



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ISABELA CHAGAS SILVA

**ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO EFEITO
CITOTÓXICO E CITOSTÁTICO DA L-CARNITINA NAS
CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10**

Londrina
2020

ISABELA CHAGAS SILVA

**ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO EFEITO
CITOTÓXICO E CITOSTÁTICO DA L-CARNITINA NAS
CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10**

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz

Londrina
2020

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

S586 Silva, Isabela Chagas.
Envolvimento do estresse oxidativo no efeito citotóxico e citostático da L-carnitina nas células de melanoma murino B16F10 / Isabela Chagas Silva. - Londrina, 2020.
54 f. : il.

Orientador: Rodrigo Cabral Luiz.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Melanoma - Tese. 2. L-carnitina - Tese. 3. Estresse oxidativo - Tese. 4. B16F10 - Tese. I. Luiz, Rodrigo Cabral. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

ISABELA CHAGAS SILVA

**ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO EFEITO
CITOTÓXICO E CITOSTÁTICO DA L-CARNITINA NAS CÉLULAS DE
MELANOMA MURINO B16F10**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini
Armani
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Larissa Juliani Sanches
Colaborador Externo

Profa. Dra. Flávia Alessandra Guarnier
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Poliana Camila Marinello
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 24 de abril de 2020.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família que sempre me apoiou e fizeram de tudo para eu ter o privilégio de estar aqui hoje. Aos meus pais Maria Edna Chagas Silva e João Antônio da Silva Neto, que me ajudam há 25 anos a trilhar esse caminho que escolhi com muito amor. Ao meu marido, Julio Jucoski Junior, que sempre esteve ao meu lado me apoiando a seguir sempre em frente, que me fez companhia nos finais de semana e feriados que precisei fazer experimentos na UEL para que eu não ficasse sozinha.

Gostaria de agradecer a todos os professores que passaram pela minha vida, principalmente aqueles que me ajudaram a trilhar este caminho na Biomedicina e na pesquisa que tanto amo. Em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz pelo aprendizado e paciência durante esses dois anos no programa de Patologia Experimental e a todos os professores do programa pelo aprendizado e incentivo todos os dias. Também gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Rubens Cecchini por ter cedido seu tempo, me ajudado em alguns experimentos, aberto as portas do seu laboratório e ter contribuído com seu conhecimento, me ajudando a ter um pensamento crítico e não somente seguir um protocolo e sim entender o significado do que eu estava fazendo.

Um obrigada bem grande a todos os colegas e amigos de laboratório que me ajudaram neste experimento, ou simplesmente alegram meus dias neste dois anos no programa. Ao técnico Jesus Antônio Vargas (Zui) pela ajuda prestada durante os experimentos realizados.

Um agradecimento a CAPES pelo fomento durante esses dois anos no programa.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a Deus pela dádiva do conhecimento e da vida, pois sem isso, não estaria aqui hoje.

Obrigada a todos de coração!

“O Resultado do que fazemos nos espera mais adiante.”

Allan Kardec.

SILVA, Isabela Chagas. **Envolvimento do estresse oxidativo no efeito citotóxico e citostático da L-Carnitina nas células de melanoma murino (B16F10)**. 2020. 54 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

A L-carnitina (LC) é uma amina quaternária endógena que transporta ácidos graxos de cadeia longa para dentro da mitocôndria para a β -oxidação. De forma suplementar, esta molécula tem sido utilizada como antioxidante na doença de Alzheimer e na isquemiareperfusão após AVC, em pacientes com câncer e caquexia, em atividades esportivas, na obesidade, dentre outros. Seu efeito sobre células de câncer é pouco conhecido. Há relatos de efeito citotóxico em células de hepatocarcinoma humano HepG2, no entanto não se sabe se esta molécula pode ser capaz de promover proliferação celular ou induzir citotoxicidade sobre outros tipos de células tumorais. Por este motivo, este trabalho avaliou o efeito citotóxico da L-carnitina sobre células de melanoma murino B16F10. Este modelo foi escolhido uma vez que o melanoma é um tipo agressivo e letal de câncer. Foram testadas concentrações de LC entre 10 e 200mM por 24h. A partir LC 20 mM observamos uma diminuição do número de células e para LC 100 mM e 200 mM houve diminuição da viabilidade celular. Houve um aumento nas células na fase S para a LC 50 mM e na fase G2 para LC 100 e 200 mM e aumento da apoptose para LC 200 mM. Nas concentrações LC 100 e 200 mM observamos indução de estresse oxidativo, revelado por aumento de liperóxidos de membrana celular e dos níveis de glutathiona, com redução da atividade da superóxido dismutase e da catalase. O estresse oxidativo foi confirmado com o aumento da marcação nuclear de 8-hidroguanossina (LC 50 mM) e Nrf2 (LC 20 mM). O marcação imunocitoquímica também revelou aumento da marcação nuclear de p53 (LC 50 mM). Por outro lado, as mesmas as concentrações testadas de LC não foram capazes de induzir efeito citotóxico, citostático ou gerar estresse oxidativo em células de fibroblasto murino NIH-3T3. Nossos resultados apontam que a LC é capaz induzir apoptose em células de melanoma B16F10 e que este efeito é promovido, pelo menos em parte, pela geração de estresse oxidativo.

Palavras-chaves: Melanoma. L-carnitina. Estresse oxidativo. Apoptose. B16F10. In vitro.

SILVA, Isabela Chagas. **Involvement of oxidative stress on cytotoxic and cytostatic effect of L-Carnitine on murine melanoma cells (B16F10)**. 2020. 54 p. Dissertation (Masters in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

L-carnitine (LC) is an endogenous quaternary amine that transports long-chain fatty acids into the mitochondria for β -oxidation. As a supplement, this molecule has been used as antioxidant in Alzheimer's disease and in ischemia-reperfusion after stroke, in patients with cancer and cachexia, in sport activities, in obesity, among others. Its effect on cancer cells is little known. There are reports of cytotoxic effect on human hepatocarcinome HepG2 cells, however it is not known whether this molecule may be able to promote cell proliferation or induce cytotoxicity on other types of tumor cells. For this reason, this work evaluated the cytotoxic effect of L-carnitine on murine B16F10 melanoma cells. This model was chosen since melanoma is an aggressive and lethal type of cancer. LC concentrations between 10 and 200mM for 24h were tested. From 20 mM LC we observed a decrease in the number of cells and for 100 mM and 200 mM LC there was a decrease in cell viability. There was an increase in cells in the S phase for the 50 mM LC and in the G2 phase for the 100 and 200 mM LC and an increase in apoptosis for the 200 mM LC. At LC 100 and 200 mM concentrations, we observed an induction of oxidative stress, revealed by an increase in cell membrane liperoxides and glutathione levels, with a reduction in the activity of superoxide dismutase and catalase. Oxidative stress was confirmed by increased nuclear labeling of 8-hydroguanosine (LC 50 mM) and Nrf2 (LC 20 mM). The immunocytochemical staining also revealed an increase in the nuclear staining of p53 (LC 50 mM). On the other hand, the same tested concentrations of LC were not able to induce cytotoxic, cytostatic effect or generate oxidative stress in NIH-3T3 murine fibroblast cells. Our results indicate that LC is able to induce apoptosis in B16F10 melanoma cells and that this effect is promoted, at least in part, by the generation of oxidative stress.

Key words: Melanoma, L-carnitine, reactive species, cell cycle arrest, apoptosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Efeito do ROS nas células normais e tumorais	16
Figura 2	Reações realizadas pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) e Catalase	17
Figura 3	Sistema glutaciona.....	17
Figura 4	Via de sinalização do Nrf2 para ativação dos antioxidantes	19
Figura 5	Fases do ciclo celular, sua regulação e principais pontos de Checagem.....	21
Figura 6	Estrutura química da (a) guanina e da (b) 8-hidroxi-guanosina (8-OHdG).....	24
Figura 7	Estrutura química da L-carnitina	25
Figura 8	Biossíntese da L-Carnitina através dos aminoácidos lisina e Metionina.....	26
Figura 9	Sistema carnitina e o transporte de ácidos graxos de cadeia longa através da mitocôndria	27
Figura 10	Efeitos antioxidantes da L-Carnitina (LC) no organismo	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-OHdG	8-hidroxi-2'- desoxiguanosina
ACD	Adrenocortical dysplasia protein homolog
ACS	American Cancer Society
Akt	Protein kinase B – proteína quinase B
ARE/EpRE	Nuclear protein binding to the antioxidant/electrophile response element
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
c-KIT	Tyrosine-protein kinase KIT CD117
CDKs	Cyclin-dependent kinases
CDK4	Cyclin-dependent kinases 4
CHK1	Checkpoint kinase 1
CDC25	Cell Division Cycle 25
ERK	Extracellular signal–regulated kinases
eIF2 α	Iniciação eucariótico 2 α
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida.
GSSG	Glutaciona oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Keap 1	Kelch-like
LC	L-Carnitina
MAPK	Mitogen-activated protein kinases – proteína quinase ativada por mitogeno
Mdm2	Murine double minute 2
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2) -like 2 – fator de transcrição nuclear associado ao E2
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OH [•]	Íon hidroxila
p21	proteína p21
p53	proteína p53.
p27	proteína p27
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase – fosfatidilinositol 3-quinase

RAS	Rat Sacrcoma vírus
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SOD	superóxido dismutase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	MELANOMA.....	12
1.2	ESTRESSE OXIDATIVO	14
1.3	CICLO CELULAR.....	20
1.4	MORTE CELULAR E ESTRESSE OXIDATIVO	22
1.5	L-CARNITINA.....	24
2	JUSTIFICATIVA	30
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVOS GERAIS	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	RESULTADOS	32
5	ARTIGO	33
6	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

1.1 MELANOMA

O câncer de pele é o tipo mais comum de câncer no Brasil, correspondendo a 30% de todos os tumores malignos. Sua incidência aumenta anualmente em torno de 0,6%, principalmente entre adultos com idade acima de 50 anos. O câncer de pele inclui os casos de melanoma, carcinoma basocelular (CBC) (176.930 mil casos) e carcinoma espinocelular (CEC) (83.770 mil casos) (APALLA *et al.*, 2017; INCA, 2019).

No Brasil, foi estimado para 2020 cerca de 8.450 mil novos casos de melanoma (4.250 em mulheres e 4.200 em homens) com aproximadamente 1.794 mortes (782 em mulheres e 1.012 em homens) (INCA, 2019). Nos Estados Unidos para o mesmo período foram estimados 100.350 mil novos casos de melanoma e 6.850 mortes (ACS, 2019).

Embora o melanoma represente 3% dos casos de câncer que acomete a pele, é considerado o tipo mais agressivo, devido a sua alta capacidade metastática, o que resulta em um pior prognóstico da doença (BROZYNA *et al.*, 2016; DOMINGUES *et al.*, 2018). O melanoma é uma doença multifatorial e apresenta fatores de risco genéticos e ambientais como: fenótipo da pele, histórico familiar, xeroderma pigmentoso, albinismo, queimaduras solares agudas, intensas e intermitentes (principalmente as áreas mais expostas ao sol), nevo congênito, nevo melanocítico displásico, idade avançada, uso de câmaras de bronzamento artificial por emissão de UV, entre outros (VELHO, 2012; READ, WADT, HAYEARD, 2016).

Todos os melanomas surgem através da transformação maligna dos melanócitos, clinicamente são classificados em quatro principais tipos (LENS, 2008; CCS, 2020):

- ✓ Melanoma extensivo superficial: é o tipo mais comum de melanoma cutâneo, representando cerca de 70% dos casos, aparecendo entre a quarta e quinta década da vida, mais comum em pessoas de pele clara. Aparece preferencialmente nos membros inferiores das mulheres e no

tronco dos homens, devido à exposição solar prolongada e sem proteção. Aparece junto a um nevo pré-existente, tende a apresentar um crescimento radial, crescimento lento, invasão de derme e metástases mais tardias. Quanto às características macroscópicas: geralmente plano e irregular, podendo ocorrer em tons de preto e marrom.

- ✓ Melanoma nodular: é o segundo tipo mais comum dos tipos de melanoma, representando cerca de 10 a 15% dos casos. Tem rápido crescimento, a sua incidência é na meia idade, mais comum no tronco, cabeça e pescoço. Geralmente se desenvolve sem uma lesão pré-existente na pele, por exemplo, o nevo. Quanto às características macroscópicas: é um crescimento elevado que se destaca na pele (polipoide), pode ter a forma de um cogumelo, geralmente é preto, mas às vezes pode ser vermelho, rosa ou da mesma cor da sua pele.
- ✓ Melanoma lentigo maligno: ocorre em aproximadamente 5 a 10% dos casos e afeta principalmente os idosos na sétima década de vida. Afeta principalmente a face (principalmente bochecha e nariz) e pescoço, sendo associado ao longo tempo de exposição solar acumulada. Quanto as características macroscópicas: aparece como uma macha grande, acastanhada ou marrom e borda irregular, tende a ficar mais escuro à medida do seu crescimento. Geralmente começa com um tumor in situ (lentigo melanoma) que é uma forma inicial de crescimento na epiderme.
- ✓ Melanoma lentiginoso acral: diagnosticado em 2 a 8% dos casos em caucasianos e em 30 a 70% dos casos em pessoas de pele escura. Afeta principalmente a palma das mãos e as plantas dos pés (melanoma subungueal) com a incidência na sétima década de vida. Quanto as características macroscópicas: aparece como um pequena mancha plana, geralmente marrom ou preta.

Além desses tipos de melanoma, existem outras formas mais raras como o melanoma lentiginoso da mucosa, melanoma intraocular e o melanoma desmoplásico. O melanoma lentiginoso de mucosa pode ocorrer na mucosa nasal, oral, orofaringe, retal, anal ou vaginal. Este tipo de melanoma não está relacionado com a exposição solar e tende a crescer e sofrer metástase rapidamente, geralmente havendo diagnóstico tardio. O melanoma intraocular

começa nos melanócitos que dão cor ao olho, afeta pessoas mais velhas e com pele mais clara, aparecem como uma mancha escura na íris que pode deixar a visão turva. O melanoma desmoplásico se desenvolve na camada da derme ou no tecido conjuntivo, muitas vezes aparece como um nódulo da mesma cor de sua pele, que se desenvolve principalmente na cabeça, pescoço, tronco ou áreas com mucosa (NCI, 2020).

Para os tipos mais comuns de melanoma, a radiação ultravioleta (UV) é o principal agente etiológico, uma vez que é capaz de induzir danos no material genético celular (MISHRA *et al.*, 2018). Os danos promovidos pela radiação UV resultam em mutações genéticas que induzem a proliferação celular ou favorecem a resistência contra a apoptose, resultando em um predomínio do processo proliferativo local (CHENG, ZANG, LI, 2013; DOMINGUES *et al.*, 2018). Para os casos esporádicos de melanoma são relatadas mutações nos genes *c-KIT*, *RAS* e *BRAF*, sendo que a mutação em *BRAF* é mais comum, chegando a 60% dos casos. Mutações nesses genes permitem a sobrevivência e proliferação celular, a invasão local e a metástase das células tumorais (CHENG, ZANG, LI, 2013; LONG *et al.*, 2014; MISHRA *et al.*, 2018). Há ainda os casos familiares de melanoma onde mutações nos genes *CDK4*, *POT1*, *ACD*, e *TERT* são transmitidas ao longo de gerações favorecendo a transformação maligna dos melanócitos (READ, WADT, HAYEARD, 2016).

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO

As espécies reativas são constantemente produzidas no organismo humano a partir da respiração celular (exemplo: complexo 1 – NADH desidrogenase e complexo 3 – Ubiquinona-citocromo c redutase), da atividade de certas enzimas (Xantina oxidase, Citocromo P450, Ciclooxygenase) e na ação citotóxica de células fagocíticas (MAGDER, 2006). Estas espécies podem ser divididas em radicais livres e compostos não radicalares. Quanto à composição, as mais estudadas são as espécies reativas do oxigênio (ERO) e espécies reativas do nitrogênio (ERN). Os radicais livres são espécies específicas que apresentam um elétron desemparelhado na última camada de valência podendo reagir com outras moléculas. São exemplos de radicais livres o radical

superóxido ($O_2\cdot^-$) e radical hidroxila ($OH\cdot$). Já as espécies reativas não radicalares não possuem elétron desemparelhado. Embora sejam menos instáveis do que os radicais livres, espécies não radicalares também conseguem reagir com outras moléculas, podemos citar como exemplo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MAGDER, 2006; QIANG, 2013; MOLONEY, COTTER, 2018).

A geração dessas espécies em quantidades controladas é importante na manutenção da fisiologia normal, pois desempenham um papel importante em muitas vias de sinalização, como nas vias da angiotensina, do fator de necrose tumoral α (TNF- α), do fator nuclear kappa B (NF κ B), das quinases reguladoras por sinal externo (ERK), das quinases ativadas por mitógenos (MAPK), da fosfoinositida-3-quinase/ proteína quinase B (PI3K/Akt), e na resposta inflamatória (MAGDER, 2006; REUTER *et al.*, 2010; SOSA *et al.*, 2013; HAMBRIGHT *et al.*, 2015; KRYLATOV *et al.*, 2018).

