2), altering redox status (Gadjeva et al., 2008; Fruehauf & Trapp, 2008).

Excessive amounts of reactive species (RS) can damage DNA, proteins or disturbance of membrane integrity and when the damage to the cell is too high, it will enter apoptosis, thus, oxidative stress may help stop the growth of tumor cell (Finkel et al., 2000). However RS are also involved in signaling pathways that induce gene transcription, cell proliferation and differentiation (Finkel, et al., 2001; Liu, et al., 2005; Fruehauf et al., 2007). Previous findings from our group demonstrated that the presence of melanoma induces changes in patient's systemic oxidative status even after removal of primary tumor. Patients under surveillance after tumor removal, were compared with healthy individuals and found that patients had decreased systemic GSH and increase in malondialdehyde (MDA) levels, thiol levels, and a higher total

1 radical-trapping antioxidant parameter. In addition to the presence of the 3-NT
2 marker in the primary tumor microenvironment indicating nitrosative stress.
3 (Bernardes et al, 2015)

4 Cancer patients often have neoplastic cells circulating in the blood. However,
5 the number of cells that survive, settle at a secondary site and proliferate is very
6 small. This is because there are several defense mechanisms that make blood a
7 hostile environment for the survival of these cells. Some tumor cells undergo genetic
8 and biochemical adaptations that strengthen them (Pisknouva et al.,2015). In this
9 way a set of conditions of the host and the tumor cell itself is involved with the
10 success of the metastatic process and their knowledge could elucidate ways to
11 combat it

12 Melanoma has steadily increased in incidence and lethality over several
13 decades with no effective therapeutics, and identifying factors that affect metastasis
14 would be valuable. Since redox unbalance can modulate the cellular behavior,
15 influencing host response as well as tumor growth and knowing that melanoma is a
16 cancer highly sensitive to these changes at the systemic level and in the tumor
17 microenvironment, it is important to know the oxidative phenomena involved in the
18 installation and progression of melanoma metastasis.

19 20 **2. Materials and Methods**

21 22 **2.1 Cell culture and murine metastatic model**

23
24 The murine melanoma cell line (B16F10) were grown in Dulbecco's modified
25 Eagle's medium (Gibco® Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with
26 10% fetal bovine serum and a 1% penicillin/streptomycin mixture. Cells were
27 maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C (Sanyo CO₂ Incubator;
28 Sanyo, Kitanagoya, Aichi, Japan).

29 In this work, C57/BL6 mice with 8-12 weeks of age were divided into 5
30 groups according with experimental time (n=8). The control group (C), were
31 inoculated intravenously through ophthalmic plexus with 50 µl serum-free DMEM.
32 The animals of melanoma groups were divided into: Melanoma 3 days (M3),
33 melanoma 7 days (M7), melanoma 14 days (M14) and melanoma 21 days (M21),
34 The same technique was used (10⁵ B16F10 Cells/mouse), dissolved in 50 µl serum-

1 free DMEM. The mice had access water *ad libitum* and foods. Animal experiments
2 were approved by a local ethical committee. (CEA14636.2011).

3 After 3, 7, 14 or 21 days the inoculation of B16F10 cells mice were submitted
4 to euthanasia and obtained blood from cardiac puncture, followed by separation
5 plasma and erythrocytes. Erythrocytes were washed 3x with 1ml of saline 0.9% and
6 centrifuged for 5min at 4°C three times and always stored in buffer at 4°C. The lung
7 was carefully removed, washed in phosphate buffer and analyzed for the area
8 affected by metastatic nodule by counting nodules on the entire external face of the
9 lung. The middle lobe of the right lung was fixed in 10% buffered formalin and
10 embedded in paraffin. The rest remained stored at -80 ° C for later oxidative stress
11 analysis. Animals from control group were killed randomly after 3, 7, 14 or 21 days.

12 13 **2.2 B16F10 Supplementation and proliferation assay**

14
15 To analyze B16F10 cells with increase of melanin, we used a protocol
16 stimulated melanin synthesis described by Hoogduijn 2004, where the cells were
17 supplemented with L-tyrosine (1700µM/L) that is melanin precursor and NH₄Cl
18 (10mM/L) to neutralize the pH. To store, cells are trypsinized (Trypsin 0,05%),
19 washed 3 times with potassium phosphate monobasic buffer, resuspended in 1 mL of
20 the same buffer and stored at -20. For oxidative stress analysis, cells were withdrawn
21 at -20 ° C for thawing and then dipped 3 times in liquid nitrogen to ensure complete
22 cell lysis by cryolysis.

23 The proliferation assay was performed by seeding 5x10⁴ cells in 24-well
24 plates and culturing them in culture media with or without supplementation with L-
25 tyrosine and NH₄Cl for 24 h or 48h, followed by counting excluding unviable cells
26 assessed by staining with trypan blue (0,05%). The experiment was performed in
27 triplicate and repeated twice.

28 29 **2.3 Tissue preparation**

30
31 One part of lung was weighed and homogenized in iced phosphate
32 monobasic buffer 10mM pH=7,4 (NaCl 0,9%) for 50s on an Ultra-Turrax homogenizer
33 (MA 102/Mini, Marconi, Piracicaba, Brazil). To evaluate lipid peroxidation the
34 homogenate was prepared at a 25mg/ml and centrifuged for 10min, 1100 g at 4°C

1 and we used the supernatant. For total antioxidant capacity (TRAP), Catalase activity
2 determination and reduced glutathione (GSH) levels analyses, the homogenate
3 25mg/ml was centrifuged for 10min, 11300 g at 4°C and supernatant was used. The
4 quantification of reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS) was performed
5 using 10 mg/mL total homogenate.

6 7 **2.4 Oxidative stress parameters**

8 9 **2.4.1 Lipid peroxidation**

10
11 Lipid peroxidation was evaluated by chemiluminescence (CL) describe for
12 Gonzales-Flecha et al (1991). Plasma was diluted 1:10, erythrocyte 1:1230 and lung
13 homogenate 25mg/ml was diluted 88:100 in in iced phosphate monobasic buffer
14 10mM pH=7,4 (NaCl 0,9%). The chemiluminescent reaction was initiated by the
15 addition of tert-butyl at a final concentration of 6mM for plasma and lung and 3mM for
16 herythrocyte. Curves were obtained in a GloMax® luminometer 20/20 (Promega,
17 Madison, USA).

