



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

PAOLA GOMES BENÍCIO SOUZA

**O EFEITO DO TROLOX E DA CURCUMINA SOBRE A AÇÃO  
DA DACARBAZINA EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO  
(B16F10)**

PAOLA GOMES BENÍCIO SOUZA

**O EFEITO DO TROLOX E DA CURCUMINA SOBRE A AÇÃO  
DA DACARBAZINA EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO  
(B16F10)**

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

Orientador: Prof. Dr. Rubens Cecchini.

Londrina  
2019

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

SO729 Souza, Paola Gomes Benício.

O efeito do trolox e da curcumina sobre a ação da dacarbazina em células de melanoma murino (B16F10) / Paola Gomes Benício Souza. - Londrina, 2019. 58 f. : il.

Orientador: Rubens Cecchini.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Dacarbazina - Tese. 2. B16F10 - Tese. 3. Curcumina - Tese. 4. Melanoma - Tese. I. Cecchini, Rubens. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

PAOLA GOMES BENÍCIO SOUZA

**O EFEITO DO TROLOX E DA CURCUMINA SOBRE A AÇÃO DA  
DACARBAZINA EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO (B16F10)**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Rubens Cecchini  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dra Ivete Conchon Costa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Fernando Pinheiro de Souza Neto  
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 13 de novembro de 2019.

Dedico este trabalho a alguém que possa usufruir do conhecimento abordado para tornar sua vida ainda melhor.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por tudo, tanto na vida profissional quanto pessoal.

A Minha família, porto para todos os momentos, felizes e problemáticos da vida.

A Fundação Araucária pelo incentivo universitário necessário para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Fisiopatologia e Radicais Livres e ao Laboratório de Patologia Molecular, pelo auxílio nesta pesquisa. Também professores e amigos que me acompanharam e ensinaram muito nos processos necessários a finalização desse mestrado.

Agradecimento ao amigo Pedro Sebastião Raimundo Dionizio pelo auxílio na metodologia empregada nesse estudo.

A amiga Larissa Sanches pela paciência e ajuda indispensável nos experimentos.

Ao Amigo especial Jesus Antônio Vargas pelo companheirismo.

Ao Amigo Jacksom Gabriel , meu amigo “professor”.

As Conversas revigorantes das amigas queridas Tatiana e Risia.

Ao Querido orientador Prof Dr Rubens Cecchini pelo imenso conhecimento transmitido na ‘Arte de fazer Ciência’.

“Por que Tu és a minha rocha e a minha fortaleza; assim por amor do teu nome; guia-me e encaminha-me” Salmo 31; 3.

SOUZA, Paola Gomes Benício. **O efeito do trolox e da curcumina sobre a ação da dacarbazina em células de melanoma murino (B16F10)**. 2019. 58 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

Pesquisas, continuamente, vêm abordando o aumento anual de novas ocorrências do melanoma para o câncer de pele no mundo, o que tem despertado uma preocupação com o crescimento da taxa de mortalidade deste tipo de câncer de pele com característica altamente invasiva e na maioria das vezes, mortal em casos de melanoma com metástase. Estudos têm relatado um cenário controverso quanto ao uso de antioxidantes para tratamento do melanoma. Mediante a essa questão, nosso trabalho analisa a interferência do estresse oxidativo (EO) causado pela ação do quimioterápico *DTIC* na célula B16F10 e a interferência do pré-tratamento por antioxidantes como o *trolox* (análogo da vitamina E) e a *curcumina* (antioxidante natural derivado da planta *curcuma longa L*) na ação da *Dacarbazina in vitro*. Para a realização da pesquisa, fizemos o uso da linhagem celular de melanoma murino B16F10. Foram conferidas três etapas de tratamento *in vitro* nesse experimento: com *Trolox* (análogo VIT E); com *curcumina*; e com *Dacarbazina (DTIC)*. Em cada etapa, foram realizados testes para verificar a citotoxicidade e a proliferação celular do quimioterápico em todos os pré-tratamentos. Os grupos testados foram Trolox 500µM, Curcumina 10µM e Trolox µM + Curcumina 10µM. Depois de 24 horas de pré-tratamento, os grupos citados foram tratados com *Dacarbazina* 500 µg/ml por mais 24 horas. Encontramos uma maior citotoxicidade em relação ao controle e ao grupo *Dacarbazina* quando as células são pré tratadas com *curcumina*. Também, no grupo *DTIC+curcumina* houve uma diminuição significativa na proliferação celular das células B16F10 em relação à *Dacarbazina* isolada. Considerando que a disseminação do melanoma evolui em face do EO, no qual lipoperóxidos são formados, também, analisamos o quimioterápico DTIC e seu impacto na lipoperoxidação das células B16F10 e notamos um aumento significativo, quando as células são pré tratadas com *curcumina* ( $p < 0.05$ ) Concluimos, nesta pesquisa, que a *curcumina*, aplicada experimentalmente nas células B16F10 *in vitro*, apresentou atividade citotóxica e antiproliferativa, potencializando a ação do quimioterápico *Dacarbazina* quando utilizada como pré-tratamento.