A homeostase das espécies reativas é essencial para a sobrevivência celular e manutenção do metabolismo celular. Esta homeostase é mantida através do balanço redox, que é determinado pelo equilíbrio entre a produção de espécies reativas e neutralização das mesmas pela defesa antioxidante (Fig. 1) (MISHRA *et al.*, 2018; MOLONEY, COTTER, 2018).

O desequilíbrio entre a geração de espécies reativas e as defesas antioxidantes resulta em um processo denominado de estresse oxidativo. Este desequilíbrio resulta em várias modificações bioquímicas decorrentes da reação das espécies reativas com proteínas, lipídeos e DNA, que podem desencadear a morte das células afetadas (REUTER *et al.*, 2010; MISHRA *et al.*, 2018). Uma das modificações bioquímicas é a lipoperoxidação da membrana plasmática, onde uma reação em cadeia entre ROS e lipídeos de membrana resulta na geração de outras espécies reativas como o malondialdeído (MDA), que é considerado um importante marcador de estresse oxidativo (REUTER *et al.*, 2010; MOLONEY, COTTER, 2018).

A defesa antioxidante é composta por moléculas enzimáticas e não enzimáticas. Dentre as defesas enzimáticas podemos citar a Superóxido dismutase (SOD), a Catalase, a Glutathione redutase (GR) e Glutathione Peroxidase (GPx). Já a glutathione (GSH), carotenos, ácido ascórbico (vitamina

C), vitamina D, vitamina E, dentre outros, pertencem aos elementos não enzimáticos (REUTER *et al.*, 2010; MOLONEY, COTTER, 2018; MISHRA *et al.*, 2018).

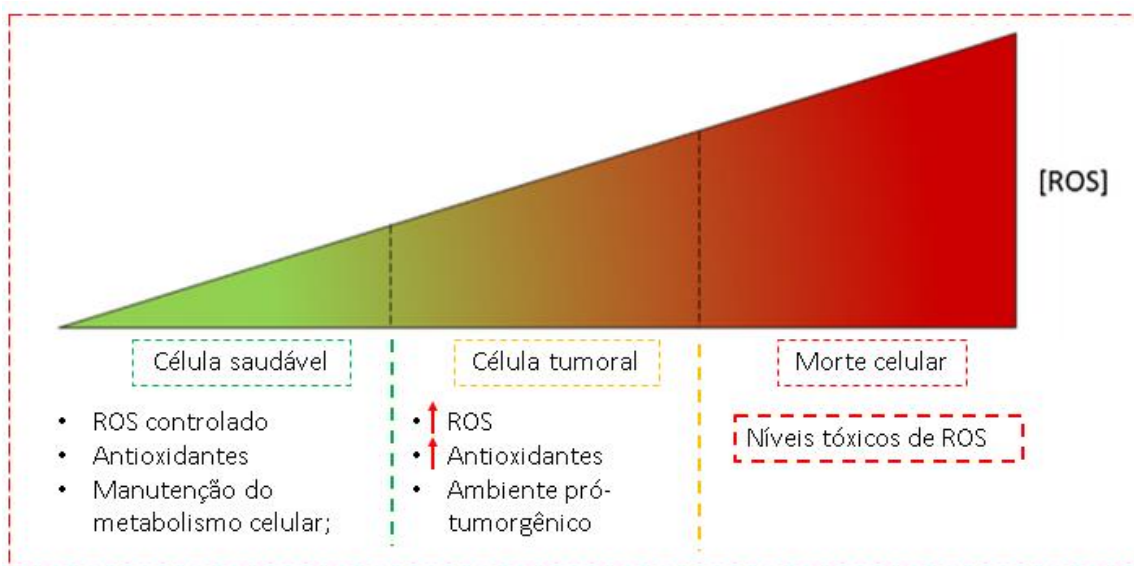


Figura 1 – Efeito do ROS nas células normais e tumorais. Adaptado de: MOLONEY e COTTER, 2018.

A SOD é uma metaloenzima localizada em vários compartimentos celulares, sendo que a SOD1 (Cu/ZnSOD) (dímero) pode estar presente no citosol celular, a SOD2 (MnSOD) (tetrâmero) está presente na mitocôndria e a SOD 3 (Cu/ZnSOD) (tetrâmero) está presente no meio extracelular (FUKAI, USHIO-KUKAI, 2011 *apud* MOLONEY, COTTER, 2018). A principal função desta enzima é reagir com o $O_2^{\cdot-}$ transformando-o em H_2O_2 , sendo a primeira linha de defesa contra esse radical (Fig. 2). Para as reações a SOD 1 e SOD 3 utilizam o cobre (Cu^{2+}) e o zinco (Zn^{2+}) como cofatores, enquanto a SOD 2, utiliza o magnésio (Mg^{2+}) como cofator (MAGDER, 2006; MISHRA *et al.*, 2018).

A catalase é uma enzima encontrada no citosol das células e nos peroxissomos. Ela atua na redução do H_2O_2 em água e oxigênio (Fig. 2). A catalase humana contém quatro domínios distintos e um grupo heme. Durante a reação de redução do peróxido de hidrogênio, a catalase é oxidada para se obter um intermediário de ferro hipervalente que é reduzido ao estado de repouso por uma segunda molécula de H_2O_2 para geração de H_2O e O_2 . A catalase também pode atuar na decomposição de pequenos substratos como o metanol e hidroperóxidos no seu modo peroxidásica, na oxidação do etanol em

acetaldeído, na oxidação do NO e na decomposição do peroxinitrito (KIRKMAN, GAETANI, 2007; GLORIEUX, CALDERON, 2017; MISHRA *et al.*, 2018) .

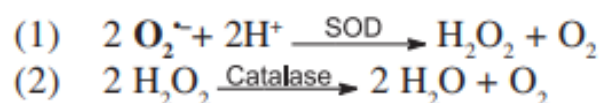


Figura 2 – Reações realizadas pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase. Adaptado de: VASCONCELOS *et al.*, 2007.

O sistema Glutathiona envolve a glutathiona (oxidada e reduzida) e um conjunto de enzimas, como a glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e glutathiona oxidase (GO). A glutathiona é um tripeptídeo de baixo peso molecular composto de cisteína, glicina e ácido glutâmico, sendo que o grupo tiol da cisteína é importante na ação antioxidante, através das ligações de dissulfeto. A glutathiona está presente na forma reduzida (GSH) e na forma oxidada (GSSG). A GSH é convertida em GSSG por ação da enzima GO, uma enzima FAD-dependente que oxida a GSH e outros aminotióis. A GR é responsável pela reconversão do GSSG em GSH. Já a GPx é importante na detoxificação de peróxidos (Fig. 3) (HUBER, ALMEIDA, 2008; WU, BATIST, 2013; OESTREICHER, MORGAN, 2018; MISHRA *et al.*, 2018).

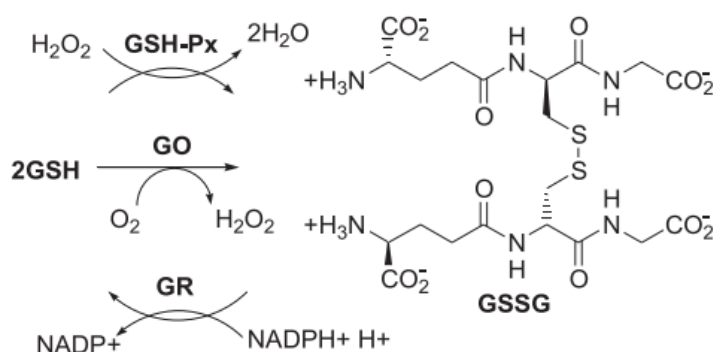


Figura 3 – O sistema glutathiona é formado pelas enzimas glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR), glutathiona oxidase (GO) e pelas formas de glutathiona oxidada (GSH) e reduzida (GSSG). A conversão de GSH para GSSG é realizada pela enzima GO e conversão de GSSG em GSH é realizada pela enzima GR. A GPx é importante na detoxificação de peróxidos. Fonte: HUBER e ALMEIDA, 2008.

Os níveis de alguns antioxidantes intracelulares são regulados por uma rede de vias de sinalização, destas podemos citar a via de sinalização fator nuclear relacionado ao eritróide 2 (Nrf2). Esta via é um regulador emergente da

resistência celular aos oxidantes que afetam diretamente a homeostase de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A ativação desta via aumenta expressão de SOD, catalase e GPx, além de aumentar a produção de GSH (QIANG, 2013; MOLONEY, COTTER, 2018). No citoplasma celular a proteína Nrf2 está normalmente silenciada pela associação com duas moléculas Keap1. Esta associação permite a formação de um complexo que encaminha o Nrf2 para degradação proteossomal (MÁRTON *et al.*, 2018). Em situações de aumento de geração de espécies reativas, as cisteínas presentes em Keap1 são oxidadas, fazendo com que elas se dissociem do Nrf2 (QIANG, 2013; MÁRTON *et al.*, 2018). Uma vez livre, o Nrf2 sofre a ação de quinases recebendo o grupamento fosfato e torna-se um fator de transcrição ativo, que é capaz de chegar no núcleo celular e promover a transcrição de genes que estão envolvidos nas defesas antioxidantes, além de genes cujas proteínas estão envolvidas na desintoxicação de drogas e xenobióticos. Isso permite que a célula se adapte ao estresse oxidativo (Fig. 4) e pare o ciclo celular pela via PERK, caso esteja em divisão ((QIANG, 2013; HAHN *et al.*, 2017; MÁRTON *et al.*, 2018).

Outra via de sinalização envolvida na resposta contra o estresse oxidativo é via de sinalização da p53, (MOLONEY, COTTER, 2018). Quando a célula apresenta níveis elevados de espécies reativas, a p53 modifica a expressão de genes cujas proteínas alteram o ambiente intracelular para um estado pró-oxidativo com o objetivo de induzir a morte celular (GAMBINO *et al.*, 2013). Nesta situação a p53 é modificada pós-traducionalmente através de fosforilação, acetilação e metilação da proteína. Estas modificações a dissociam de seus reguladores negativos, a Mdm2/MdmX, permitindo a proteína p53 não seja destruída pelo sistema proteossomal (LIU, XU, 2011). Desta forma, a p53 se acumula no núcleo e promove seus sinais de parada de ciclo e morte celular (LIU, XU, 2011; GAMBINO *et al.*, 2013).

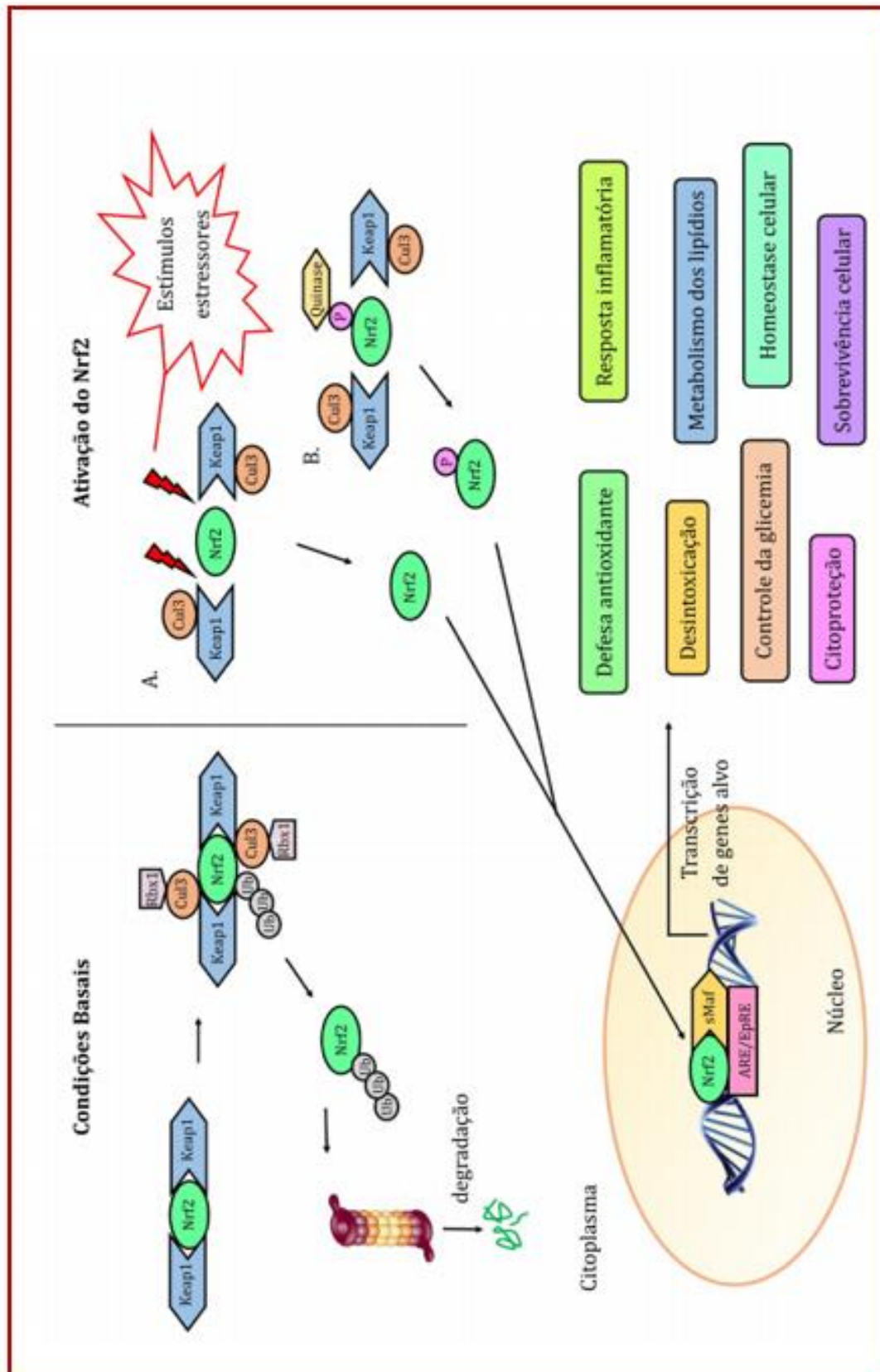


Figura 4 – Via de sinalização do Nrf2 para ativação dos antioxidantes. Fonte: HAHN *et al.*, 2017.

Para muitos tipos de câncer o aumento da geração e manutenção de produção das espécies reativas favorece o processo de carcinogênese. As espécies reativas podem atuar nos estágios de: (i) Iniciação, ao causar lesões no material genético e eventuais mutações; (ii) Promoção, ao induzir mecanismos de sobrevivência e divisão celular; (iii) Progressão: ao ativar vias de sinalização envolvidas na angiogênese e na metástase do câncer (CHIKARA *et al.*, 2018).

Muitas espécies reativas ativam proteínas que estão relacionadas com as vias de proliferação celular (PI3K/Akt, p38 MAP cinase, ERK), adaptação metabólica (efeito Warburg) e manutenção do processo inflamatório (REUTER *et al.*, 2010; SOSA *et al.*, 2013; MISHRA *et al.*, 2018; KRYLATOV *et al.*, 2018). Uma vez que o estresse oxidativo também pode ser utilizado pelas células de defesa imunológica para combater o câncer, é comum no ambiente tumoral ocorra aumento das defesas antioxidantes, na tentativa de evitar a morte das células neoplásicas (REUTER *et al.*, 2010; MOLONEY, COTTER, 2018; MISHRA *et al.*, 2018).

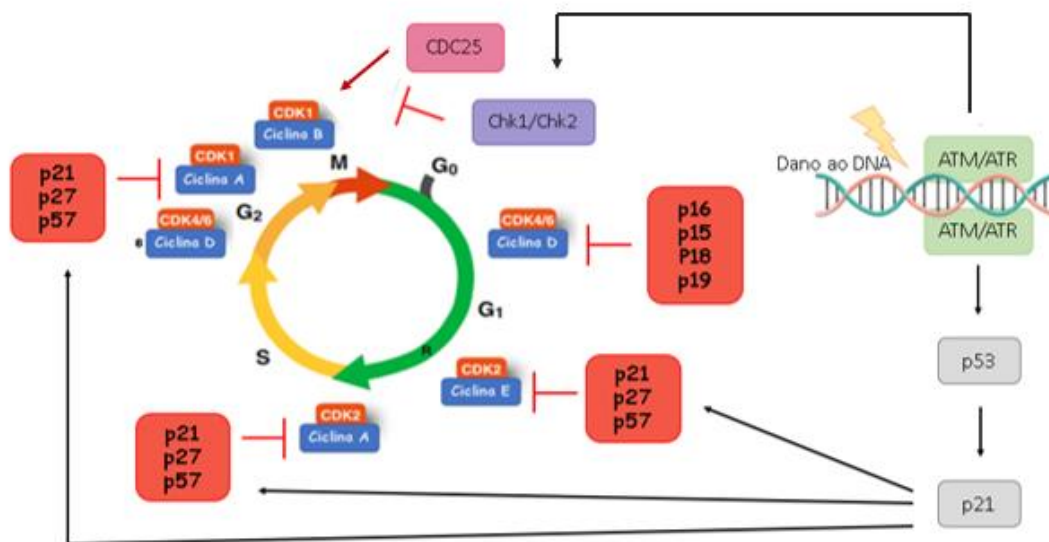
1.3 CICLO CELULAR

O ciclo celular é uma sequência de eventos envolvidos na divisão celular, importante na construção e manutenção dos tecidos em organismos multicelulares (POON, 2016). As células que estão em seu estado de repouso (G0) recebem estímulos oriundos da perda do contato com a célula vizinha, ou da interação das células com fatores de crescimento proteicos ou hormonais, e iniciam o processo de divisão celular (POON, 2016; GAO, LIU, 2019).