18 19 **2.4.2 Total antioxidant capacity (TRAP)**

20
21 TRAP was determined using 2,2' azobis (ABAP) as a radical generator and
22 luminol to amplify photon detection and light emission using chemiluminescence
23 (CL), according to the method of Repetto et al., 1996. For plasma determination, the
24 samples were diluted 1:50 in glycine buffer (0.1 M, pH 8.6) at 37°C, for lung
25 determination was used 70µl of homogenate in 830 µl glycine buffer (0.1 M, pH 8.6).
26 B16F10 cells were diluted 1:20 in the same buffer. ABAP solution was obtained by
27 dissolving 54.24 mg in 1 ml of ultrapure distilled water. Soluble E vitamin (Trolox) was
28 used as the reference antioxidant (2.5 mg in 5 ml of glycine buffer [0.1 M, pH 8.6] at
29 37°C, and diluted 1:80 at the time of the reaction), and luminol solution was used as
30 the reaction amplifier (3.98 mg in 250 µl of KOH 1 M added to 10 ml of glycine buffer
31 and diluted 1:10 at the time of the reaction). CL curves were obtained in a GloMax®
32 luminometer 20/20 (Promega, Madison, USA).

33 34 **2.4.3 Catalase activity determination**

35

1 Catalase activity was determined as described by Aebi (1984). Packed red
2 blood cells were diluted 1:80 in distilled water, to the lung was used 100 μL of
3 homogenate. The cells were diluted 1:5. Absorbance disappearance kinetics was
4 monitored in UV-1650 PC® UV-vis spectrophotometer at 240 nm (Shimadzu, Kyoto,
5 Japan). The decomposition of H_2O_2 is directly related to the decrease in absorbance
6 and reflects catalase activity.

7 8 **2.4.4 Reduced glutathione (GSH) levels**

9
10 Reduced glutathione (GSH) levels were determined with 20 μL of diluted
11 erythrocytes at a ratio 1:800 in deionized water, 20 μL of lung homogenate or 20 μL
12 cell suspension. The samples are incubated with 180 μl 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic
13 acid) in 1 mM EDTA buffer according to the method described by Tietze (1969). The
14 absorbance of the formed yellow compound was read at 412 nm.

15 16 **2.3.5 Thiobarbituric Acid-Reactive Substances Assay**

17
18 MDA formed during lipid peroxidation reacts in the Thiobarbituric Acid-
19 Reactive Substances Assay (TBARS) assay to generate a colored product $(\text{TBA})_2$ -
20 MDA adduct. TBARS levels in supernatant lung homogenates was measured as
21 described by Oliveira and Cecchini (2000), using $\epsilon_{535} = 156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 532nm The
22 results were expressed in nM/10 mg tissue. MDA levels in the B16F10 cells were
23 determined by HPLC, using a method adapted from Chirico and Karatas where the
24 readings were performed at 535 nm during an 11 minute run at 0.8 mL / minute flow.

25 26 **2.5 Immunohistochemistry**

27
28 Immunohistochemical analysis was performed only in groups C, M3, M7 and
29 M21. The paraffin-embedded lung samples were submitted to immunohistochemical
30 analysis. Briefly, 3- μm -thick sections mounted on slyane-coated slides (Sigma
31 Aldrich St. Louis, MO, USA) were deparaffinized, rehydrated, immersed in 10 mmol x
32 L^{-1} citrate buffer, pH 6.0, and submitted to heat-induced epitope retrieval using a
33 vapor lock for 45 min. The slides were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS)
34 and immersed in 3% hydrogen peroxide for 20 min to block endogenous peroxidase.

1 Non-specific protein binding was blocked with normal horse serum (Vectastain Elite
2 ABC Kit, Universal, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) for 30 min. The
3 sections were then incubated with monoclonal primary antibodies specific for 3-
4 nitrotyrosine (mouse monoclonal IgG_{2b}, clone HM11, Santa Cruz Biotechnology,
5 Santa Cruz, CA, USA, cod:sc-32731, dilution 1:100), proliferating cell nuclear antigen
6 (PCNA) (mouse monoclonal IgG_{2a}, clone PC10, Santa Cruz Biotechnology, cod: sc-
7 56, dilution 1:500) and vascular endothelial growth factor (VEGF) (rabbit polyclonal
8 IgG, clone A20; Santa Cruz Biotechnology, cod:sc-152, dilution 1:400) for 2 hours at
9 room temperature (25°C) in a humid chamber. Following washes in PBS, biotinylated
10 pan-specific universal secondary antibody (Vectastain Elite ABC Kit) was applied for
11 30 min. Next, the slides were incubated with the avidin–biotin–peroxidase complex
12 (Vectastain Elite ABC Kit) for 30 min and developed with NovaRed kit (Vector
13 Laboratories Inc.) for 5 min. The slides were counterstained by Harris haematoxylin,
14 dehydrated and mounted with Permount (Biomed, Foster City, CA, USA). As
15 negative controls, all specimens were incubated with an isotope-matched control
16 antibody under identical conditions. The immunolabeling was considered to be
17 positive when distinct red staining was present homogeneously. The percentage of
18 positive cells was obtained blindly, for each case at a representative higher-power
19 field (×40). For statistical purposes, the samples were scored as follows: -,
20 Nonstainer; +, Non-majority stainer (< 10% per field); ++, Stainer (10-50% per field);
21 +++ , Majority-stainer (> 50% per field).

22

23 **2.6 Total protein concentration**

24

25 When sample normalization was needed, protein concentrations were
26 determined by the method described by Lowry et al, 1951, as modified by Miller et al,
27 1959, in order to standardize concentrations for comparison. Bovine serum albumin
28 was used as the standard.

29

30 **2.7 Statistical analysis**

31

32 All data are expressed as arithmetic means and standard errors of means
33 (SEM). The Shapiro–Wilk test verified the normality of the data and logarithmic
34 transformation was applied for non-parametric data. In vivo results were compared

1 by One-way ANOVA following Tukey's post-hoc test. In vitro results were compared
 2 by Unpaired student t test and proliferation curve was compared with Two-way
 3 ANOVA following Tukey's post-hoc test. Differences were considered statistically
 4 significant when $p < 0.05$. Immunohistochemistry score statistic was analyzed by Chi-
 5 square (X^2) test and differences were considered statistically significant when
 6 $p < 0.05$. All the statistical analyses were performed using Graphpad Prism® version
 7 5.0 (GraphPad Software).

9 3. Results

11 3.1 Parameters of systemic oxidative stress

13 Through the CL technique in plasma (Fig 1.A), we observed increase in lipid
 14 peroxidation (LPO) 3 days after inoculation of metastatic cells ($9.6 \times 10^4 \pm 1.9 \times 10^4$ vs
 15 $2.3 \times 10^5 \pm 3.3 \times 10^4$ AUC, control group and M3, respectively; $p < 0.01$) and
 16 progressively decrease at 14 days ($2.3 \times 10^5 \pm 3.3 \times 10^4$ vs $8.0 \times 10^4 \pm 2.0 \times 10^4$ AUC, M3
 17 and M14, respectively; $p < 0.01$) and at 21 days ($2.3 \times 10^5 \pm 3.3 \times 10^4$ vs $3.9 \times 10^4 \pm$
 18 7.1×10^3 AUC, M3 and M21, respectively; $p < 0.001$). It was observed a slightly
 19 reduction in erythrocyte LPO (Fig 1.B) when compared M14 and M21 groups
 20 ($9.5 \times 10^9 \pm 3.6 \times 10^9$ vs $3.1 \times 10^8 \pm 1.1 \times 10^8$ AUC, M14 and M21, respectively; $p < 0.05$).
 21 The systemic antioxidants involved in this process, when compared to the control
 22 group, they increased with the progression of metastasis. TRAP (Fig 2.A) showed an
 23 increase in the M14 group ($9.9 \times 10^{-1} \pm 1.5 \times 10^{-1}$ vs $1.8 \pm 2.2 \times 10^{-1}$ μM trolox, control
 24 group and M14, respectively; $p < 0.05$) and M21 ($9.9 \times 10^{-1} \pm 1.5 \times 10^{-1}$ vs $1.9 \pm 2.6 \times 10^{-2}$
 25 μM trolox, control group and M14, respectively; $p < 0.05$). The catalase enzyme
 26 activity (CAT) (Figure 2.B) was higher in the groups M7 ($1.0 \times 10^1 \pm 1.3$ vs $2.6 \times 10^1 \pm$
 27 3.4 abs/min/mL, control group and M7, respectively; $p < 0.001$), M14 ($1.0 \times 10^1 \pm 1.3$
 28 vs $3.2 \times 10^1 \pm 1.3$ abs/min/mL, control group and M14, respectively; $p < 0.0001$) and
 29 M21 ($1.0 \times 10^1 \pm 1.3$ vs $2.4 \times 10^1 \pm 3.4$ abs/min/mL, control group and M17,
 30 respectively; $p < 0.01$). The antioxidant GSH (Fig 2.C) was increased in group 7 days
 31 ($5.1 \times 10^3 \pm 3.6 \times 10^1$ vs $8.5 \times 10^3 \pm 8.2 \times 10^1$ nM GSH/mg protein, control group and M7,
 32 respectively; $p < 0.01$) and 14 days ($5.1 \times 10^3 \pm 3.6 \times 10^1$ vs $7.9 \times 10^2 \pm 4.7 \times 10^1$ nM
 33 GSH/mg protein, control group and M14, respectively; $p < 0.05$).

3.2 Parameters of the tumor microenvironment.

After the intravenous injection of murine melanoma cells, the animals were monitored and euthanized at 3, 7, 14 or 21 days. Macroscopic counts of metastatic nodules (Fig 3) showed a significant difference in the amount of nodules into group 14 days ($p < 0.0001$) and 21 days ($p < 0.0001$) when compared to control group.

During installation of metastasis in the lungs, represented by M3 group, there was a decrease in LPO (Fig 4.A) compared to the control group ($2.8 \times 10^6 \pm 1.2 \times 10^5$ vs $1.8 \times 10^6 \pm 7.8 \times 10^4$ AUC, control group and M3, respectively; $p < 0.001$) and a progressive increase in subsequent experimental times ($1.8 \times 10^6 \pm 7.8 \times 10^4$ vs $2.5 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^5$ AUC, M3 and M7, respectively. $p < 0.05$; $1.8 \times 10^6 \pm 7.8 \times 10^4$ vs $2.5 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^5$ AUC, M3 and M14, respectively. $p < 0.05$; $1.8 \times 10^6 \pm 7.8 \times 10^4$ vs $2.9 \times 10^6 \pm 2.9 \times 10^5$ AUC, M3 and M21, respectively. $p < 0.001$). The lipid peroxidation marker, MDA was quantified and (4.B) there was no significant difference between groups. The antioxidants analysis showed a decrease in TRAP (Figure 5.A) in the experimental period of 21 days (1.1 ± 0.1 vs 0.4 ± 0.1 μ M trolox, control group and M21, respectively; $p < 0.05$) and decreased GSH (Fig 5.C) at 14 days (0.4 ± 0.1 vs 0.2 ± 0.0 nM GSH/mg protein, control group and M14, respectively; $p < 0.05$) and 21 days (0.4 ± 0.1 vs 0.1 ± 0.0 nM GSH/mg protein, control group and M21, respectively; $p < 0.01$) both compared to the control group. The antioxidant catalase showed no significant change in activity (Fig 5.B).

The immunohistochemical analysis (Fig 6) showed that the expression of VEGF (fig 6 A,D,G,J), PCNA (Fig 6 B,E,H,K) and 3-NT (Fig 6 C,F,I,L) were increased according to the presence of melanoma metastasis in the lung. Thus, the 7 and 21 days groups presented 10-50% and >50% of cells labelled by VEGF, PCNA and NITROTYROSINE, mainly in the metastatic foci. The control and 3 days groups displayed scanty staining of these markers.

3.3 *In vitro* results.

With the construction of a proliferation curve (fig 7) at times 0, 24 and 48 hours after supplementation or not the B16F10 cells with L-tyrosine and NH_4Cl was observed that after 48 hours melanin-producing cells proliferate more than non-

1 melanin-producing ($2.8 \times 10^5 \pm 3.8 \times 10^4$ vs $5.3 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$ B16F10 cells, non-
2 melanin-producing and melanin-producing, respectively; $p < 0.05$). Antioxidants
3 analysis (fig 8) showed that the supplemented cells present higher TRAP (fig 8A.
4 $5.1 \times 10^{-6} \pm 9.5 \times 10^{-7}$ vs $1.3 \times 10^{-5} \pm 2.1 \times 10^{-6}$ μM trolox/n^o cells non-melanin-producing
5 and melanin-producing, respectively; $p < 0.01$), CAT (fig 8B. $4.1 \times 10^{-8} \pm 3.2 \times 10^{-9}$ vs
6 $6.4 \times 10^{-8} \pm 8.4 \times 10^{-9}$ abs/min/n^o cells non-melanin-producing and melanin-producing,
7 respectively; $p < 0,05$) and GSH content (fig 8C. $2.5 \times 10^{-6} \pm 1.8 \times 10^{-7}$ vs $1.43 \times 10^{-5} \pm$
8 2.1×10^{-6} nM GSH/ n^o cells non-melanin-producing and melanin-producing,
9 respectively; $p < 0.001$). MDA did not present a significant difference.