Nas células eucarióticas, o ciclo celular é composto pela Interfase e pela Mitose. A interfase é dividida em fase Gap 1 (G1), Síntese (S), Gap 2 (G2) e visa preparar a célula para a Mitose (Fig. 5). Durante a fase G1, a célula sintetiza as proteínas necessárias para que ocorra a replicação do material genético e o crescimento contínuo da célula. Na fase S ocorre a replicação do DNA e é seguida pela fase G2 que verifica a integridade do material genético duplicado e se prepara para a Mitose. A fase M ou Mitose é quando a célula se divide em duas, através dos processos de separação das cromátides irmãs, cariocinese e citocinese. As células filhas podem retornar a fase G1 ou entrar na fase G0 de

acordo com o tipo de estímulo (MENS, GHANBARI, 2018; WENZEL, SINGH, 2018).

A regulação do ciclo celular funciona de uma forma semelhante a um cronômetro e aciona eventos em uma sequência determinada, coordenada pela fosforilação e desfosforilação dos substratos necessários para que ocorra a sua progressão (BOWARD *et al.*, 2016; WENZEL, SINGH, 2018). Cada fase do ciclo é associada a proteínas denominadas de quinases dependentes de ciclinas (Cdks), que funcionam em complexos com as subunidades reguladoras, as ciclinas que se ligam e ativam as Cdks (Fig. 5) (BOWARD *et al.*, 2016; POON, 2016; WENZEL, SINGH, 2018; GAO e LIU, 2019).



* Ciclina D1 geralmente está presente na fase G2 quando o gene RAS está ativo. Devido a isso, a célula ao invés de ir para a fase G0, ela continua a divisão celular na fase G1.

Figura 5 – Fases do ciclo celular, sua regulação e principais pontos de checagem. Adaptado de: WARD, 2002; STACEY, 2010; LOSSAINT *et al.*, 2011; POON, 2016.

Existe um grupo de proteínas inibidoras que atuam impedindo ou regulando negativamente as vias de sinalização da progressão do ciclo celular, estas proteínas são denominadas de proteínas inibidoras das Cdks, ou simplesmente CKIs, e são divididas em duas famílias Cip/Kip que inclui o p21, p27 e p57 e a INK4 (inibidoras de Cdk4/Cdk6) que inclui o p15, p16, p18 e p19 (POON, 2016; WENZEL, SINGH, 2018; GAO, LIU, 2019). Algumas das proteínas da regulação de ciclo celular são susceptíveis ao estresse oxidativo, como é o caso da ciclina D1 (via clássica: regulação da fase G1/S; via

alternativa: regulação da fase G2), da CHK1 (ponto de checagem na fase G2), dentre outras (LOSSAINT *et al*, 2011). O estresse oxidativo também pode parar o ciclo celular de maneira indireta, através da via de sinalização da CDC25 (ponto de checagem da fase G2) e da p53 (ponto de checagem nas fases G1/S e G2) (Fig. 5) (LOSSAINT *et al*, 2011; WILLIAMS, SCHUMACHER, 2016; MÁRTON *et al.*, 2018).

1.4 MORTE CELULAR E ESTRESSE OXIDATIVO

A morte celular é um processo que mantém a homeostase do tecido e elimina células que possam ser prejudiciais, desta forma se mantém um equilíbrio entre o número de células em proliferação e número de células em apoptose (GREEN, LLAMBI, 2015). Existem diferentes padrões de morte celular, as principais são a apoptose e a necrose, mas a necroptose e autofagia também são tipos de morte celular (GREEN, LLAMBI, 2015; D'ARCY, 2019).

A apoptose ocorre em situações patológicas e fisiológicas, podendo ser desencadeada pela via extrínseca ou intrínseca (GREEN, LLAMBI, 2015). Na via extrínseca a célula é induzida a entrar em apoptose através da interação dos receptores de morte na superfície celular (FAS) e seus ligantes. Na via intrínseca, modificações intracelulares como lesão do DNA ou falta de sinalização dos fatores de crescimento podem dar início a apoptose devido à permeabilização da membrana externa da mitocôndria (MAJTNEROVÁ, ROUSAR, 2018). Ambas as vias convergem na ativação de caspases de sinalização e efetoras, sendo que as caspases efetoras estão envolvidas nas modificações morfológicas e características funcionais (ex: inversão da fosfatidil serina na membrana plasmática, fragmentação do DNA na região entre os nucleossomos, cariorrexe e formação dos corpos apoptóticos). Desta forma a célula é eliminada sem afetar as células adjacentes e sem iniciar o processo inflamatório (ELMORE 2007; GREEN, LLAMBI, 2015; MAJTNEROVÁ, ROUSAR, 2018).

O estresse oxidativo é considerado um importante iniciador da apoptose, especialmente quando se observa perda da homeostasia com diminuição dos níveis de GSH intracelular. Nesta situação as espécies reativas ativam a via JNK, as proteínas Bcl-2 e as caspases, além de promover lesões de membrana

mitocondrial facilitando o escape do citocromo c (MOON *et al.*, 2010; MOLONEY, COTTER, 2018). Por este motivo, a sinalização pró-apoptótica induzida pelo estresse oxidativo tem sido alvo de muitos estudos na terapia contra o câncer (MOLONEY, COTTER, 2018).

Em parte, a apoptose induzida pelo estresse oxidativo é iniciada pela oxidação do material genético celular. Um dos marcadores deste tipo de lesão é a 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) ou 8-oxo-7,8-di-hidro-2-desoxiguanosina (8-oxodG) que é observada em danos oxidativos no DNA nuclear e mitocondrial, uma vez que é uma das formas predominantes de lesões oxidativas induzidas por radicais livres (WU *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2016). A 8-OHdG é formada principalmente pela interação do radical hidroxil com a guanina da cadeia de DNA, onde ocorre a formação do grupamento hidroxila na posição número 8 da guanosina (Fig. 6) (WU *et al.*, 2004; VALAVANIDIS, VLACHOGIANNI, FIOTAKIS, 2009; CHENG *et al.*, 2016). A formação 8-OHdG está relacionada com morte celular e com processo de mutagênese (GIROMINI *et al.*, 2016; PONATH, KAINA, 2017; KORKMAZ, BUTUNER, ROGGENBUCK, 2018).

Já no padrão necrótico de morte celular lesões externas, hipóxia ou inflamação sobrepõem a capacidade homeostática celular, fazendo com que a mesma passe pelo ponto de não retorno, não conseguindo mais realizar seus processos bioquímicos chegando a morte. Modificações na permeabilidade de membranas celulares permitem a ativação maciça de proteases e DNases que irão promover as características específicas da necrose: formação de poros na membrana plasmática, destruição do núcleo (picnose, cariorrexe e cariólise), liberação de conteúdo intracelular, ativação da resposta inflamatória e lesão de células adjacentes (D'ARCY, 2019).

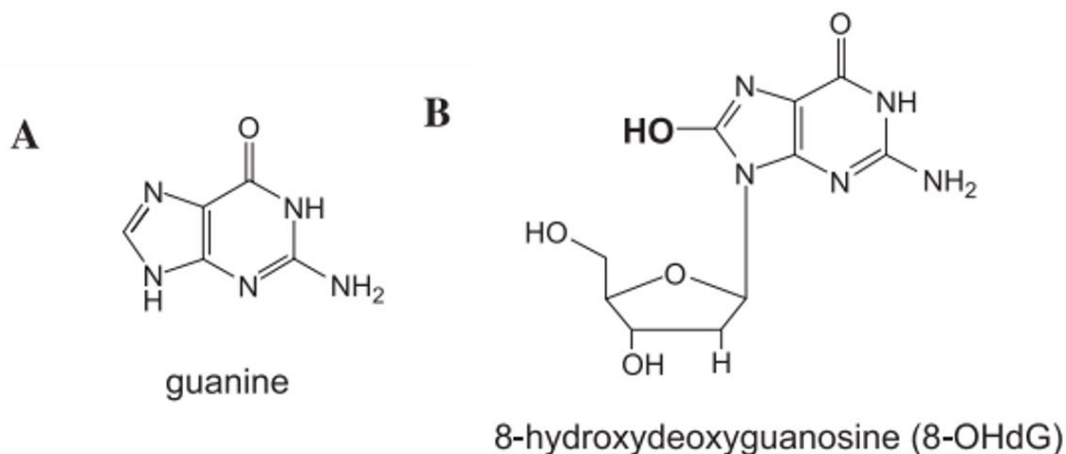


Figura 6 – Estrutura química da (a) guanina e da (b) 8-hidroxi-guanosina (8-OHdG). Adaptado de: WU *et al.*, 2004.

Existem diversas técnicas que detectam a morte celular, como a marcação de células por anexina V e Iodeto de propídeo (IP). Esses corantes são utilizados para diferenciar a apoptose e a necrose por citometria de fluxo. A Anexina V marca células apoptóticas pela ligação a fosfatidilserina (PS) que é observado na superfície interna da bicamada lipídica voltada para o citosol. No início da apoptose, onde a membrana celular ainda está intacta, mas sofre uma desorganização, a PS é translocada para o exterior da bicamada e a anexina V se liga a PS com alta afinidade. Mudanças na conformação da membrana plasmática é analisada através da medição da aderência da anexina V a membrana, podendo identificar o início, o meio e o fim da apoptose. O IP é uma molécula de alta massa molecular que se intercala no DNA desde que a membrana da célula esteja permeável, devido a isso, ela marca células necróticas ou em apoptose tardia (RIEGER *et al.*, 2011).

1.5 L-CARNITINA

A L-Carnitina (LC) ou 3-hidroxi-4-N-trimetil aminobutirato (Fig. 7) é um composto endógeno natural na forma de amina quaternária, solúvel em água, de baixa massa molecular, polar presente na função fisiológica das células dos mamíferos (PEKALA *et al.*, 2011; REUTER, EVANS, 2012; ESFAHANI *et al.*, 2018). A LC existe no organismo em sua maioria na forma não esterificada e nas formas esterificadas como a acetil-L-carnitina (ALC), propionil-L-carnitina (PLC) e a palmitoil-L-carnitina (MOGHADDAS, DASHTI-KHAVIDAKI, 2015).

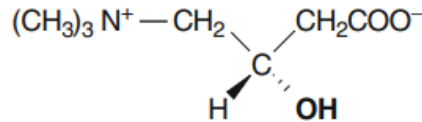


Figura 7 – Estrutura química da L-carnitina. Fonte: REUTER e EVANS, 2012.

Apenas 25% das moléculas de LC são sintetizadas de forma endógena, o restante é adquirido de forma exógena, através de ingestão de alimentos como carnes vermelhas e laticínios (PEKALA *et al.*, 2011; RIBAS, VARGAS, WAJNER, 2014; MOGHADDAS, DASHTI-KHAVIDAKI, 2015). Na síntese endógena a LC é sintetizada a partir dos aminoácidos lisina e metionina, por ação da Lisina metil transferase, formando a 6-N-trimetilisina que é convertida em γ -butirotetaina através de uma série de reações de catalização por enzimas presentes em tecidos específicos (Fig. 8). No fígado e nos rins a γ -butirotetaina é convertida em LC pela ação da enzima γ -butirotetaina dioxigenase (FERREIRA, McKENNA, 2017; ESFAHANI *et al.*, 2018; BELSKY *et al.*, 2018).

Os níveis séricos da LC no sangue variam entre 41 μ M a 50 μ M. Nos músculos esqueléticos ela concentração é cerca de 50 a 200 vezes maior que no plasma sanguíneo, pois são o principal reservatório de LC. A homeostase da LC é mantida através do equilíbrio da absorção, biossíntese, distribuição e excreção pelos rins (REUTER, EVANS, 2012) e a necessidade diária de LC é de aproximadamente 15 mg (PEKALA *et al.*, 2011).

A principal função da LC é ajudar no transporte dos ácidos graxos de cadeia longa (ácidos graxos esterificados) para dentro da mitocôndria para que ocorra a β -oxidação e síntese de ATP (PEKALA *et al.*, 2011; RIBAS, VARGAS, WAJNER, 2014; BELSKY *et al.*, 2018; MELONE *et al.* 2018). Essa função de auxiliar no transporte dos ácidos graxos para dentro da mitocôndria ocorre graças à alta capacidade da LC de formar ligações de alta energia no seu grupo hidroxila com os ácidos carboxílicos, formando as acilcarnitinas (REUTER, EVANS, 2012).

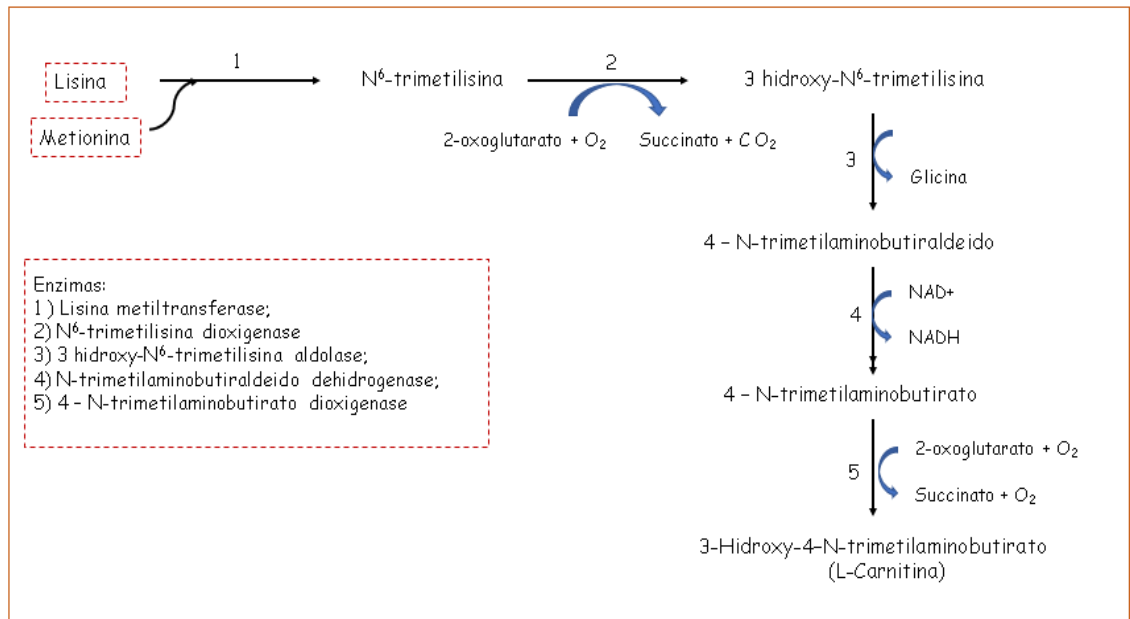


Figura 8 – Biossíntese da L-Carnitina através dos aminoácidos lisina e metionina. Adaptado de: REUTER e EVANS, 2012.

O transporte dos ácidos graxos para dentro da mitocôndria utiliza o “Sistema Carnitina” que é composto das moléculas que catalisam o transporte que são as enzimas Carnitina palmitoiltransferase 1 e 2 (CPT 1 e CPT 2) e o transportador carnitina/acilcarnitina translocase (CACT) (Fig. 8) (PEKALA *et al.*, 2011; MELONE *et al.*, 2018).

Os ácidos graxos quando chegam no citosol celular são convertidos em acil-CoA pela enzima acil-CoA sintase e posteriormente convertidos pela CPT 1 (presente na membrana mitocondrial externa) em acilcarnitinas. As acilcarnitinas atravessam a membrana mitocondrial interna pelo transportador CACT em troca de LC livre. Após isso a enzima CPT 2 (presente na membrana mitocondrial interna) converte as acilcarnitinas em acil-CoA + LC. A LC liberada serve de substrato da CPT 1 para formação de mais acilcarnitinas e o acil-CoA sofre a β -oxidação mitocondrial e libera energia em forma de ATP (Fig. 9) (PEKALA *et al.*, 2011; FERREIRA; McKENNA, 2017; MELONE *et al.*, 2018).

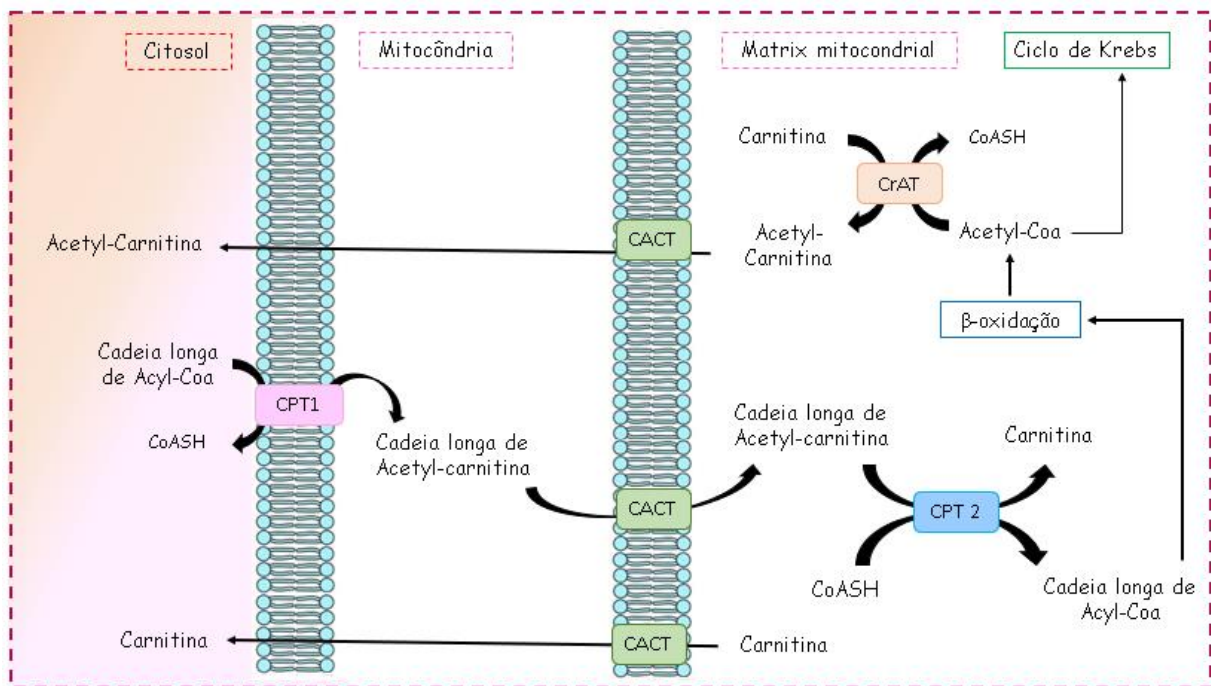


Figura 9 – Sistema carnitina e o transporte de ácidos graxos de cadeia longa através da mitocôndria. Adaptado de: MALONE *et al.* 2018.

Devido a suas propriedades de auxiliar no transporte de ácidos graxos de cadeia longa para a β -oxidação, a LC é utilizada no emagrecimento e como suplemento nas atividades físicas para facilitar a geração de energia no músculo esquelético (NOVAKOVA *et al.*, 2016; ASKARPOUR *et al.*, 2019; GNONI *et al.*, 2020). Para pacientes com caquexia e com câncer, a LC é utilizada para diminuir o estado de fadiga (SILVÉRIO *et al.*, 2011; MATSUI *et al.*, 2018). Para determinadas situações, ela é utilizada como antioxidantes, como na isquemia-reperfusão após AVC (MOGHADDAS, DASHTI-KHAVIDAKI, 2015), doenças cardiovasculares (PEKALA *et al.*, 2011), doença de Alzheimer (FERREIRA, McKENNA, 2017), entre outras. Em geral, a suplementação de LC pode atuar no aumento das concentrações séricas de osteocalcina, promovendo a proliferação e produção de colágeno nas células osteoblásticas (PEKALA *et al.*, 2011), atua na prevenção da osteoporose (PEKALA *et al.*, 2011), previne a deterioração de células nervosas (FERREIRA, McKENNA, 2017), antidepressivo para depressão induzida por estresse (CHERIX, *et al.* 2020), atua na infertilidade masculina (PEKALA *et al.*, 2011), normaliza o estoque de carnitina em músculos esqueléticos nos vegetariano (NOVAKOVA *et al.*, 2016; ASKARPOUR *et al.*, 2019, entre outros.

A atividade antioxidante da LC ocorre de maneira indireta, através do aumento das enzimas catalase, SOD e a GPx, e um outro mecanismo antioxidante é conseguir quelar íons metálicos envolvidos nas formações de ROS, além de ter efeito protetor contra tratamentos com H₂O₂ (Fig. 9) (GULÇIN, 2006; MOGHADDAS, DASHTI-KHAVIDASKI, 2015; ESFAHANI *et al.*, 2018). Em linhagens celulares normais, como as células de hepatócito humano (HL7702), mioblastos de ratos (C2C12) e células epiteliais de córnea humana (HCECs) a LC apresentar um papel protetor contra o dano celular causado por ROS (LI, *et al.* 2012; HUA *et al.*, 2015; BORGNE *et al.*, 2017).

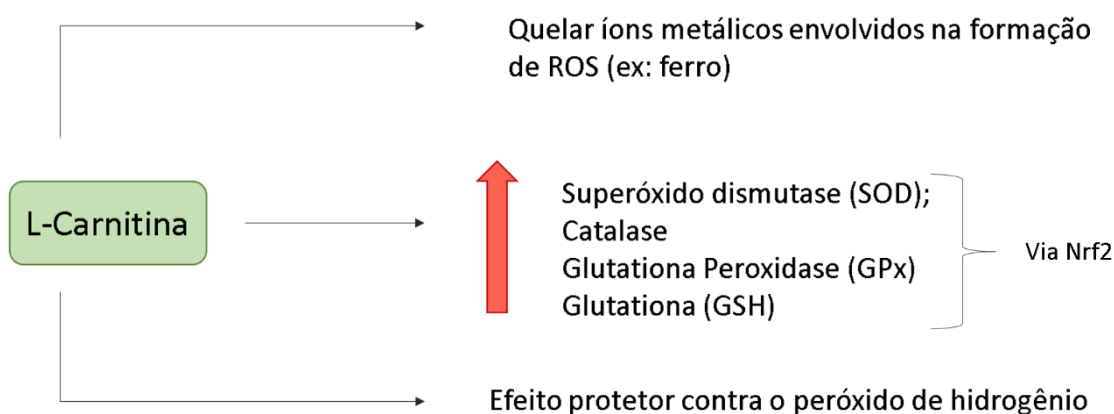


Figura 10 – Efeitos antioxidantes da L-Carnitina (LC) no organismo. Adaptado de SURAI, 2015.

Em células tumorais o efeito da LC não é bem conhecido, uma vez que os estudos que utilizam LC em células tumorais são escassos. Em 2012, Huang *et al.* demonstraram efeito citotóxico da LC sobre a linhagem celular de hepatocarcinoma humano (HepG2) relacionado com o aumento da expressão da proteína p21, com o aumento da acetilação de histonas e de outras proteínas, e com a inibição da histona desacetilase (HDAC - relacionado com a inibição da proliferação e indução de morte celular).

No entanto não se conhece o efeito da LC sobre outros tipos de células neoplásicas, podendo haver situações onde a LC, devido ao seu efeito antioxidante, possa estimular a proliferação das mesmas. Dentro deste contexto, a LC precisa ser estudada no melanoma, uma vez que o melanoma é um tipo de câncer agressivo e de crescimento rápido.

Um dos modelos experimentais bastante utilizados para o estudo do melanoma é o modelo com a linhagem celular B16F10 (melanoma murino) que foi desenvolvida por Fidler (1973), a partir da linhagem de células de melanoma murino B16, por apresentar maior potencial metastático do que as demais linhagens. As células B16F10 podem ser utilizadas para estudos *in vitro* e *in vivo*, em modelo de tumores subcutâneos (VOLTARELLI *et al.*, 2017) e metástases pulmonar (ARIMOTO *et al.*, 2018). Geneticamente as células B16F10 não apresentam mutação em *RAS* e em *BRAF*, não há perda da expressão da proteína PTEN e não há mutação da p53. Devido a deleções de éxons, como o 1 α , 1 β e 2, as células B16F10 não expressam a proteína p16^{*Ink4a*} e nem da p19^{*Arf*}. A inativação do *Ink4a/Arf* nessas células foi o evento marcador do surgimento espontâneo do melanoma murino B16, e após 10 passagens em animais surge a linhagem B16F10 que tem maior capacidade metastática (MELNIKOVA *et al.*, 2004).

2. JUSTIFICATIVA

A L-Carnitina é uma substância natural com a propriedade de auxiliar os ácidos graxos de cadeia longa na β -oxidação. A forma suplementar tem sido utilizada para atividades físicas e para o emagrecimento, assim como em algumas situações clínicas. No entanto, os efeitos desta substância sobre células tumorais são escassos. Por este motivo, o presente trabalho avaliou os efeitos da L-carnitina sobre células de melanoma murino (B16F10), quanto à capacidade de induzir morte ou afetar a proliferação celular e compreender o envolvimento do estresse oxidativo no mecanismo de ação deste composto.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito citotóxico e/ou citostático da L-Carnitina sobre células de melanoma murino (B16F10).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Verificar se a L-Carnitina apresenta efeito citostática ou proliferativo sobre células B16F10 e identificar possíveis pontos de parada no ciclo celular;
- ✓ Verificar se a L-Carnitina apresenta efeito citotóxico e identificar o padrão de morte sobre células B16F10;
- ✓ Avaliar se a L-Carnitina é capaz de modificar o balanço redox das células B16F10 e correlacionar com os efeitos biológicos observados.

4. RESULTADOS

Neste trabalho realizamos o tratamento das células B16F10 com L-Carnitina (LC) nas concentrações 10, 20, 50, 100 e 200 mM. A partir da concentração LC 20 mM observamos diminuição significativa do número de células em comparação ao controle. O aumento do tempo de replicação celular também foi significativo a partir da concentração LC 50 mM e a diminuição da viabilidade foi observada a partir da LC 100 mM.

Em relação a parada de ciclo celular, LC 50 mM aumentou o número de células na fase S, já as concentrações LC 100 e 200 mM induziram parada entra a fase G2/M. A LC 200 mM foi capaz de induzir apoptose, aumentar a lipoperoxidação de membrana plasmática, aumentar defesas antioxidantes totais e GSH e diminuir a atividade da SOD e da catalase. Estes resultados referentes a indução de estresse oxidativo foram confirmados através de marcações com imunocitoquímica, que revelou aumento de marcação nuclear para 8-hidroxi-guanosina, Nrf2 e p53.

Para verificação dos efeitos da L-Carnitina em células normais utilizamos fibroblastos murinos (NIH-3T3). Para esta linhagem celular as concentrações testadas de LC não foram capazes de promover efeito citotóxico ou citostático, nem induzir estresse oxidativo.

5. ARTIGO

O presente trabalho originou um artigo científico, que foi realizado na Universidade Estadual de Londrina, nos laboratórios de Patologia Molecular e no laboratório de Fisiopatologia e Radicais Livres.

O trabalho intitula-se “*Involvement of oxidative stress on cytotoxic and cytostatic effect of L-Carnitine on murine melanoma cells (B16F10)*”

Revista para submissão: Pigment cell & Melanoma Research (4.172), A2, Ciências.

Submission guidelines:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/1755148x/homepage/forauthors.html>

Involvement of oxidative stress on cytotoxic and cytostatic effect of L-Carnitine on murine melanoma cells (B16F10).

Isabela Chagas Silva¹, Liara Freitas Cavalcanti², Thiago Henrique Daniel do Nascimento¹, Virgínia Marcia Concato³, Fernanda Paschoal Blegniski⁴, Larissa Juliani Sanches¹, Wander Rogério Pavanelli³, Rubens Cecchini², Alessandra Lourenço Cecchini¹, Rodrigo Cabral Luiz^{1*}

¹Laboratory of Molecular Pathology, ²Laboratory of Pathophysiology and Free radicals, ³Laboratory of Immunoparasitology of neglected diseases and cancer, ⁴Pathophysiology Laboratory of Muscular Adaptations, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, UEL, Londrina, PR, Brazil.

Corresponding author: Rodrigo Cabral Luiz, email: rc.luiz@gmail.com, FAX: +55 (43) 3371-4267, Phone: +55 (43) 3371-4529.

Laboratório de Patologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, Km 380 Campus Universitário, Londrina, CEP 86051-990, Paraná, Brazil.

Abstract

L-carnitine (LC) is an endogenous compound in the form of quaternary amine that assists in the transport of long-chain fatty acids into the mitochondria for β oxidation. As a complement, this molecule has been used as an antioxidant in Alzheimer's disease and after repercussions of ischemia after stroke, in patients with cancer and cachexia, sports, obesity, among others. Its effect on cancer cells is little known, there are reports of a cytotoxic effect on human liver cancer (HepG2) cells, but it is not known whether this molecule can promote cell proliferation or cytotoxicity on other types of cancer cells. For this reason, the present study evaluated the cytotoxic and cytostatic effect of L-carnitine on murine melanoma cells (B16F10) since melanoma is one of the most aggressive and lethal types of cancer. We tested LC in concentrations ranging from 10 to 200mM for 24h. In the LC 20 mM, we observed a decrease in the number of cells and in the LC 100 mM and 200 mM there was a decrease in cell viability. There was an increase in cells in the S phase (LC 50 mM) and in the G2 phase (LC100 and 200 mM) and an increase in cell apoptosis (LC 200 mM). In LC 100 and 200 mM, we observed an induction of oxidative stress, revealed by an increase in lipoperoxidation and glutathione levels, with a reduction in the activity of superoxide dismutase and catalase. Oxidative stress was confirmed by an increase in the nuclear labelling of 8-hydroguanosine (LC 50 mM) and Nrf2 (LC 20 mM). Immunocytochemical staining also revealed an increase in nuclear labelling of p53 (50 mM LC). On the other hand, tests with LC were not able to induce the cytotoxic, cytostatic effect or generate oxidative stress in murine fibroblast cells (NIH-3T3). Our results indicate that LC can induce an effect on cells B16F10 and that this effect is promoted, at least in part, by the generation of oxidative stress.

SIGNIFICÂNCIA

Key words: Melanoma, L-carnitine, reactive species, cell cycle arrest, apoptosis.

Introduction

L-carnitine (LC) is a natural water-soluble quaternary amine with low molecular weight [1]. In mammalian cells, the main physiological function of LC is to assist in the transport of long-chain fatty acids to mitochondria for beta-oxidation for ATP synthesis of [2,3]. LC has been used or proposed as a nutritional and pharmaceutical supplement for weight loss [4], muscle energy generation during physical exercises [5], reducing the fatigue state in patients with cancer [6], and cachexia [7]. It presented a protective effect against ischemia-reperfusion injuries in stroke [8], cellular damage in vascular diseases [9], due to antioxidant properties [11]. LC. It has also been proposed in therapeutic approaches against male infertility [9], as an antidepressant [12], among others.

There is little information about the interaction of LC with cancer cells. Up to date, there are two studies reporting a cytotoxic effect of LC on human hepatoma HepG2 cells [13,14]. For other types of cancer it is not known whether this molecule can have an antiproliferative and/or cytotoxic effect or may exert a pro-carcinogenic effect. For this reason, the present work decided to highlight melanoma.

Melanoma represents only 3% of skin cancer cases, but it is considered one of the most aggressive types of cancer due its high capacity for invasion and metastasis. According to the American Cancer Society (ACS), the incidence of melanoma in the United States is estimated at 100,350 new cases for the year 2020 [15]. Regarding melanoma, there are no reports in the scientific literature about its behavior towards LC. It is known that melanoma is a disease with a strong involvement of oxidative stress, and that stress markers remain elevated even after years after surgical removal of the tumor [16]. To begin the scientific approach on the effects of LC on melanoma, the present work used murine melanoma B16F10 cells as an experimental model and evaluated the cytotoxic capacity of LC, correlating this effect with oxidative stress generation.

Materials and methods

Cell Culture

The present work used murine melanoma B16F10 (donated by Glaucia Regina Martinez – UFPR Curitiba, Paraná, Brazil) and murine fibroblast NIH-3T3 cell lines for the experiments. These cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's Medium medium (DMEM, Gibco, Thermo Fisher, USA), mixed with supplemented with 1% penicillin / streptomycin (Santa Cruz, Biotechnology, USA) and 10% FBS. For the experiments, the cells were seeded at an initial density of 2×10^5 cells/well or 2×10^5 cells/mL and cultured (24 h, 37°C, 5% CO₂)(Sanyo CO₂ Incubator; Sanyo, Japan).

L-Carnitine treatment

L-Carnitine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was used in concentrations ranging from 10 to 200 mM for 24 h. At the end of experimental time cells were collected by trypsinization for evaluation of cell viability, cell cycle, cell death and oxidative stress parameters (SOD, catalase, TRAP, QL and GSH). The culture medium was used to measure hydrogen peroxide (H₂O₂) levels. For immunocytochemistry, cells were seeded on circular coverslips in 24-well plates. A control group without L-carnitine treatment was also performed.

Cell counting

Trypan blue exclusion assay was performed by counting total number of cells and differential counting of nonviable (blue stained) cells. Cells were trypsinized, centrifuged (600 xG, 5 min, 24° C), resuspended in PBS and counted in the Neubauer chamber. The total cell count of the 4 chamber quadrants was performed and then the differential counting. Results were expressed as total number of cells and percentage (%) of inviable cells. The doubling time was calculated using the online Doubling time Calculator (<http://www.doubling-time.com/compute.php>).