11 4. Discussion

13 The metastatic process in melanoma is the target of several researchers who
14 seek to understand the high metastatic capacity of this type of cancer and ways to
15 fight it. The process of metastasis involves the displacement of tumor cells from their
16 site of origin, the passage through extracellular matrix, the arrival to a blood vessel or
17 lymph vessel, and the establishment of the neoplastic cell in another organ or tissue
18 (Leber, 2009). In our experimental model, the B16F10 cell with metastatic capacity
19 and tropism for the lung was inoculated directly into the bloodstream. Many
20 researchers study single-stage melanoma of the disease. Our experimental model
21 allows us to analyze in different experimental times the phases of installation and
22 progression of metastasis.

23 Our results showed that 3 days after inoculation of murine B16F10
24 melanoma cells, there is an increase in plasma lipid peroxidation (LPO) analysed by
25 CL. An important characteristic of tumor promotes is their ability to recruit
26 inflammatory cells and to stimulate them to generate ROS (Reuter et al, 2010), thus,
27 making the bloodstream a hostile environment to these cells. This is one reason why
28 few cells of few cancers can get metastatized, however, the redox imbalance is not
29 sufficient to destroy melanoma cells, which can reach the tissue and multiply.
30 Piskounova et al (2015) showed that the ability of human melanoma cells to enter the
31 bloodstream and remain viable, depend on their ability to resist systemic oxidative
32 stress. One of the mechanisms studied shows that the cells can increase their
33 antioxidant capacity through the modulation of biochemical pathways that increase
34 the generation of NADPH, which participates in the GSH regeneration. Furthermore,

1 when the cells are in bloodstream, they can reduce their mitochondrial function and
2 thus decrease the generation of intracellular ROS, more of a defense mechanism
3 against oxidative stress.

4 The systemic increase of LPO in the onset the disease (M3), mobilizes the
5 antioxidant defenses of the organisms, in later times, thus reducing the systemic LPO
6 to control levels. In this way, there is a clear association between the reduction of
7 plasmatic LPO throughout the development of disease with the increase of plasma
8 TRAP levels. Also, it was observed a low erythrocytes oxidative profile reduction,
9 possibly because of hight antioxidant levels mobilized of these cells, represented by
10 the increase of catalase activity and GSH levels. Thus, it becomes evident the
11 possible association between the variation in oxidant systemic profile along the
12 metastatic disease development. This statement was enforced by the relation
13 between such parameters and the number of nodule growing from day 3 to day 21.
14 The catalase activity and GSH levels increase in erythrocytes from 7th day indicate a
15 continuous oxidative stress that was cope by antioxidant system in the metastatic
16 progression. Altogether, these results indicate that changes in oxidative balance with
17 reduced oxidative damage and increase antioxidant defense can play a role in
18 metastatic process from implantation to progression.

19 Antioxidants are widely used by cancer patients as a strategy to fight cancer,
20 but the effects of antioxidant supplementation in cancer is fraught with controversy
21 and conflicting results. On one hand, previous studies have raised the possibility that
22 antioxidants might inhibit migration and invasion of melanoma cells and other
23 cancers *in vitro* (Meyeskens et al., 2001; Binker et al., 2009; Ma et al., 2013). On the
24 other hand, some studies have demonstrated that antioxidante administration
25 promotes the development of metastasis in mices with melanoma (Gal et al, 2015;
26 Piskounova et al, 2015). Previous findings from our group compared patients with or
27 without metastasis episodes up to 3 years after the removal of cutaneous melanoma
28 and found that patients who developed metastasis had greater plasmatic total
29 antioxidant capacity and thiol than the other group (Bernardes et al., 2016). Our
30 results agree with the previous one and suggest that melanoma cells can arrive in
31 metastatic site and proliferate when the amount of systemic reactive species (RS) are
32 low.

33 On contrary, in the microenviroment of metastatic nodule was observed
34 increase LPO starting at 7th day compared to M3 group. Furthemore reduction of

1 antioxidants parameters TRAP and GSH with the disease progression. Thus,
2 increase in pro-oxidant with concomitant reduction in antioxidant profiles favors the
3 metastasis installation. In the same way, nitroactive compounds also increased with
4 the nodules deployment. This increase can be seen in the nitrotyrosine
5 immunohistochemical evaluation. According, this change in oxidative and nitroactive
6 stress with reduction of antioxidant defense, specifically related to GSH levels, would
7 trigger the signaling that facilitate the tumor cell proliferation and growing, leading to
8 metastatic nodule formation. Indeed, our results by immunohistochemical evaluation
9 also show a progressive increase of VEGF expression as a angiogenesis signaling,
10 and PCNA, a proliferative signaling.

11 With our results, we can realize that the systemic and tumor microenvironment
12 oxidative status is very important for the success of the metastasis. Our next step
13 was to evaluate the tumor cell *in vitro* without systemic or other cells influence. In the
14 more advanced stage of the disease, the tumor cell appears to produce melanin
15 intensely. Melanin exerts an important role in the metastatic power of the melanoma
16 cell, and its presence is related to a worse prognosis. Brozyna et. (2016) showed that
17 melanoma patients in stage 3 and 4 with melanoma primary melanoma and lymph
18 node metastasis pigmented exhibited significantly lower tumor-free time and overall
19 survival compared with amelanotic or poorly melanized melanomas. Shields et al
20 (2015), in epidemiological study demonstrated that the presence of melanin is related
21 to an increased risk of metastasis and death. Thus, we decided to analyze the
22 oxidative status of B16F10 cells and the same ones with stimulation of melanin
23 production.

24 The protocol for melanin stimulation was performed by *in vitro* experiment
25 where the cells were supplemented with L-tyrosine and NH₄Cl and produced more
26 melanin than normal cells (Hoogduijn et al., 2004). These cells showed a faster
27 growth than cells without stimulation (48 hours) and still greatly increase its
28 antioxidant power through increased TRAP, CAT activity and GSH levels.

29 Many anticancer therapies use strategies that increase imbalance redox like
30 apoptosis induction mechanism, however melanoma is highly refractory to this
31 therapy. Unlike melanocytes, melanoma cells are equipped with a high antioxidant
32 capacity and even higher in cells-producing more melanin. This may partly explain
33 the diversity of human melanoma disease, showing different phenotypes. These cells

1 may use this ability to promote proliferation and invasion (Meyskens et al., 2001;
2 Sander et al., 2003; Wittgen & Van Kempen 2007; Piskounva et al., 2015).

3 Melanin has a dual role in melanoma. On one hand this pigment protects the
4 cell nucleus from burns induced by UV and DNA damage and still has scavenger
5 properties of free radicals, moreover, their synthesis involves oxidoreduction
6 reactions that generate ROS (Kollias et al, 1991). The increase in antioxidant
7 capacity found in melanin-producing cells protects the tumor cell not only from
8 possible lipid damage by the RS generated during melanin production, shown by the
9 non-statistical difference in the MDA quantification, but are involved with resistance to
10 therapies. In addition to rendering inefficient chemotherapeutic methods that
11 promote imbalance redox, melanin production has also been related to increased
12 resistance to radiotherapy (Brozyna et al., 2016).

13 Conceivably, we should conclude that redox equilibrium in bloodstream favor
14 the deployment of melanoma cells while the reduction in redox equilibrium in tissue,
15 caused in part by melanin production, favor the signaling to proliferation of melanoma
16 cells and tumor growing, while increasing melanin provides antioxidant protection for
17 the tumor cell. The comprehension of oxidative melanoma strategies to overcome the
18 host defenses against metastasis is a key factor to drug design. Systemic and
19 tumoral oxidative changes are still poorly explored in melanoma, which makes our
20 findings meaningful for a better understanding of melanoma pathogenesis.

21 22 **References**

23 Aebi, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.

Bernardes, S. S., de Souza-Neto, F. P., Melo, G. P., 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.1, n. 9, 2016

Bernardes, S. S., de Souza-Neto, F. P., Ramalho, L. N. Z., Derossi, D. R., Guarnier, F. A., da Silva, C. F. N., ... & 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.

Binker, M. G., Binker-Cosen, A. A., Richards, D., Oliver, B., & Cosen-Binker, L. I. EGF promotes invasion by PANC-1 cells through Rac1/ROS-dependent secretion and activation of MMP-2. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 379, n. 2, p. 445-450, 2009.

Brash, Douglas E. "UV-induced Melanin Chemiexcitation A New Mode of Melanoma Pathogenesis." **Toxicologic pathology**, 2016

Brozyna AA, Jozwicki W, Carlson JA, Slominski AT. Melanogenesis affects overall and disease-free survival in patients with stage III and IV melanoma. **Human pathology**, v. 44, n. 10, p. 2071-2074, 2013.

Carrara, I. M. . Metformin as a preventive agent of squamous skin cell carcinoma in hairless HRS/J mouse skin. 28/05/2016.89 pages. **Dissertation** – State University of Londrina, Londrina, 2016.

Chirico S. High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. **Methods Enzymol**, v. 234, p. 314-318, 1994

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239–247, 2000.

Finkel, T. Reactive oxygen species and signal transduction. **IUBMB life**, v. 52, n. 1, p. 3-6, 2001.

Flinkel, T. Signal transduction by reactive oxygen species. **The Journal of cell biology**, v. 194, n. 1, p. 7-15, 2011.

Fruehauf , J.P & Trapp, V. Reactive oxygen species: an Achilles' heel of melanoma? **Expert Review of Anticancer Therapy** , v. 8, n. 11, 2008

Fruehauf, J. P.; Meyskens, F. L. Reactive oxygen species: a breath of life or death?. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 3, p. 789-794, 2007.

Gadjeva, V.; Dimov, A.; Georgieva, N. Influence of therapy on the antioxidant status in patients with melanoma. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 33, n. 2, p. 179-185, 2008.

Gal, L.K., Ibrahim, M.X., Wiel, C., Sayin, V.I., Akula, M.K., Karlsson, C., Dalin, M.G., Akyurek, M.L., Lindahl, P., Nilsson, J., Bergo, M.O.B. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. **Science translational medicine**, v. 7, n. 308, 2015.

Gonzales-Flecha, B.; Llesuy, S.; Boveris, A.. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 10, n. 2, p. 93-100, 1991.

Hoogduijn, M. J., Cemeli, E., Ross, K., Anderson, D., Thody, A. J., & Wood, J. M. Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H₂O₂-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca²⁺. **Experimental cell research**, v.

294, n. 1, p. 60-67, 2004.

INCA - Instituto Nacional do Câncer, Brasil. **Estimativa 2016 de Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/> Acessado em: 17 de junho de 2016

Karatas, F.; Karatepe, M.; Baysar, A. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. **Analytical biochemistry**, v. 311, n. 1, p. 76-79, 2002.

Koga, Satoshi, Minoru Nakano, and Shozo Tero-Kubota. Generation of superoxide during the enzymatic action of tyrosinase. **Archives of biochemistry and biophysics** v. 292, n. 2, p. 570-575, 1992.

Kollias, N., Sayre, R. M., Zeise, L., & Chedekel, M. R. New trends in photobiology: Photoprotection by melanin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.9, n. 2, p. 135-160, 1991.

Leber, M.F; and Thomas E.. "Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review)." **International journal of oncology**, v. 34, n. 4, p. 881, 2009.

Liu, H., Colavitti, R., Rovira, Il., Finkel T. Redox-dependent transcriptional regulation. **Circ Res**; v. 97, p. 967–974, 2005.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-72, 1951.

Ma, J., Zhang, Q., Chen, S., Fang, B., Yang, Q., Chen, C., ..& Wang, Z. . Mitochondrial dysfunction promotes breast cancer cell migration and invasion through HIF1 α accumulation via increased production of reactive oxygen species. **PLoS one**, v. 8, n. 7, p. e69485, 2013.

Meyskens, F.L.Jr., Farmer, P.J., Fruehauf, J.P. Redox Regulation in Human Melanocytes and Melanoma. **Pigment cell res**, v. 14, p. 148–154. 2001

Miller G. Protein determination of large numbers of samples. **Anal Chem**, v. 31, p. 964, 1959

Oliveira, F. J. D. A.; Cecchini, R. Oxidative stress of liver in hamster infected with *Leishmania (L) chagasi*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 86, p. 1067-107 2000.

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.

Repetto M., Reides, C., Carretero, M.L.G., Costa, M., Griemberg, G., Llesuy, S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinical Chemical Acta**, n. 255, p. 107-117, 1996.

Sander, C. S., Hamm, F., Elsner, P., Thiele, J. J. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. **British Journal of Pharmacology**, n. 148, p.913-922, 2003.

Shields CL, Kaliki S, Cohen MN, Shields PW, Furuta M, Shields JA. Prognosis of uveal melanoma based on race in 8100 patients: The 2015 Doyne Lecture. **Eye**, v. 29, p. 1027–1035, 2015.

Simon, J. D., Peles, D., Wakamatsu, K., & Ito, S.. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. **Pigment cell & melanoma research**, v. 22, n. 5, p. 563-579, 2009.

Terra, V. A., Souza-Neto, F. P., Pereira, R. C., Silva, T. N. X., Costa, A. C. C., Luiz, R. C., ... & 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.

Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**. n. 27, p. 502 – 522, 1969

Toi M, Kashitani, J., Tominaga, T. Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. **Int. J. Cancer**, n. 55, p. 371 – 374, 1993

U.S. National Cancer Institute. Available:

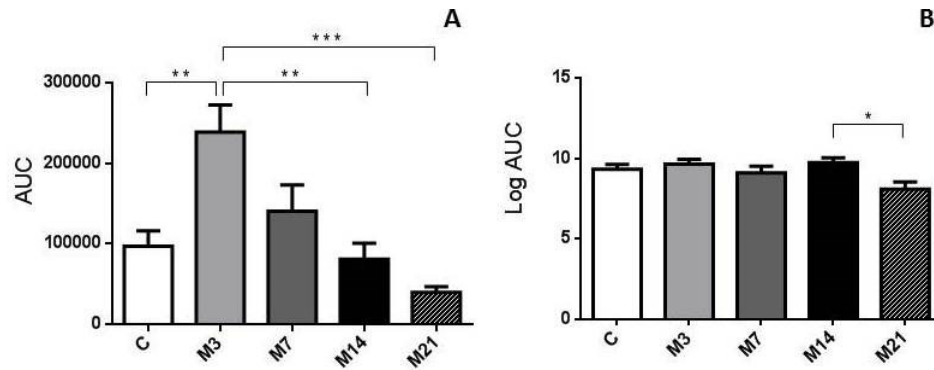
<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html> Accessed 2016 Jun 16

Urbanska K, Romanowska-Dixon B, Elas M, Pajak S, Paziowski E, Bryk J, Kukielczak B, Slominski A, Zygulska-Mach H, Lukiewicz S. Experimental ruthenium plaque therapy of amelanotic and melanotic melanomas in the hamster eye. **Melanoma Res**, v. 10, p. 26–35, 2000.

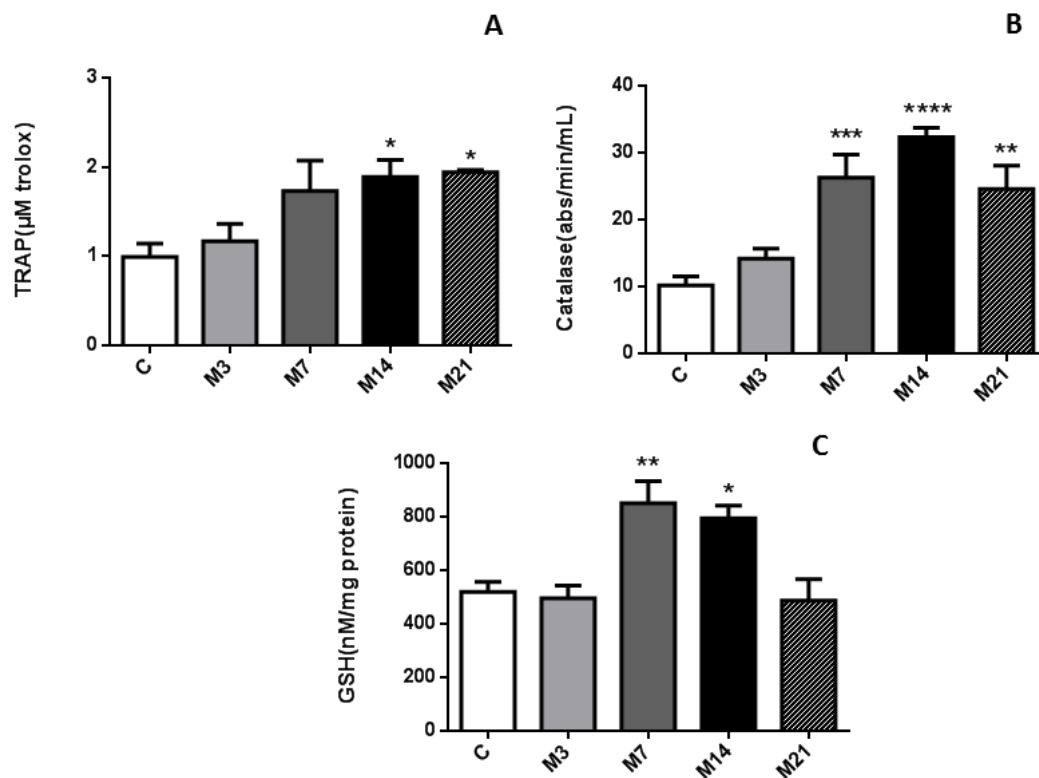
Wittgen, H.G., Van Kempen, L.C. Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications. **Melanoma Research**, Pittsburgh, v. 17, p. 400-409, 2007.

World Health Organization, 2016. In:

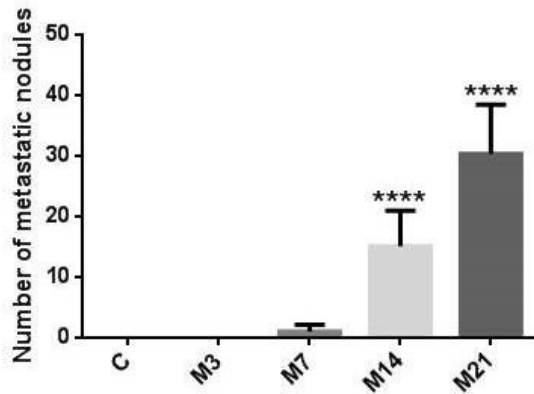
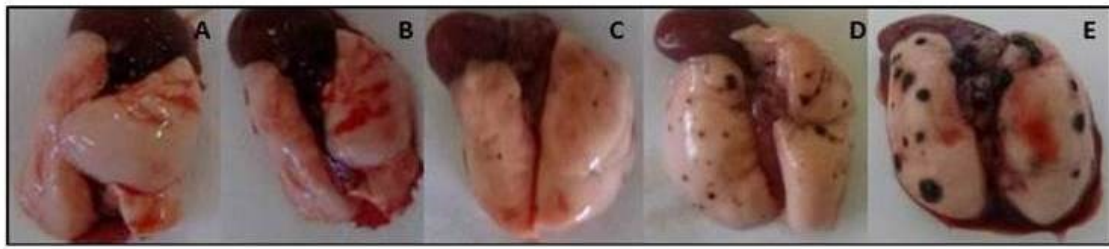
<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>. Accessed 2016 Jun 15



1 **Figure 1.** Pro oxidants systemic parameters. A. Plasma lipid peroxidation. B.
 2 Erythrocyte lipid peroxidation. Results are expressed as mean±SEM. The groups
 3 were compared to each other and the statistical significance of the differences was
 4 analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-hoc testing.
 5 *p<0,05.
 6
 7