Cytotoxicity assay

The evaluation of cytotoxic effects was performed using MTT assay based on Mosmann (1983) with modifications SANCHES; MARINELLO et al. (2017). After 24h of treatment, the cells were washed with PBS and the (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) was diluted in DMEM 10% medium, incubated for 30 minutes and read in spectrophotometer (Multiscan Go; Thermo Scientific, USA) at 540nm. The results were expressed as a percentage (%) of cell viability.

Flow cytometry

B16F10 cells were seeded at a density of 2×10^5 cells / well in 6-well plates and treated with L-Carnitine for 24 hours. After 24 h, cell suspension was centrifuged and the cell pellet resuspended in 300 μ L of PBS. After processing, cell cycle and cell death tests were performed.

For apoptosis detection, a mix containing 1 μ L of annexin-V FITC and 5 μ L of PI (Santa Cruz Biotechnology) (20 min, 24°C) were used. For cell cycle arrest, a solution containing 0.05% ribonuclease A (RNase A) (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added (30 min, 37°C). A solution of 0.1% sodium citrate and 1% Triton-X100 were added with 50 μ g/ml propidium iodide (PI) (Sigma, St. Louis, MO, USA) (30 min). The DNA content was analyzed, and the percentage of cells in different phases of the cycle (G0/G1, S, and G2/M) were estimated according to the fluorescence intensity. Both tests were analyzed on the Muse Cell Analyzer (Merck Millipore) flow cytometer, with 5000 events and the results were analyzed using the Muse Cell Analyzer™ software.

Oxidative stress parameters

After 24h of treatment with LC, 1×10^6 cells were mechanically lysed in PBS buffer or TRIS-HCl 0.26 M pH 7 buffers (only for cell lysis used for the sod test) with ULTRA TURRAX® to obtain total homogenate. For CL test, the total homogenate was used and for SOD, GSH, TRAP and catalase tests the samples were centrifuged (10,000 xG, 10 min, 4°C) to obtain supernatant for analysis.

The evaluation of the total antioxidant capacity (TRAP) was carried out according to Repetto (1996). The supernatant samples were analyzed in a luminometer (GloMax® 20/20) adjusted to 5 readings / sec with 0.1 M glycine buffer pH 8.6, 215 μ M luminol, 200 mM ABAP and 0.025 mM Trolox. The results were expressed in trolox μ M.

The technique to detect superoxide dismutase (SOD) activity described by Marklund & Marklund (1974) was performed on the 420nm spectrophotometer (UV-1650 PC® UV-vis spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan) with TRIS 1 M buffer, pyrogallol and distilled water. SOD activity was expressed in units of SOD per milligram of protein.

The catalase test according to Aebi (1984) was performed on the spectrophotometer at 240 nm in the UV microplate reader (Multiscan Go; Thermo Scientific, USA) with TRIS 1M HCl buffer, distilled water and 200 mM H₂O₂ solution. The results were expressed as absorbance / min / milligram of protein.

The chemiluminescence induced by tert-butyl hydroperoxide (CL) described by Gonzalez-Flecha (1991) was performed on a luminometer (Berthold Technologies; Lumat 3; LB 9508) with 10 mM phosphate buffer pH 7.4 (NaCl 0.9%) , 1mM hemin solution and tert-butyl solution. The results were expressed in areas under the curve (AUC).

Analyses of GSH and H₂O₂ were performed using a luminometer (Berthold Technologies; Lumat 3; LB 9508). were treated with 50 mM ferricyanide solution, luminol (4.5 mM) , 0.2 mM sodium carbonate buffer (Na₂CO₃), GSH (10 mM). For the GSH test, cells at a concentration of 1x10⁶ were precipitated with sulfosalicylic acid (10%) in the proportion of 2: 1, centrifuged at 3500 rpm for 10 minutes and neutralized with sodium hydroxide (8%). The reading was performed with the supernatant, and the results were expressed as μM of GSH. For the measurement of H₂O₂, the culture medium was collected and processed according to the GSH technique. The results were expressed in μM H₂O₂.

The analyzes of GSH and H₂O₂ were performed on the luminometer (Berthold Technologies; Lumat 3; LB 9508) through the luminol-potassium ferricyanide system described by Shevlin & Neufeld (1968). Luminol reacts with ferricyanide and oxygen to form 3-aminophthalate, which emits light that is proportional to the concentration of the analyzed analytes. Then, oxidation of GSH and H₂O₂ by potassium ferricyanide occurs, producing chemiluminescence proportional to the concentration of the analytes. Peroxides that escape from cytosolic catalase can be measured in the culture medium, and intracellular GSH can be measured by the same technique, after degradation of intracellular peroxides by catalase. The reagents used in this technique were 4.5 mM ferricyanide solution, luminol (10 mM) prepared in 0.2 M sodium carbonate (Na₂CO₃) buffer, pH 9.5, GSH standard curve at concentrations 1, 2 and 4 μM and 0.3, 1 and 2 μM H₂O₂. For both techniques, the samples underwent processing and preparation before reading. The samples were precipitated with acid and 900 μL of the supernatant was neutralized with 111 μL sodium hydroxide (8%) (amount needed to raise the pH close to 8. For the GSH test, 400 μL of cells were used to perform the precipitation of proteins with sulfosalicylic acid (10%) in the proportion of 2:1, centrifuged at 3,500 rpm for 10 minutes After precipitation, 400 uL of the supernatant was removed and neutralized with 8% sodium hydroxide (NaOH) to avoid interferences in the reading reaction. The neutralized supernatant was diluted 5x in distilled water and the reading was performed for this dosage. For the H₂O₂ test, the culture media treated after 24 hours and processed according to the technique described above (precipitation and neutralization) were used. no dilution was performed for this reading, the results were expressed in μM H₂O₂. At the time of reading each analyte, its standard curve (GSH 1, 2 and 4 μM and H₂O₂ 0.3 was performed) , 1 and 2 μM).

The total protein test was performed according to Miller modified Lowry (1954), using cupric reagent, bovine serum albumin (100 μg / mL) and 1x10⁶ cell suspension. The total protein technique was used to correct the SOD, catalase and CL techniques. For the SOD and catalase tests, the samples were mechanically lysed, centrifuged 10,000 xG, 10 min, 4°C) and only the supernatant was used. For the CL test, the cells were mechanically lysed and the total homogenate was used. The readings were analyzed at 660 nm (Multiscan Go; Thermo Scientific, USA).

Immunocytochemistry

Cells were cultured in 24-well plates (2x10⁵ cells) on circular glass coverslips for immunocytochemistry analysis using the streptavidin biotin-labeled method (LSAB KIT DAKO, Japan). The coverslips were incubated with primary antibodies (anti-p53 1: 250, anti-NRF2 1: 100 and anti-8-OHdG 1:100, Cell Signaling) and secondary antibody (Anti rabbit-HRT). They were later stained with Harry's hematoxylin (Meck, Germany) for contrast and analyzed in a photomicroscope (OlympusBX41, Olympus Optical Co, Ltd, Japan). The images were analyzed randomly and blindly using photos of the fields at 200x amplification. The variation of the markings in relation to the control was verified and presented graphically in percentage (%).

Statistical analysis

Parametric data obtained from SOD, CAT, CL, cell count, doubling time, GSH, H₂O₂, p53, Nrf2, and MTT of NIH3T3 cells were expressed as mean \pm standard error of the mean and analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). Parametric data from cell death and cell cycle were analyzed using two-way ANOVA followed by the analysis of intergroup differences by the Tukey post test. Nonparametric data obtained from MTT, TRAP and 8-OH-dg were expressed as median and analyzed using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-test (for labeling on B16F10 cells). Results were considered statistically significant with a p-value <0.05. Data analyzes were performed using GraphPadPrism (version 6; San Diego, CA, USA).

Results

3.1 L-Carnitine decreases the viability of B16F10 cells

B16F10 cells were treated with LC 10, 20, 50, 100 and 200 mM for 24h. Compared to control (p = 0.5089) LC was not able to reduce or increase the percentage of nonviable cells (Fig. 1A), but was able to reduce total cell counting in a dose-dependent manner (p <0.0001) (Fig 1A), and increase the doubling time (p <0.0001) of B16F10 cells. The MTT assay revealed a significant decrease in cell viability for LC 100 and 200 mM (p <0.0001) (Fig. 1B).

3.2 L-Carnitine promotes cell cycle arrest and apoptosis in B16F10 cells

Staining with PI revealed a significant cell cycle arrest in phase S for LC 50 mM (p <0.0312) and in phase G2 for LC 100 mM (p <0.0452) and 200 mM (p <0.0295) (Fig. 2A). LC 200 mM also increased the rate of apoptotic cells (p <0.0001) (Fig. 2B).

3.3 Oxidative stress parameter in B16F10 cells treated with L-Carnitine

The chemiluminescence (CL) test induced by tert-butyl hydroperoxide demonstrated a significant increase in membrane lipid peroxidation at LC 200 mM (p <0.0001) (Fig. 3A). LC was not able to generate peroxides (Fig. 3B).

The TRAP test showed a significant increase in low molecular weight antioxidants for LC 200 mM (p <0.0001) (Fig. 3C), with increased levels of GSH (p <0.0001) (Fig. 3D). On the other hand enzymatic defenses were affected by LC treatment, LC 100 and 200 mM reduced the levels of SOD (Fig. 3E), and catalase (Fig. 3F).

3.4 Increase of 8-OHdG, Nrf2 and p53 after LC treatment in B16F10 cells

LC 50 mM (p <0.0272), 100 and 200 mM (p <0.0001, for both) increased the percentage of cells with nuclear labeling for 8-OHdG compared to the control (Fig. 4A). Nrf2 nuclear labeling increased for LC treatment (LC 20 mM p <0.01), 50 - 200 mM p<0.0001) (Fig. 4B). LC also increased nuclear labeling for p53 (LC 50 mM p <0.0099), 100 mM (p <0.0007) and 200 mM (p <0.0001) (Fig. 4C).

3.5 Evaluation of cytotoxic, cytostatic effect and presence of oxidative stress in NIH-3T3 cells after treatment with L-Carnitine

In murine fibroblasts NIH-3T3 cells LC showed completely different results. In comparison with the control, LC treatment did not affect the percentage of non viable cells (Fig. 5A), cells counting (Fig. 5B), cell viability (Fig. 5C). LC also did not induce cell cycle arrest (Fig. 5D) or apoptosis (data not shown). Even the higher concentration of LC did not induce membrane lipid peroxidation.

4. Discussion

Studies on the effect of LC on tumor cells are extremely scarce. Huang et al (2012) [15] demonstrated that LC, at concentrations between 1.25 and 10 mM, had cytostatic effects for human liver cancer cells (HepG2) by inducing cycle arrest in the G1 phase, that was associated with histone acetylation and increased p21 [18]. Here we observed that LC presented cytostatic effects to murine melanoma cells (B16F10) only for 10 times higher concentrations.

Huang et al (2012), demonstrated a decrease in cell proliferation from LC at concentrations 1.25 mM and 10 mM, but with low levels of cell death. In our study, we observed that LC affected the cell viability of B16F10 cells at concentrations of LC100 and 200 mM with a decrease in the number of cells from LC20 mM. When the cell death assay was performed, an increase in apoptosis was observed only in the cells treated with LC200 mM, which may affect the cytostatic effect of LC in B16F10 cells. Unlike Huang et al (2012) [14], we observed the cytostatic effect and cycle stop in the S phase at the LC50mM concentration and stop in the G2 phase at the LC100 and 200 mM concentrations. These results indicate that L-carnitine was not able to induce the proliferation of B16F10 cells. On the other hand, it was able to induce cell death in these cells by inducing oxidative stress.

Oxidative stress is an imbalance between the generation of reactive species and antioxidant defenses, resulting in reactions of the reactive species with proteins, lipids and DNA, which can trigger the death of the affected cell [19,20]. One of the biochemical changes observed is the membrane lipid peroxidation due to a chain reaction between ROS and the membrane lipids [21,22]. In this work, we observed that high doses of L-carnitine was able to induce plasma membrane lipid peroxidation in B16F10 cells. We can conclude that the B16F10 cells tried to respond to the stress generated by LC, but depending on the concentration, the cell is not able to prevent or reverse oxidative damage resulting in apoptosis.

Considering that in LC20 we already observed an increase in the nuclear labeling of Nrf2, involved in the cellular response against oxidative stress [23] we can understand that there is an involvement of oxidative stress generation on LC effects. In addition to inducing the production of antioxidant defenses in the cell, Nrf2 is also capable of making other cellular signals such as the cycle arrest, once it induces the expression of the p21 and p27 genes [21]. The protein p21, for example can induce S phase arrest [24,25]. Cyclin D1, Chk1 and p53 [24,26,27] are also oxidative stress sensitive molecules that are involved in cell cycle arrest, and we observed increased nuclear labeling for p53, especially for higher concentrations of LC that showed cytotoxic effect with apoptosis induction [21,22].

Cellular biomolecules suffer severe oxidative damage [29], being an important direct and indirect initiator of cell death, especially apoptosis. Directly, oxidative stress promotes lesions in the cell and mitochondrial membranes, and DNA. Here we observed increased lipid peroxidation and also increased labeling for 8-OHdG, a biomarker of DNA oxidative lesion [29, 30]. Indirectly, oxidative stress activates signaling pathways involved apoptosis, such as p53 [20,25]. We must highlight that mitochondria is very important to this process by releasing pro-caspases, cytochrome C, apoptosis inducing factor (AIF) and protease activating apoptotic factor 1 (APAF-1) to the cytoplasm [31]. The main function of LC is the transport of long-chain fatty acids to the mitochondria for energy generation [1,4]. As there is little information about subcellular location of the LC, we evaluated the molecular structure of the LC in the admetSAR tool [32]. This tool estimated that the subcellular location of the LC is the mitochondria (57.57%), revealing that in B16F10 cells the interaction of LC with mitochondria can directly or indirectly induce oxidative stress.

Regarding the cytotoxic effect observed for LC 100 and 200 mM. Initially we tried to understand the intracellular location of the LC, for this we which agrees with This suggests that LC accumulates in the mitochondria, an important site for the generation of reactive species. For B16F10, the cytotoxic effect has a strong correlation with the increase in apoptosis cells, this ability of LC to induce apoptosis has also been observed in HepG2 cells [14].

As this result we would expect to see an increase in the dosage of H₂O₂ [L4] in the culture medium for treatments with high concentrations of LC, which was not observed. However, we cannot rule out that H₂O₂ generation is taking place, but that it is being detoxified or being converted into other reactive species. H₂O₂ is a stable reactive oxygen species, with a low reaction speed constant, but actively participates in the generation of highly reactive molecules that are capable of interacting with biological membranes. Of these we have the hydroxyl radical (OH) generated from H₂O₂ in the presence of iron and other transition metals [22, 34]. The high reactivity of the hydroxyl radical can be seen in the increase in membrane lipoperoxidation [22,33,34] that we observed for the highest doses of LC. The presence of the formation of the OH radical was also revealed when we observed an increase in the percentage of nuclear labelling of 8-OHdG, which results from the reaction of OH with DNA guanosines [30,35,36].

To contain the reactive species, the cell tends to activate its enzymatic antioxidant defense system, mainly SOD and catalase, and non-enzymatic, mainly the glutathione system [24,26,27]. For the glutathione system, we could observe that the B16F10 cell tries to compensate for the oxidative stress generated by LC increasing GSH levels. An important signaling pathway that promotes the increase of GSH is the nuclear Factor pathway related to erythroid 2 (Nrf2). In situations of oxidative stress, the Nrf2 protein can reach the nucleus of the cell to activate the cellular defense mechanisms [21,37]. In this way we can notice that the levels of GSH are strongly related to the nuclear labelling of Nrf2, so we can say that the cell is responding to a process of oxidative stress.

For the enzymatic antioxidant defenses studied, we observed a reduction in SOD and catalase. In our work, this phenomenon may be related to their intense reaction with the reactive species that are being generated. SOD is responsible for converting the superoxide radical (O₂⁻) into H₂O₂, so that H₂O₂ is converted into water and oxygen by the action of catalase. The singlet oxygen (¹O₂) generated during lipoperoxidation [38] is able to inhibit the activity of SOD and catalase, as well as high levels of H₂O₂ are also capable of inhibiting Cu / Zn-SOD and Fe-SOD [33] taking into account all the results discussed so far, we can conclude that LC may be able to induce oxidative stress in B16F10 cells.

To verify that the tested concentrations were able to induce changes in normal murine cells, we evaluated the same concentrations of LC in NIH-3T3 fibroblasts. In this cell line, LC was not able to induce oxidative stress and cytotoxicity. This difference is probably related to the metabolic differences of the tested strains, since neoplastic cells usually present metabolic adaptations to meet the demands of protein synthesis and genetic material for the constant cell divisions [39].

We can conclude that some of the biological effects of LC depend on the cell line tested. In any case, both for B16F10 and NIH-3T3, we did not observe a favor of cell proliferation, which brings greater tranquility regarding the use of the substance. What we observed was the induction of apoptosis promoted by the generation of oxidative stress in B16F10 cells. Therefore, even though LC is known as an antioxidant [1,6,8], it can induce oxidative stress in certain cell types, depending on the dose used. The next step is to see if the effects of LC on B16F10 cells can also be seen in an in vivo model.

References

- [1] ESFAHANI, M.;SAHAFI, S.; DERAKHSHANDEH, A.; MOGHADDAS, A. The anti-wasting effects of L-Carnitine supplementation on cancer: experimental data and clinical studies. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**. 2018; 27(3): 503-511.
- [2] BELSKY, J. B.; WIRA,C. R.; JACOB, V.; SATHER, J. E.; LEE, P. J. – A review of micronutrientes insepsos: the role of thiamine, L-carnitine, vitamin C, selenium and vitamin D. *Nutrition Research Reviews*, 2018, 31,281-290.

- [3] MELONE, M. A. B.; VALENTINO, A.; MARGARUCCI, S.; GALDERISI, U.; GIORDANO, A.; PELUSO, G. The carnitine system and cancer metabolic plasticity. **Cell Death and Disease**. 2018, 9: 228.
- [4] ASKARPOUR, M.; HADI, A.; MIRAGHAJANI, M.; SYMONDS, M. E.; SHEIKHI, A.; GHAEDI, E. Beneficial effects of L-carnitine supplementation for weight management in overweight and obese adults: an updated systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. **Pharmacological Research**. 2019, 17: 151:104554.
- [5] GNONI, A.; LONG, S.; GNONI, G. V.; GJUDETTI, A. M. Carnitine in human muscle bioenergetics: can carnitine supplementation improve physical exercise? **Molecules**. 2020, 25 (1): pii E182.
- [6] MATSUI, H.; EINAMA, T.; SHICHI, S.; KANAZAWA, R.; SHIBUYA, K.; SUZUKI, T.; MATSUZAWA, F.; HASHIMOTO, T.; HOMMA, S.; YAMAMOTO, J.; TAKETOMI, A.; ABE, H. L-carnitine supplementation reduces the general fatigues of cancer patients during chemotherapy. **Molecular and Clinical Oncology**. 2018, 8(3): 413-416.
- [7] SILVÉRIO, R.; LAVIANO, A.; FANELLI, F. R.; SEELAENDER, M. L-Carnitine and cancer cachexia: clinical and experimental aspects. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**. 2, 37-44, 2011.
- [8] MOGHADDAS, A.; DASHTI-KHAVIDAKI, S. Potential protective effects of L-Carnitine against neuromuscular ischemia-reperfusion injury: from experimental data to potential clinical applications. **Clinical Nutrition**. 2015, 1-8.
- [9] PEKALA, B.; PATKOWSKA-SOKOLA, B. BODKOWSKI, R.; JAMROZ, D.; NOWAKOWSKI, P.; LOCHYNSKI, S.; LIBROWSKI, T. L-Carnitine: Metabolic functions and meaning in human life. **Current Drug Metabolism**. 2011, 12, 667-678.
- [10] FERREIRA, G. C.; MCKENNA, M.C. L-Carnitine and acetyl-L-carnitine roles and neuroprotection in developing brain. **Neurochemical Research**. 2017, 42(6): 1661-1675.
- [11] GULÇIN, I. Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine. **Life Science**. 2006, 78 (8), 803-811.
- [12] CHERIX, A.; LARRIEU, T.; GROSSE, J.; RODRIGUES, J.; McEWEN, B.; NASCA, C.; GRUETTER, R.; SANDI, C. Metabolic signature in nucleus accumbens for anti-depressant-like effects of acetyl-L-carnitine. **eLIFE**, 2020 10;9. pii: e50631.
- [13] HUANG, H.; LIU, N.; GUO, H.; LIAO, S.; LI, X.; YANG, C.; LIU, S.; SONG, W.; LIU, C.; GUAN, L.; LI, B.; XU, L.; ZHANG, C.; WANG, X.; DOU, Q. P.; LIU, J. L-Carnitine is an endogenous HDAC inhibitor selective inhibiting cancer cell growth in vivo and in vitro. **Plos One**. 2012, vol 7, issue 11.
- [14] HUANG, H.; LIU, N.; YANG, C.; LIAO, S.; GUO, H.; ZHAO, K.; LI, X.; LIU, S.; GUAN, L.; LIU, C.; XU, L.; ZHANG, C.; SONG, W.; TANG, B. P.; DOU, Q. P.; LIU, J. HDAC inhibitor L-Carnitine and proteasome inhibitor Bortezomib synergistically exert anti-tumor activity in vitro and in vivo. **Plos one**. 2012, vol 7. Issue 12.

- [15] American Cancer Society – Key Statistics for Melanoma Skin Cancer, 2019. Available in: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/key-statistics.html> Accessed in: 03/02/2020 às 10h.
- [16] SANTOS, B.; SOUZA-NETO, F. P.; PASQUAL, G. M.; 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?. **Tumour Biology : the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, 11 Feb 2016, 37(8):10753-10761.
- [17] SANCHES LJ, MARINELLO PC, PANIS C, et al. Cytotoxicity of citral against melanoma cells: The involvement of oxidative stress generation and cell growth protein reduction. *Tumour Biol.* 2017;39(3):1010428317695914. doi:10.1177/1010428317695914
- [18] GAO, S.; LIU, F. Novel insights into cell cycle regulation of cell fate determination. **Journal of Zhejiang University – SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**. 2019 20(6): 467-475.
- [19] REUTER, S.; GUPTA, S. c.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and câncer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**. 49(11): 1603-1616, 2010.
- [20] MISHRA, R.; PATEL, H.; YUAN, L.; GARRETT, J. T. – Role of reactive oxygen species and targeted therapy in melanoma. *Cancer Research Frontiers*. 2018; 4(1): 101-130.
- [21] MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. Ros signalling in the biology of câncer. *Seminars in cell & developmental biology*. 2018, 80: 50-64.
- [22] HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford Science Publications. Third Edition, 1999. pg 55 and 82.
- [23] MÁRTON, M.; TIHANYI, N.; GYULAVÁRI, P.; BÁNHEGYI, G.; KAPUY, O. NRF2-regulated cell cycle arrest early stage of oxidative stress response mechanism. **Plos One**. 2018; 13(11).
- [24] LOSSAINT, G.; BESNARD, E.; FISHER, D.; PIETTE, J.; DULIC, V. Chk1 is dispensable for G2 arrest in response to sustained DNA damage when the ATM/p53/p21 pathway is functional. **Oncogene**. 30 (41): 4261-74, 2011.
- [25] GAMBINO, V.; MICHELE, G. VENEZIA, O.; MIGLIACCIO, P.; DALL’OLIO, V.; BERNARD, L.; MINARDI, S. P.; FAZIA, M. A. D.; BARTOLI, D.; SERVILLO, G.; ALCALAY, M.; LUZI, L.; GIOGIO, M.; SCRABLE, H.; PELICCI, P. G.; MIGLIACCIO, E. Oxidative stress activates a specific p53 transcriptional response that regulates cellular senescence and aging. **Aging Cell**. 2013, 12 (3): 435-445.
- [26] POY, C. W.; CHOI, J. H.; OH, S. M.; CHOI, S. Y. Oxidative stress-induced cyclin D1 depletion and its role in cell cycle processing. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects**. Vol 1830 (11): 5316-5325, 2013.
- [27] BURH, P. M.; HEINTZ, N. H. Redox regulation of cell-cycle re-entry: cyclin D1 as a primary target for the mitogenic effects of reactive oxygen and nitrogen species. **Antioxidants & Redox Signaling**. 7(5-6), 741-751, 2005.
- [28] MOON, D.; KIM, M.; CHOI, Y. H.; HYUN, J. W.; CHANG, W. Y.; KIM, G. Y. Butein induces G2/M phase arrest and apoptosis in human hepatoma câncer cells through ROS generation. **Cancer Letters**. 2010, vol 288, issue 2, 204-213.

- [29] KRISHNENDU S.; JOYDEEP, D.; PABITRA, B. P.; PARAMES, C. S. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. 87, 1157-1180, March 2013.
- [30] VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG): A critical Biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. **Journal of Environmental Science and Health. Part C**, 27: 120-139, 2009.
- [31] KANNAN K1, JAIN S.K. Oxidative stress and apoptosis. **Pathophysiology**. 2000 Sep;7(3):153-163.
- [32] FEIXIONG CHENG, WEIHUA LI, YADI ZHOU, JIE SHEN, ZENGRUI WU, GUIXIA LIU, PHILIP W. LEE, YUN TANG. ADMETSAR: a comprehensive source and free tool for evaluating chemical ADMET properties. *J. Chem. Inf. Model.*, 2012, 52(11): 3099-3105. Available on: <http://lmmmd.ecust.edu.cn/admetsar1/home/>
- [33] FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Defesas e estresse oxidativo. **Medicina**. Vol 43, n.1, pg 61-68, 1997.
- [34] GUPTA, D. Methods for determination of antioxidant capacity: a review. **Internacional Journal of Pharmaceutical Science and Research**. Vol 6, n. 2, pg 546-566, 2015.
- [35] CHENG, G.; XIAOFEN, L.; RONG, W.; JIEKAI, Y.; MINFENG, Y.; LINGNA, M.; SUZHAN, Z.; SHU, Z. Association between oxidative DNA damage and risk of colorectal cancer: sensitive determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by UPLC-MS/MS Analysis. **Scientific Reports**. (6), 2016.
- [36] WU, L. L.; CHIOU, C. C.; CHANG, P. Y.; WU, J, T. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. **Clinica Chimica Acta**. Vol 339, Issue 1-1, January 2004, Pg 1-9.
- [37] QIANG MA. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. 2013, 53: 401-426.
- [38] RUSSELL, G.A. Deuterium-isotope effects on the autoxidation of aralkyl hydrocarbons. Mechanism of the interaction of peroxy radical. *Am. Chem. Socl.*, 79, 3871-3877, 1957.
- [39] GARCIA, S. R.; GONZALEZ, J. S. L.; BÉZ-VIVEROS, J. L.; CAZARES, D. A.; GARCIA, H. P. Tumor cell metabolism: An integral view. 2011 Dec 1; 12(11): 939-948.

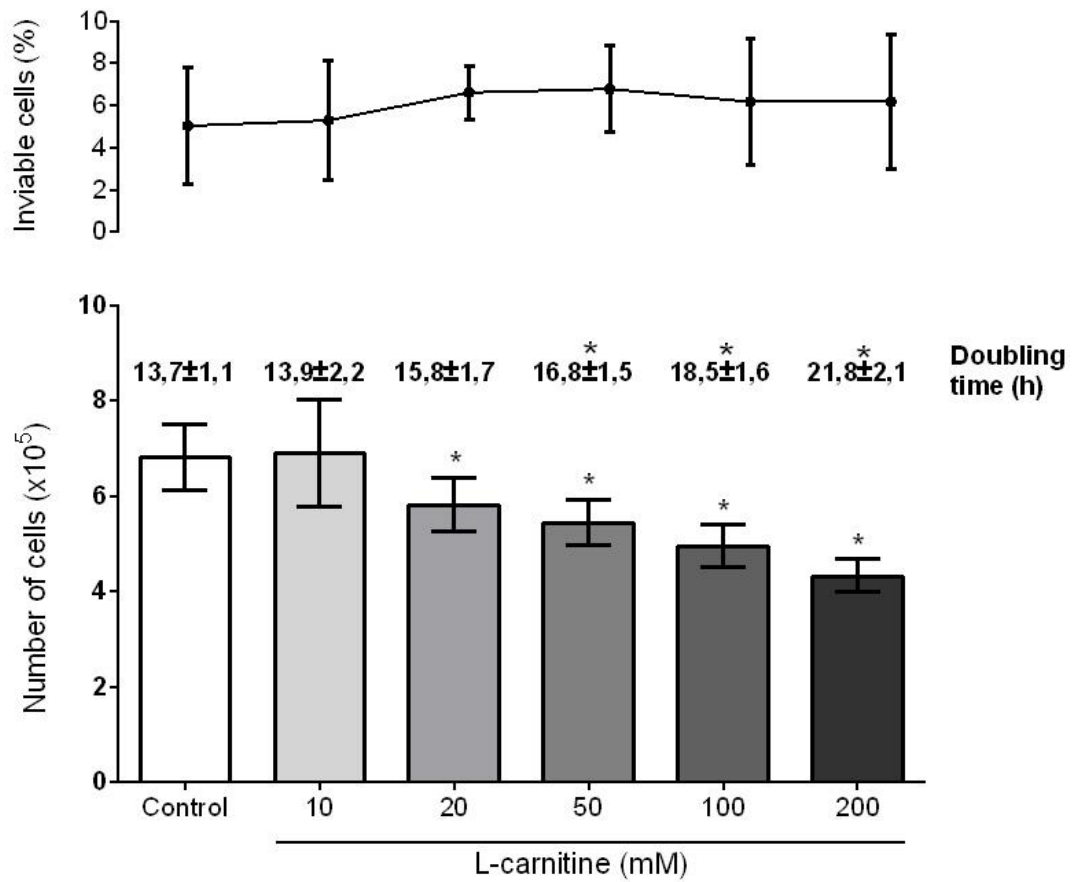
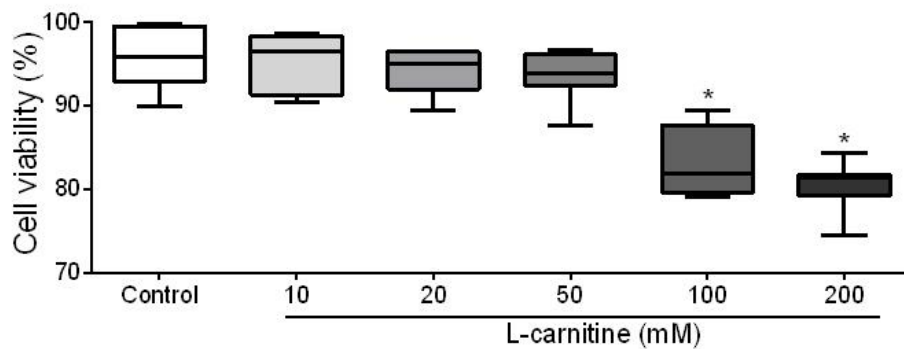
A**B**

Figure 1. Cell counting and cell viability of B16F10 murine melanoma cells treated with L-carnitine (10 – 200 mM) for 24 hours. (A) Percentage of blue stained inviable cells, doubling time (h) and total number of cells at the end of the treatment. (B) Cell viability revealed by MTT assay. The data from graph A were expressed as mean \pm standard error, while graph B were expressed median. Different compared to control, $p < 0.05$.

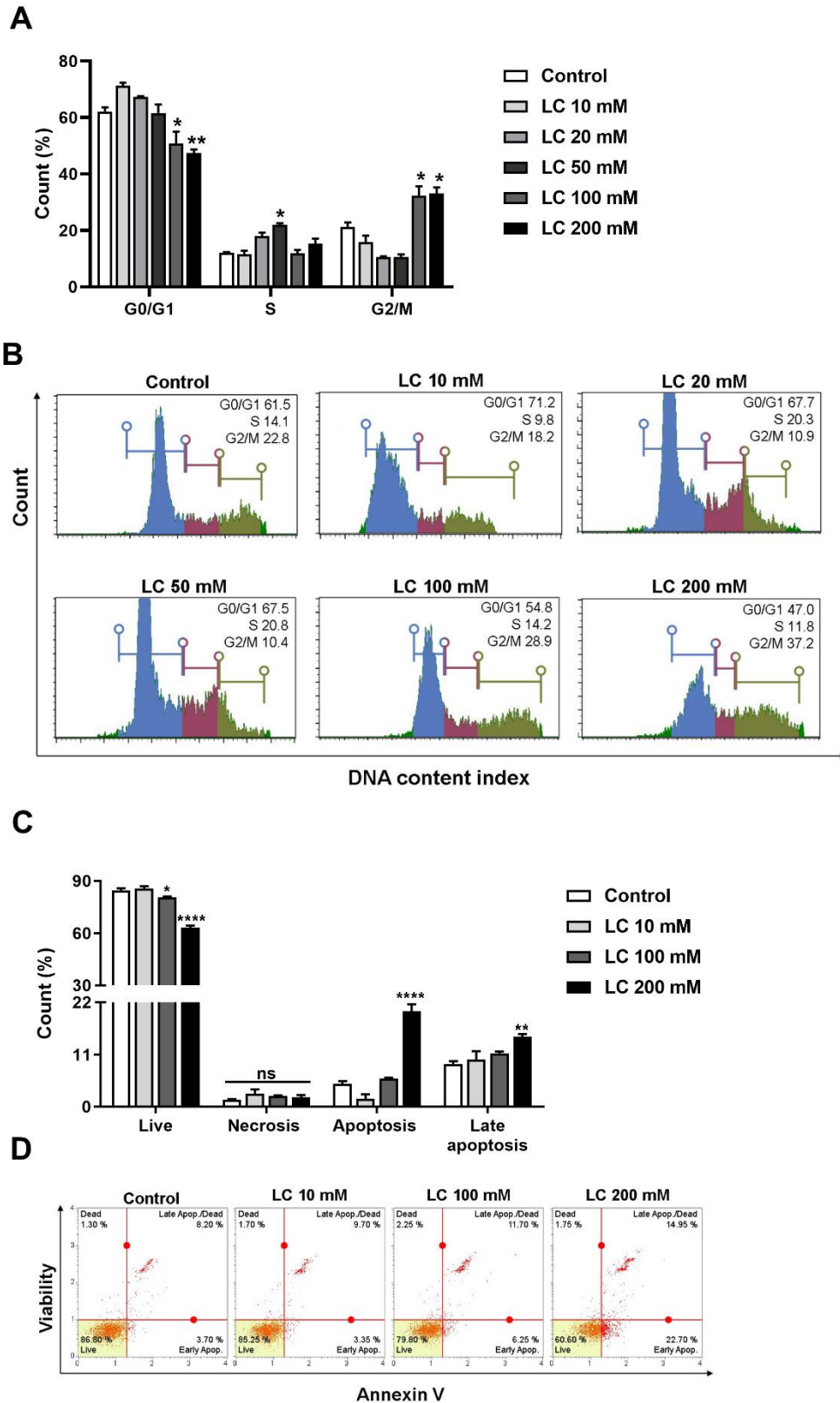


Figure 2. Cell cycle arrests and apoptosis induction observed in B16F10 murine melanoma cells treated with L-carnitine (10 – 200 mM) for 24 hours. (A) Cell cycle arrest. (B) Representative histogram of cell cycle analysis. (C) Apoptosis assay. (D) Representative flow images. Data are expressed as mean \pm standard error of mean. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$.