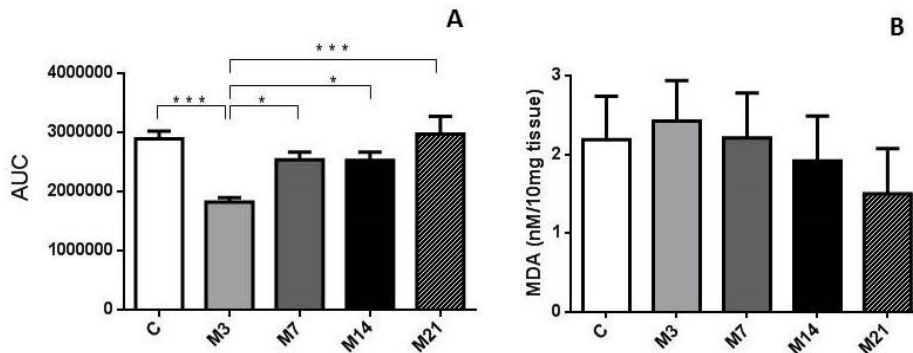


8 **Figure 2:** Systemic antioxidants parameters. A: Plasma Total-trapping antioxidant
 9 capacity; B :Erythrocyte catalase activity; C: Erythrocyte GSH content. Results are
 10 expressed as mean± SEM. The groups were compared with the control group and
 11 the statistical significance of the differences was analyzed by one-way analysis of
 12 variance (ANOVA) with Tukey's post-hoc testing. *p<0,05;
 13
 14
 15
 16
 17



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

Figure 3: Macroscopic lung appearance and number of metastatic nodules after intravenous inoculation with B16F10 cells. A: Control group; B: M3 group; C: M7 group; D: M14 group; E: M21 group; F: Number of metastatic nodules. Results are expressed as mean± SEM . The statistical significance of the differences was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey’s post-hoc testing. ****p<0,0001.



11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

Figure 4: Pro oxidants parameters in the tumor microenvironment. A. Lipid peroxidation; B. Malondialdehyde levels. Results are expressed as mean± SEM. The groups were compared to each other and the statistical significance of the differences was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey’s post-hoc testing. *p<0,05

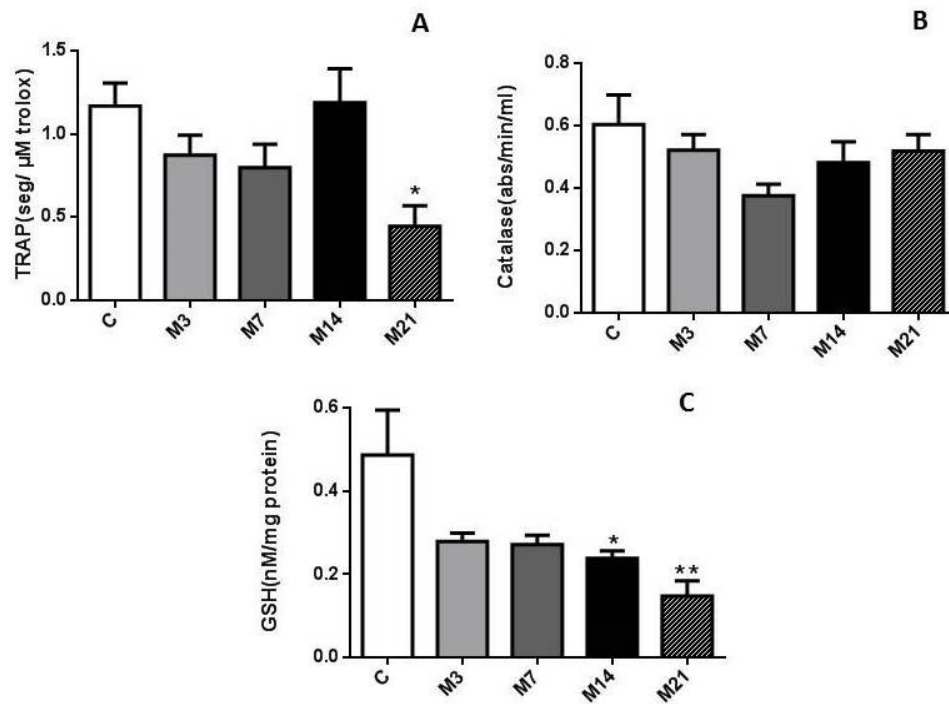
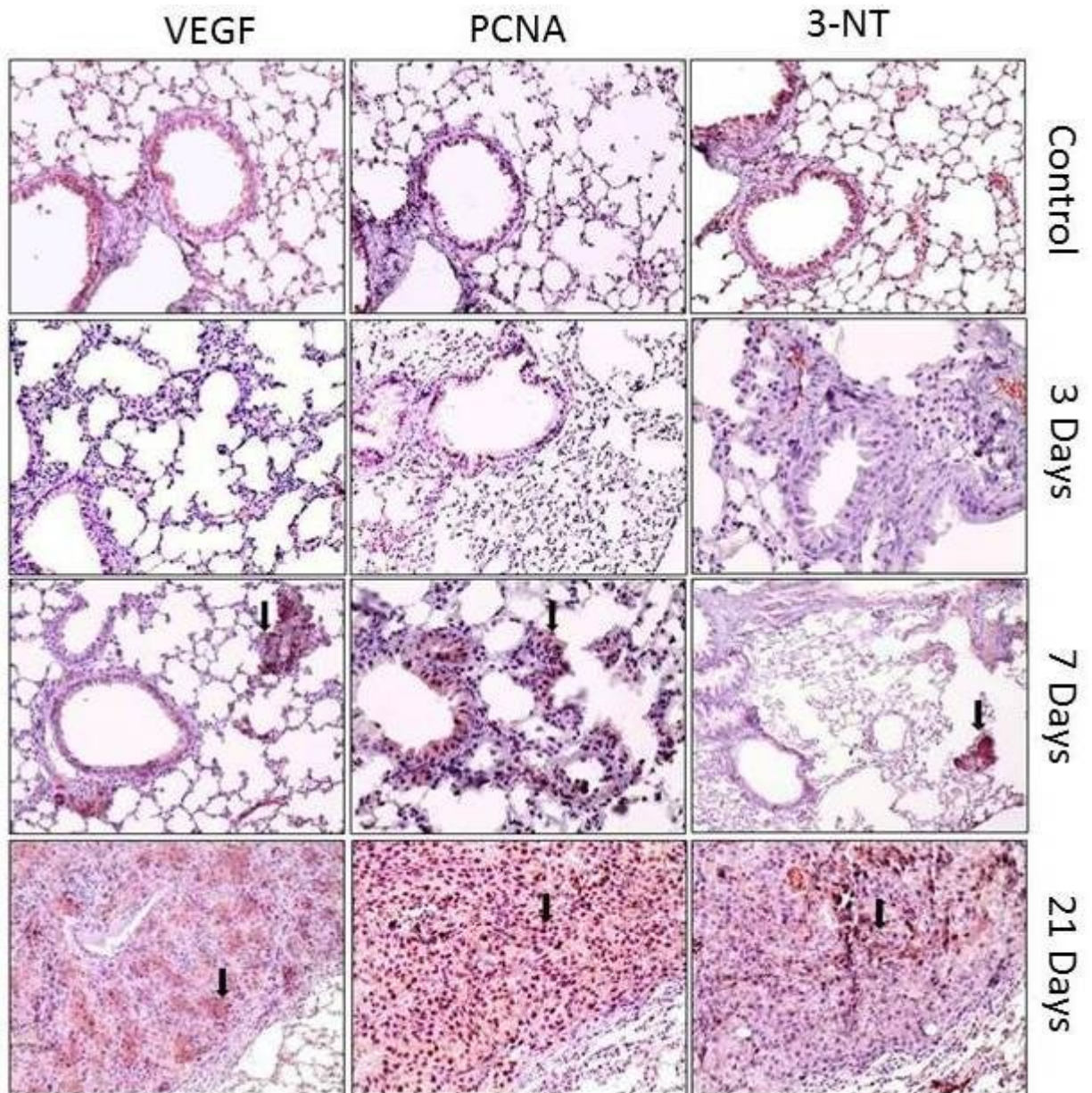
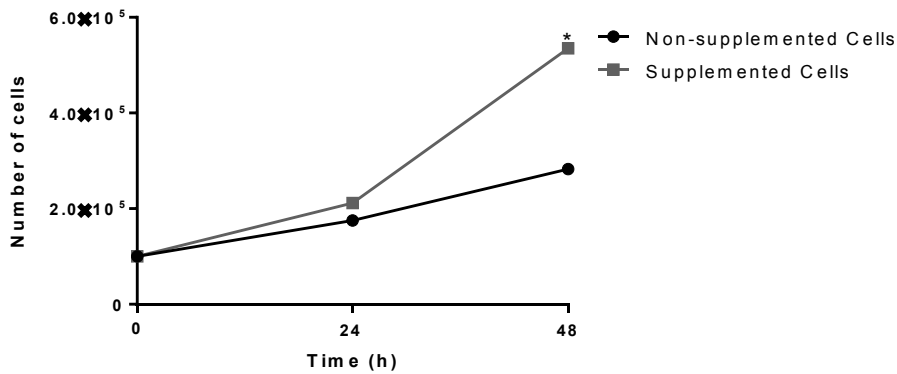