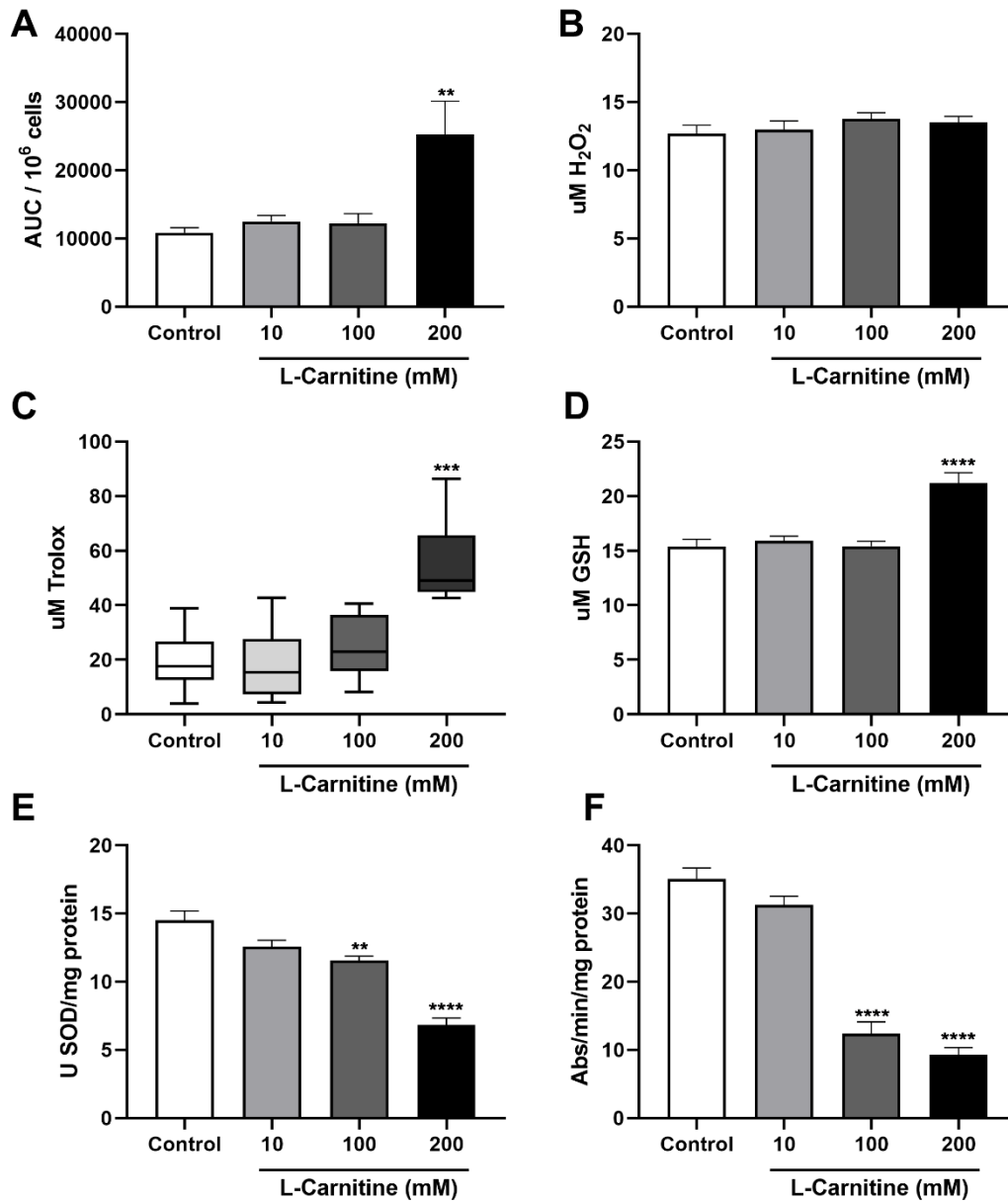


Figure 3. Oxidative stress parameters in B16F10 murine melanoma cells treated with L-carnitine (10 – 200 mM) for 24 hours. (A) Area under the curve (AUC) obtained by tert-butyl hydroperoxide-induced chemiluminescence (CL) test. Data are expressed as mean \pm standard error. (B) Hydrogen peroxide (H₂O₂) levels. (C) Total Antioxidant Capacity (TRAP), in comparison to Trolox. (D) Glutathione (GSH) levels. (E) Units of Superoxide dismutase (SOD). (F) Catalase activity. The data from graph A, C, D and E are expressed as mean \pm standard error, while graph B were expressed as median. * p<0,05, ** p<0,005, *** p<0,0005, **** p<0,0001.

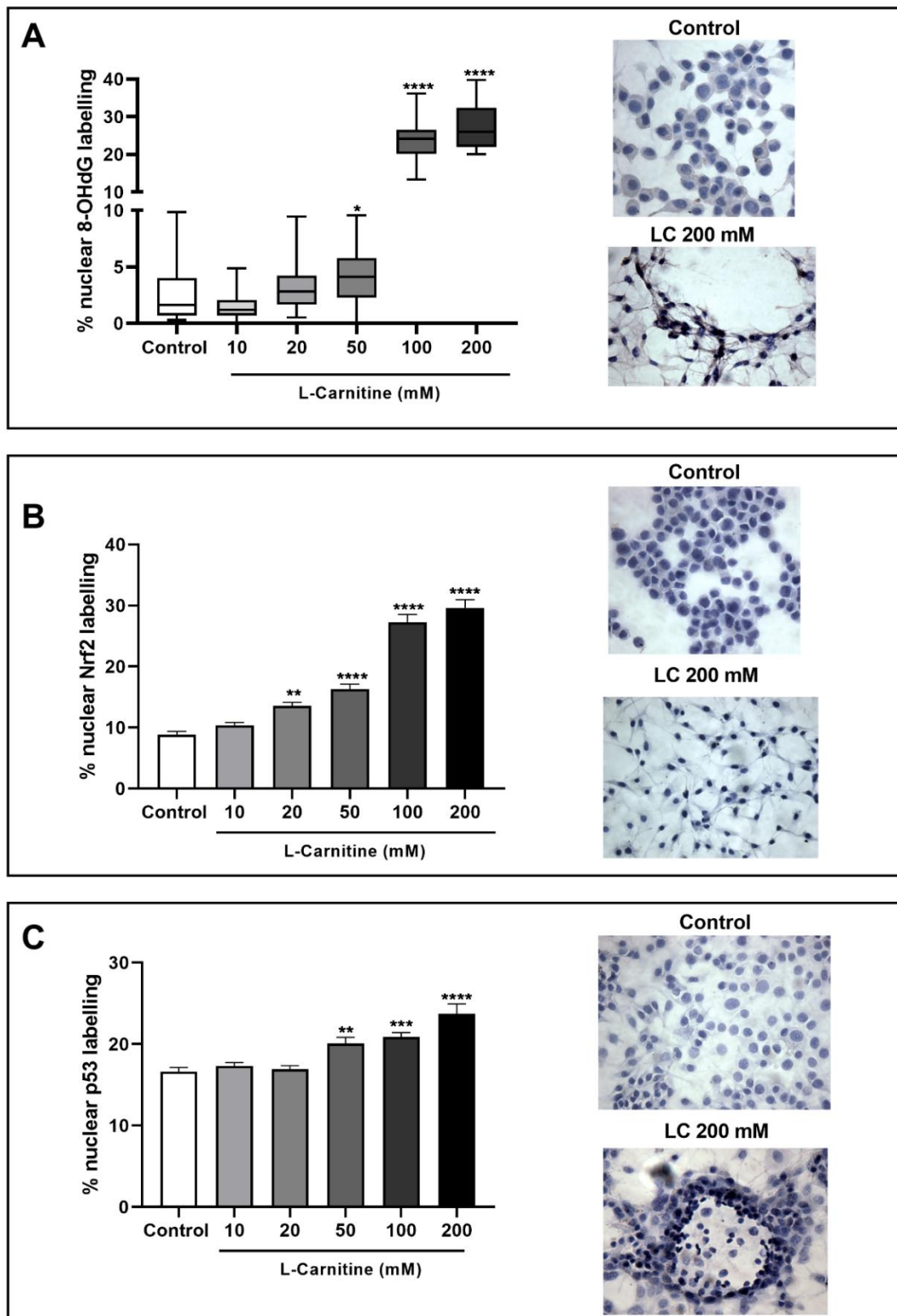


Figure 4. Immunocytochemistry analysis of B16F10 murine melanoma cells treated with L-carnitine (10 – 200 mM) for 24 hours. (A) Percentage of nuclear labelling for 8-hydroxiguanosine (8-OHdG) and representative photomicrographs (200X) Data are expressed as median. (B) Percentage of nuclear labelling for Nrf2. and representative photomicrographs (200X). (C) Percentage of nuclear labelling for p53 and representative photomicrographs (200X). The data from graph A were expressed as median, while graph B and C are expressed as mean \pm standard error. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$.

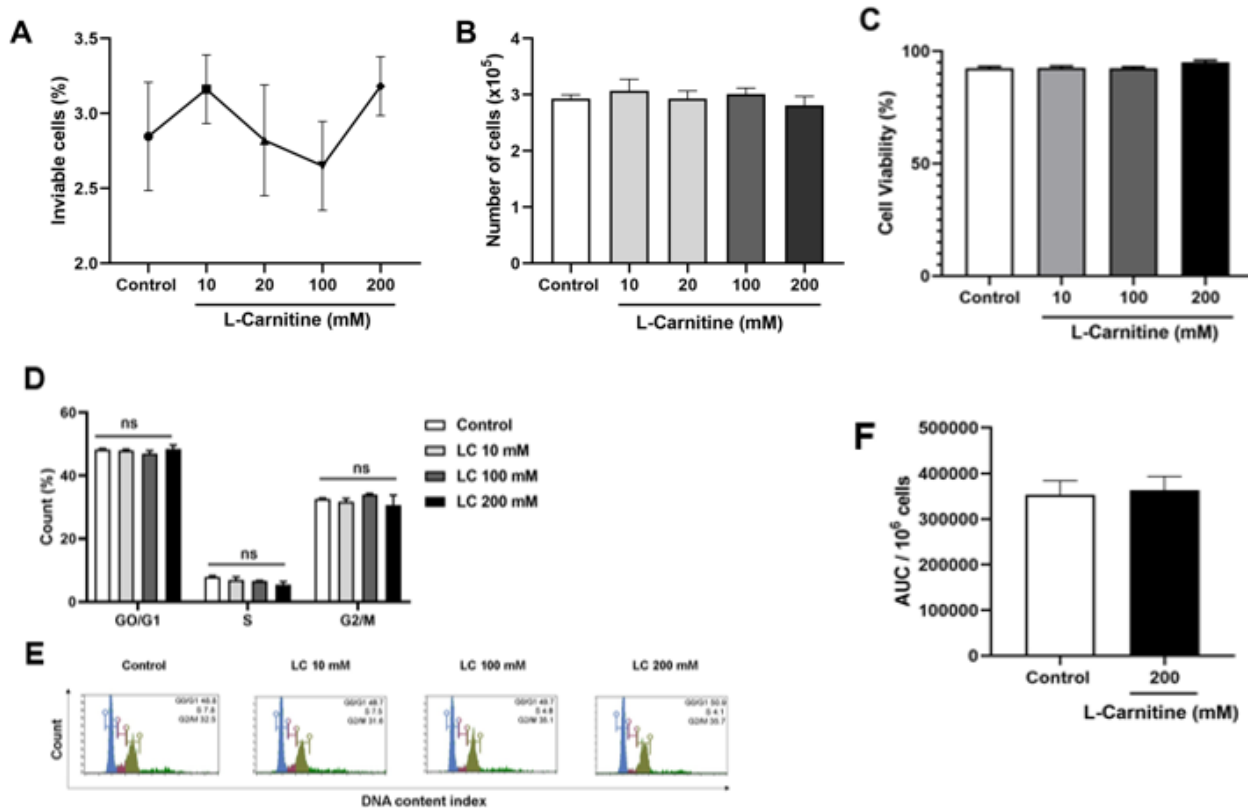


Figure 5. Cell counting and viability, cell cycle analyses and oxidative parameters for murine fibroblasts NIH-3T3 treated with L-carnitine (10 – 200 mM) for 24 hours. (A) Number of cells at the end of treatment. (B) Inviability cells (C) Cell viability revealed by MTT assay. (D) Cell cycle arrest. (E) Representative histogram of cell cycle analysis. (F) (A) Area under the curve (AUC) obtained by tert-butyl hydroperoxide-induced chemiluminescence (CL) test. Data are expressed as mean \pm standard error.

6. CONCLUSÃO

Foi verificado que a L-carnitina apresenta um efeito citostático sobre as células B16F10 após verificar que há parada de ciclo na fase G2/M das células após tratamento com a maior concentração de LC.

O efeito citotóxico da L-Carnitina foi verificado nas duas maiores concentrações, onde há diminuição da viabilidade celular das mitocôndrias (teste de MTT), há diminuição do número de células e aumento de morte celular, caracterizado pela apoptose e também o aumento da p53, que pode estar associada em encaminhar a célula para apoptose quando não há reparo da lesão.

Houve presença de estresse oxidativo representado por alterações dos parâmetros avaliados, como presença de lesão celular, aumento de 8-OHdG, aumento de Nrf2, aumento da defesa antioxidante de baixo peso molecular, caracterizado pelo aumento de GSH e diminuição das enzimas SOD e catalase quando tratadas com as maiores doses de LC. Ainda não se sabe se sabe ao certo se o aumento do estresse oxidativo nas células B16F10 seja de forma direta ou indireta.

Este trabalho traz novas informações de que a LC não induz proliferação em células de melanoma, mas é capaz de induzir a apoptose e parada de ciclo celular por ter efeito citotóxico e citostático nas células B16F10. Verificamos que nas altas concentrações de LC testadas, há indução de estresse oxidativo, o que não é observado o mesmo efeito nos fibroblastos murinos (NIH-3T3). Devido a isso, há necessidade de verificar se os efeitos da LC sobre as células B16F10 é reprodutível em um modelo *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Cancer Society – Key Statistics for Melanoma Skin Cancer, 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/key-statistics.html> Acessado em: 03/02/2020 às 10h.
- APALLA, Z.; NASAHN, D.; WELLER, R. B.; CASTELLSAGUÉ, X. – Skin Cancer: Epidemiology, disease burden, pathophysiology, diagnosis, and therapeutic approaches. **Dermatol Therapy**. v.7(1), p. 5-19, 2017.
- ARIMOTO, A.; YAMASHITA, K.; HASEGAWA, H.; SUGITA, Y.; FUKUOKA, E.; TANAKA, T.; SUZUKI, S.; KAKEJI, Y. Immunosuppression induces by perioperative peritonitis promotes lung metastasis. **Anticancer Research**. 38(7):4333-4348, 2018.
- ASKARPOUR, M.; HADI, A.; MIRAGHAJANI, M.; SYMONDS, M. E.; SHEIKHI, A.; GHAEDI, E. Beneficial effects of L-carnitine supplementation for weight management in overweight and obese adults: na updated systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. **Pharmacological Research**. 2019, 17: 151:104554.
- BELSKY, J. B.; WIRA, C. R.; JACOB, V.; SATHER, J. E.; LEE, P. J. – A review of micronutrientes in sepsis: the role of thiamine, L-carnitine, vitamin C, selenium and vitamin D. *Nutrition Research Reviews*, 2018, 31,281-290.
- BORGNE, F. L.; RAVAUT, G.; BERNARD, A.; DEMARQUOY, J. L-Carnitine protects C2C12 cells against mitochondrial superoxide overproduction and cell death. **World Journal of Biological Chemistry**. 8 (1): 85-94, 2017.
- BOWARD, B.; WU, T.; DALTON, S. Controlo f cell fate through cell cycle and pluripotency networks. **Stem Cells**. 2016, 34(6): 1427-1436.
- BROZYNA, A. A.; JÓZWICKI, W.; ROSZKOWSKI, K.; FILLIPIAK, J.; SLOMINSKI, A. T. – Melanin content in melanoma metastases affects the outcome of radiotherapy. **Oncotarget**. v.7(14): 17844-17853, 2016.
- CCS – Canadian Cancer Society. Types of melanoma skin cancer, 2020. Disponível em: <https://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/skin-melanoma/melanoma/types-of-melanoma/?region=on> Acessado em 21 de março de 2020 às 18 horas.
- CHENG, G.; XIAOFEN, L.; RONG, W.; JIEKAI, Y.; MINFENG, Y.; LINGNA, M.; SUZHAN, Z.; SHU, Z. Association between oxidative DNA damage and risk of colorectal câncer: sensitive determination of urinary 8-hydroxi-2'-deoxyguanosine by UPLC-MS/MS Analysis. **Scientific Reports**. (6), 2016.
- CHENG, Y.; ZANG, G.; LI, G. – Targeting MAPK pathway in melanoma therapy. **Cancer Metastasis Rev**. 2013 32:567-584.
- CHERIX, A; LARRIEU, T.; GROSSE, J.; RODRIGUES, J.; McEWEN, B.; NASCA, C.; GRUETTER, R.; SANDI, C. Metabolic signature in nucleus accumbens for anti-depressant-like effects of acetyl-L-carnitine. **eLIFE**, 2020 10;9. pii: e50631.
- CHIKARA, S.; NAGAPRASHANTHA, L. D.; SINGHAL, J.; HORNE, D.; AWASTHI, S.; SINGHAL, S. S. – Oxidative stress and dietary phytochemicals: role in câncer chemoprevention and treatment. **Cancer Letters**. 413 1220134, 2018.
- D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology**. 43: 582-592, 2019.
- DOMINGUES, B. LOPES, J. M. SOARES, P. PÓPULO, H. – Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy**. 2018: 7 35-49.
- ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**. 2007, 35(4): 495-516.

ESFAHANI, M.; SAHAFI, S.; DERAKHSHANDEH, A.; MOGHADDAS, A. The anti-wasting effects of L-Carnitine supplementation on cancer: experimental data and clinical studies. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**. 2018; 27(3): 503-511.

FERREIRA, G. C.; MCKENNA, M.C. L-Carnitine and acetyl-L-carnitine roles and neuroprotection in developing brain. **Neurochemical Research**. 2017, 42(6): 1661-1675.

FIDLER IJ. - Selection of Successive Tumor Lines for Metastasis. **Nature. New Biololy**, 242:148-149, 1973.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide Dismutases: Redox signaling, vascular function and diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, 15(6), 1583-1606, 2011 *apud* MOLONEY, J. N.;

GAMBINO, V.; MICHELE, G. VENEZIA, O.; MIGLIACCIO, P.; DALL'OLIO, V.; BERNARD, L.; MINARDI, S. P.; FAZIA, M. A. D.; BARTOLI, D.; SERVILLO, G.; ALCALAY, M.; LUZI, L.; GIOGIO, M.; SCRABLE, H.; PELICCI, P. G.; MIGLIACCIO, E. Oxidative stress activates a specific p53 transcriptional response that regulates cellular senescence and aging. **Aging Cell**. 2013, 12 (3): 435-445.

GAO, L.; WILLIAMS, J. J. Nitric oxide-donating aspirin induces G2/M phases cell cycle arrest in human cancer cells by regulating phase transition proteins. **Internacional Journal of Oncology**. 2012, 41(1): 325-330.

GAO, S.; LIU, F. Novel insights into cell cycle regulation of cell fate determination. **Journal of Zhejiang University – SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**. 2019 20(6): 467-475.

GIROMINI, C.; REBUCCI, R.; FUSI, E.; ROSSI, L.; SACCONI, F.; BALDI, A. Citotoxicity, apoptosis, DNA damage and methylation in mammary and kidney epithelial cell lines exposed to ochratoxin A. **Cell Biology and Toxicology**. (32): 249-258, 2016.

GLORIEUX, C.; CALDERON, P. B. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. **Biological Chemistry**. 2017; 398(10): 1095-1108.

GNONI, A.; LONG, S.; GNONI, G. V.; GJUDETTI, A. M. Carnitine in human muscle bioenergetics: can carnitine supplementation improve physical exercise? **Molecules**. 2020, 25 (1): pii E182.

GREEN, D. R.; LLAMBI, F. Cell Death Signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. 2015.

GULÇIN, I. Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine. **Life Science**. 2006, 78 (8), 803-811.

HAHN, G. F.; OLIVEIRA, J. R.; BOCK, P. M. The role of factor 2 erythroid nuclear factor 2 (Nrf2) in diabetes mellitus. **Clinical & Biomedical Research**. 2017, 37(3): 203-213

HAMBRIGHT, H. G.; MENG, P.; KUMAR, A. P.; GHOSH, R. – Inhibition of PI3K/AKT/mTOR axis disrupts oxidative stress-mediated survival of melanoma cells. **Oncotarget**. 30; 6(9): 7195-7208, 2015.

HART, I. R. The Selection and Characterization of an Invasive Variant of the B16 Melanoma. **American Journal of Pathology**. v. 97, 1979.

HUA, X.; DENG, R.; LI, J.; CHI, W.; SU, Z.; LIN, J.; PFLUGFELDER, S. C.; LI, D. Q. Protective effects of L-carnitine against oxidative injury by hyperosmolarity in human corneal epithelial cells. **Investigative ophthalmology & visual science**. Vol 56, Issue 9, 5503-5511, 2015.

HUANG, H.; LIU, N.; GUO, H.; LIAO, S.; LI, X.; YANG, C.; LIU, S.; SONG, W.; LIU, C.; GUAN, L.; LI, B.; XU, L.; ZHANG, C.; WANG, X.; DOU, Q. P.; LIU, J. L-Carnitine is an endogenous HDAC inhibitor selective inhibiting cancer cell growth in vivo and in vitro. **Plos One**. 2012, vol 7, issue 11.

HUANG, H.; LIU, N.; YANG, C.; LIAO, S.; GUO, H.; ZHAO, K.; LI, X.; LIU, S.; GUAN, L.; LIU, C.; XU, L.; ZHANG, C.; SONG, W.; TANG, B. P.; DOU, Q. P.; LIU, J. HDAC inhibitor L-Carnitine and proteasome inhibitor Bortezomib synergistically exert anti-tumor activity in vitro and in vivo. **Plos one**. 2012, vol 7. Issue 12.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**. Vol 31 (5): 1170-1179, 2008.

INCA – Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva, Brasil. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, INCA, 2017. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/> Acessado em 16 de janeiro de 2020.

KIRKMAN, H. N.; GAETANI, G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. **Trends in Biochemical Sciences**, 32(1), 44-50, 2007.

KORKMAZ, K. S.; BUTUNER, D.; ROGGENBUCK, D. Detection of 8-OHdG as a diagnostic biomarker. **Journal of laboratory and precision medicine**. 2018

KRYLATOV, A. V.; MASLOV, L. N.; VORONKOV, N. S.; BOSHCHENKO, A. A.; POPOV, S. V.; GOMEZ, L.; WANG, H.; JAGGI, A. S.; DOWNEY, J. M. Reactive Oxygen Species as intracellular signaling molecules in the cardiovascular system. **Current Cardiology Reviews**. V. 14(4), 2018.

LENS, M. Current clinical overview of cutaneous melanoma. **British Journal of Nursing**. 17(5), 300-305, 2008.

LI, J. L.; WANG, Q. Y.; LUAN, H. Y.; KANG, Z. C.; WANG, C. B. Effects of L-Carnitine against oxidative stress in human hepatocytes: involvement of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. **Journal of Biomedical Science**. 2012. 19, 32.

LIU, D.; XU, Y. p53, oxidative stress and aging. *Antioxidants & Redox signaling*. 2011, 15 (6): 1669-1678.

LONG, G. V.; FUNG, C.; MENZIES, A. M.; PUPO, G. M.; CARLINO, M. S.; HYMAN, J.; SHAHHEYDARI, H.; TEMBE, V.; THOMPSON, J. F.; SAW, R. P.; HOWLE, J.; HAYWARD, N. K.; JOHANSSON, P.; SCOLYER, R. A.; KEFFORD, R. F.; RIZOS, H. – Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma. **Nature Communications**, 2014, 5:5594.

LOSSAINT, G.; BESNARD, E.; FISHER, D.; PIETTE, J.; DULIC, V. Chk1 is dispensable for G2 arrest in response to sustained DNA damage when the ATM/p53/p21 pathway is functional. **Oncogene**. 30 (41): 4261-74, 2011.

MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? **Critical Care**. 2006, 10:208.

MAJTNEROVÁ, P.; ROUSAR, T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. **Molecular Biology Reports**. 2018.

MÁRTON, M.; TIHANYI, N.; GYULAVÁRI, P.; BÁNHEGYI, G.; KAPUY, O. NRF2-regulated cell cycle arrest early stage of oxidative stress response mechanism. **Plos One**. 2018; 13(11).

MATSUI, H.; EINAMA, T.; SHICHI, S.; KANAZAWA, R.; SHIBUYA, K.; SUZUKI, T.; MATSUZAWA, F.; HASHIMOTO, T.; HOMMA, S.; YAMAMOTO, J.; TAKETOMI, A.; ABE, H. L-carnitine supplementation reduces the general fatigues of cancer patients during chemotherapy. **Molecular and Clinical Oncology**. 2018, 8(3): 413-416.

MELNIKOVA, V. O.; BOLSHAKOV, S. V.; WALKER, C.; ANANTHASWAMY, H. N. Genomic alterations in spontaneous and carcinogen-induced murine melanoma cell lines. **Oncogenes**. 23, 2347-2356, 2004.

MELONE, M. A. B.; VALENTINO, A.; MARGARUCCI, S.; GALDERISI, U.; GIORDANO, A.; PELUSO, G. The carnitine system and cancer metabolic plasticity. **Cell Death and Disease**. 2018, 9: 228.

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.
MENS, M. M. J.; GHANBARI, M. Cell Cycle regulation of stem cells by microRNAs. **Stem Cell Reviews and reports**. 2018, 14(3): 309-322.

MISHRA, R.; PATEL, H.; YUAN, L.; GARRETT, J. T. – Role of reactive oxygen species and targeted therapy in melanoma. **Cancer Research Frontiers**. 2018; 4(1): 101-130.

MOGHADDAS, A.; DASHTI-KHAVIDAKI, S. Potential protective effects of L-Carnitine against neuromuscular ischemia-reperfusion injury: from experimental data to potential clinical applications. **Clinical Nutrition**. 2015, 1-8.

MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. Ros signalling in the biology of cancer. **Seminars in cell & developmental biology**. 2018, 80: 50-64.

MOON, D.; KIM, M.; CHOI, Y. H.; HYUN, J. W.; CHANG, W. Y.; KIM, G. Y. Butein induces G2/M phase arrest and apoptosis in human hepatoma cancer cells through ROS generation. **Cancer Letters**. 2010, vol 288, issue 2, 204-213.

NCI – National Cancer Institute. Intraocular (Uveal) melanoma treatment (PDQ®) – Patient Version, 2020. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/eye/patient/intraocular-melanoma-treatment-pdq>. Acessado em 21 de março de 2020 às 18 horas.

NICOLSON GL, BRUNSON KW, FIDLER IJ. - Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. **Cancer Research**, 38:4105-4011, 1978.

NOVAKOVA, L.; KUMMER, O.; BOUITBIR, J.; STOFFEL, S. D.; HOERLER-KOERNER, U.; BODMER, M.; ROBERTS, P.; URWYLER, A. EHRSAM, R. KRÄHENBÜHL, S. Effect of L-carnitine supplementation on the body carnitine pool, skeletal muscle energy metabolism and physical performance in male vegetarians. **European Journal of Nutrition**. 2016, 55(1): 207-17.

OESTREICHER, J.; MORGAN, B. Glutathione: subcellular distribution and membrane transport. **Biochemistry and Cell Biology**. 97(3): 270-289, 2018.

PEKALA, B.; PATKOWSKA-SOKOLA, B. BODKOWSKI, R.; JAMROZ, D.; NOWAKOWSKI, P.; LOCHYNSKI, S.; LIBROWSKI, T. L-Carnitine: Metabolic functions and meaning in human life. **Current Drug Metabolism**. 2011, 12, 667-678.

PISTRITTO, G.; TRISCIUOGLIO, D.; CECI, C.; GARUFI, A.; D'ORAZI, G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **AGING**. Vol. 8, No 4, 2016.

PONATH, V.; KAINA, B. Death of monocytes through oxidative burst of macrophages and neutrophils: killing in trans. **PLOS ONE**. 12(1), 2017.

POON, r. y. Cell cycle control: a system of interlinking oscillators. **Methods in Molecular Biology**. 2016, 1344:3-19.

POY, C. W.; CHOI, J. H.; OH, S. M.; CHOI, S. Y. Oxidative stress-induced cyclin D1 depletion and its role in cell cycle processing. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects**. Vol 1830 (11): 5316-5325, 2013.

QIANG MA. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. 2013, 53: 401-426.

READ, J. WADT, K. A. W.; HAYWARD, N. K. – Melanoma genetics. **Journal of Medical Genetics** 2016; 53:1-14.

REUTER, S. E.; EVANS, A. M. Carnitine and acylcarnitines: Pharmacokinetic, pharmacological and clinical aspects. **Clinical Pharmacokinetics**. 2012, 51 (9): 553-572.

REUTER, S.; GRUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. – Oxidative stress, inflammation and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**. 49(11): 1603-1616, 2010.

RIBAS, G. S.; VARGAS, C. R.; WAJNER, M. L-Carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. **Gene**. 2014, 269-476.

RIEGER, A. M.; NELSON, K. L.; KONOWALCHUK, J. D.; BARREDA, D. R. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis assay for accurate assessment of cell death. **Journal of Visualizes Experiments**. 2011; (50): 2597.

- SILVÉRIO, R.; LAVIANO, A.; FANELLI, F. R.; SEELAENDER, M. L-Carnitine and cancer cachexia: clinical and experimental aspects. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**. 2, 37-44, 2011.
- SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH, H.; LEONEON, M. – Oxidative stress and câncer: an overview. **Ageing Research Reviews**. Vol 12 376-390, 2013.
- STACEY, D. W. Three observations that have changed our understanding of cyclin D1 and p27 (kip1) in cell cycle control. **Genes & Cancer**. 1(12) 1189-1199, 2010.
- SURAI, P. F. Antioxidant Action of Carnitine: Molecular Mechanisms and Practical Applications. **Veterinary Science**. 2015, 66-85.
- VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, C. 8-hydroxi-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. **Journal of Environmental Science and Health**. Part C, 27(2): 120-139, 2009.
- VASCONCELOS *et al*, 2007. (Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para a sua determinação. **Química Nova**. v. 30, No. 5, 1323-1338, 2007.
- VELHO, T. R. – Metastatic melanoma: a review of current and future drugs. **Drugs in context**, 2012: 212242.
- VOLTARELLI, F. A.; FRAJACOMO F.T.; PADILHA, C. S.; TESTA, M. T. J. CELLA, P. S.; RIBEIRO, D. F.; OLIVEIRA, D. X.; VERONEZ, L. C.; BISSON, G.S.; MOURA, F. A.; DEMINICE, R. Syngeneic B16F10 Melanoma causes cachexia and impaired skeletal muscle strength and locomotor activity in mice. **Frontiers in Physiology**. 8:715, 2017.
- WARD, L. S. Entendo o processo molecular da tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. Vol. 46, Nº 4, 2002.
- WENZEL, E. S.; SINGH, A. T. Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer. **In vivo**. 2018, 32(1): 1-5.
- WILLIAMS, A. B.; SCHUMACHER, B. p53 in the DNA-damage-repair process. **Cold Spring Harbor Perspective in Medicine**. V. 6 (5), 2016.
- WU, J. H.; BATIST, G. Glutathione and glutathione analogues: therapeutic potentials. *Biochimica and Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 1830 (5), 3350-3353, 2013.
- WU, L. L.; CHIOU, C. C.; CHANG, P. Y.; WU, J. T. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. **Clinical Chimica Acta**. 339(1-2), 1-9, 2004.
- XU, W.; McARTHUR, G. Cell Cycle Regulation and Melanoma. **Current Oncology Reports**, 2018.
- YANG, H.; XIE, Y.; YANG, D.; REN, D. Oxidative stress-induced apoptosis in granulosa cells involves JNK, p53 and Puma. **Oncotarget**. 2017, 11;8(15): 25310-25322.