Figure 5: Antioxidants parameters in the tumor microenvironment. A: Total-trapping antioxidant capacity; B: Catalase activity; C: GSH content. Results are expressed as mean \pm SEM. The groups were compared with the control group and the statistical significance of the differences was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-hoc testing. * p < 0,05;

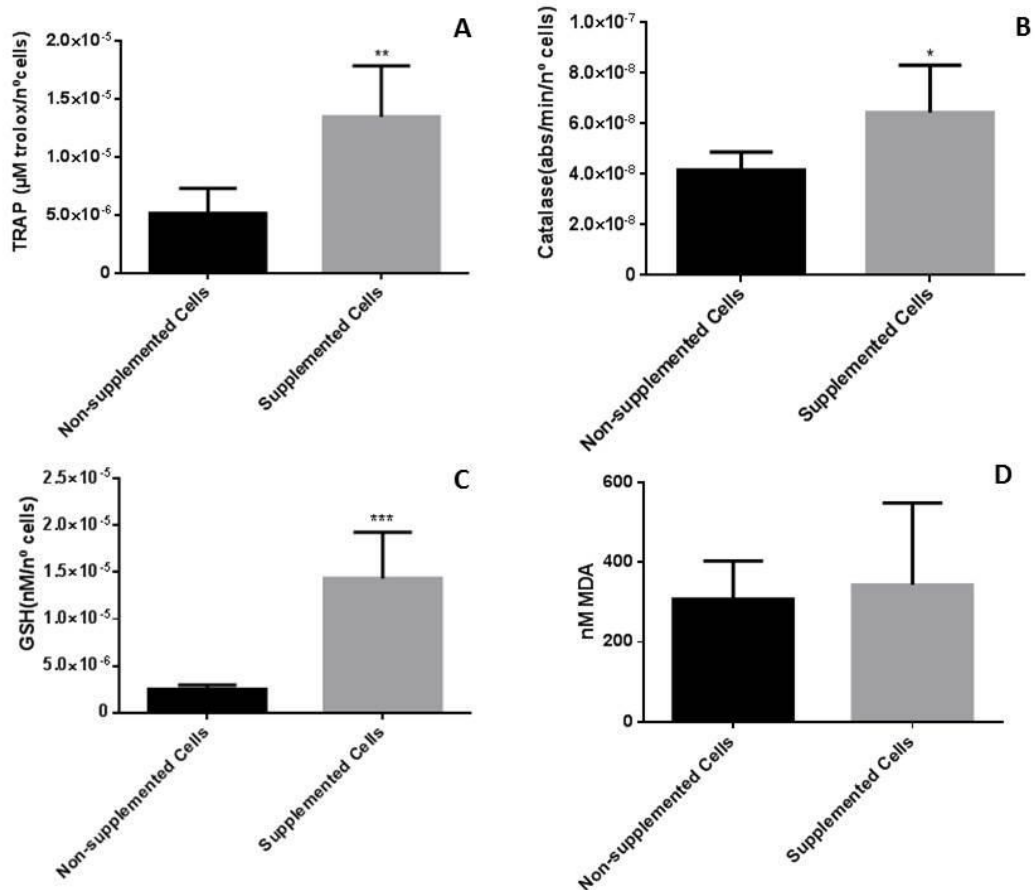
1
2
3
4
5
6
7
8



1
2 **Figure 6:** VEGF, PCNA and 3-NT immunolabelling developed with NovaRed kit in
3 control lung (A, B and C), 3 days metastasized lung (D, E and F), 7 days
4 metastasized lung (G, H and I) and 21 days metastasized lung (J, K and L). The
5 black arrows point cellular labeling of these markers (immunohistochemistry, $\times 20$).
6
7
8
9
10



1
2 **Figure 7:** Cell proliferation assay. The statistical significance of the differences was
3 analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-hoc testing.
4 *p<0,05.
5



6
7 **Figure 9:** In vitro parameters. A: Total-trapping antioxidant capacity; B: CAT activity;
8 C: GSH content; D: MDA levels. Results are expressed as mean ± SEM. The
9 statistical significance of the differences was analyzed by Student's T test. *p<0,05;
10