**Palavras Chave:** Dacarbazina. B16F10. Curcumina. Estresse oxidativo. Melanoma.

SOUZA, Paola Gomes Benício. **O efeito do trolox e da curcumina sobre a ação da dacarbazina em células de melanoma murino (B16F10)**. 2019. 58 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

Continuous research has been reporting the annual increase in new melanoma occurrences for skin cancer in the world, which has raised concern about the increased mortality rate of this type of skin cancer with a highly invasive and the most time fatal in cases of melanoma with metastasis. Studies have reported a controversial scenario regarding the use of antioxidants to treat melanoma. This work contributes to understand the interference of oxidative stress (EO) caused by the action of the DTIC chemotherapy in the B16F10 cell and the influence of the pre-treatment with antioxidants such as trolox (vitamin E analog) and curcumin (natural antioxidant derived of *curcuma longa L*) in the action of Dacarbazine *in vitro*. For the achievement the research, we made use of the murine melanoma cell line B16F10. Three *in vitro* treatment steps were taken in this experiment: with trolox (vitamin E analog); with curcumin; and with Dacarbazine (DTIC). In each stage, were tests performed to verify cytotoxicity and cell proliferation of the chemotherapeutic in all pre-treatments. The tested groups were trolox 500µM, Curcumin 10µM and trolox 500µM + curcumin 10µM. After 24 hours pretreatment, the above groups were treated with 500 µg/ml Dacarbazine for another 24 hours. We found greater cytotoxicity over control and the Dacarbazine group when cells are pretreated with curcumin. Also, in the DTIC + curcumin group there was a significant decrease in the cell proliferation of B16F10 cells relative to Dacarbazine alone. Considering that the dissemination of melanoma evolves in the face of EO in which lipoperoxides are formed, We also analyzed the DTIC chemotherapy and its impact on the lipid peroxidation of B16F10 cells and noticed a significant increase when cells are pretreated with curcumin ( $p < 0.05$ ). We concluded that curcumin, experimentally applied in B16F10 cells *in vitro*, showed cytotoxic and antiproliferative activity, potentiating the action of the chemotherapeutic DTIC when used as a pretreatment.

**Key-words:** Dacarbazine. B16F10. Curcumin. Oxidative stress. Melanoma.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Camadas da Epiderme.....  | 11 |
| <b>Figura 2</b> - Melanócito.....   | 12 |
| <b>Figura 3</b> - Ação das células de Langerhans .....  | 13 |
| <b>Figura 4</b> - Incidência do melanoma no Brasil.....   | 14 |
| <b>Figura 5</b> - Os tipos clínicos histológicos de melanoma .....  | 16 |
| <b>Figura 6</b> - Incidência dos tipos de mutação encontrados no melanoma .....   | 17 |
| <b>Figura 7</b> - O processo de migração da célula neoplásica. ....   | 18 |
| <b>Figura 8</b> - Reação da Melanogênese considerando TH-1 como enzima<br>tirosina hidroxilase, e TRP-2 que corresponde a Dopacromo<br>tautomerase (DCT)..... | 20 |
| <b>Figura 9</b> - <b>A</b> - Fórmula estrutural da Dacarbazina e <b>B</b> - Gráfico do ciclo<br>celular.....  | 23 |
| <b>Figura 10</b> - História do uso de tratamentos para Melanoma Cutâneo .....   | 25 |
| <b>Figura 11</b> - Fórmula estrutural da Curcumina .....  | 26 |
| <b>Figura 12</b> - Demonstração dos grupos metoxi na estrutura química da<br>curcumina.....   | 26 |
| <b>Figura 13</b> - Estrutura química da desmetoxicurcumina e<br>Bisdesmetoxicurcumina .....   | 27 |
| <b>Figura 14</b> - Mecanismo da capacidade antioxidante da curcumina .....  | 28 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                        |   |
|------------------------|---|
| $\mu\text{M}$          | Micrômetro  |
| A.C                    | Antes de Cristo   |
| BCL-2                  | Pertence a família das proteínas apoptóticas                              |
| BDMC                   | Bisdesmetoxicurcumina   |
| BMC                    | Desmetoxicurcumina  |
| C57BL6                 | Linhagem laboratorial de camundongos                                      |
| CAT                    | Catalase  |
| CTLA – 4               | Proteína do tipo 4 associada a linfócito T citotóxico                     |
| DAC / DTIC             | Dacarbazina   |
| DNA                    | Ácido Dexorribonucleico   |
| EO                     | Estresse oxidativo  |
| ERNS                   | Espécies Reativas de Nitrogênio   |
| EROS                   | Espécies Reativas de Oxigênio   |
| EUA                    | Estados Unidos da América   |
| FDA                    | Food and Drug Administration  |
| GPX                    | Glutathione Peroxidase  |
| $\text{H}_2\text{O}_2$ | Peróxido de Hidrogênio  |
| $\text{HO}\cdot$       | Radical Hidroxila   |
| INCA                   | Instituto nacional do Câncer  |
| LC                     | Células de Langerhans   |
| L-OOH                  | Peróxido Lipídico   |
| ML                     | Melanoma Lentigo Maligno  |
| MLA                    | Melanoma Lentiginoso Acral  |
| MN                     | Melanoma Nodular  |
| MS                     | Melanoma Extensivo Superficial  |
| NADPH Peroxidase       | Complexo enzimático de Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina |
| NF- $\kappa$ B         | Fator Nuclear Kappa B   |
| $\text{O}_2^-$         | Oxigênio Singlet  |
| $\text{O}_2^{\cdot-}$  | Ânion Superóxido  |
| $\text{ONOO}^-$        | Peroxinitrito   |
| SOD                    | Superóxido Desmutase  |
| UV                     | Ultravioleta  |

## SUMÁRIO

|          |                                     |           |
|----------|-------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....             | <b>11</b> |
| 1.1      | PELE.....                           | 11        |
| 1.2      | MELANOMA.....                       | 13        |
| 1.3      | MELANOMA E EXTRESSE OXIDATIVO ..... | 18        |
| 1.4      | MODELO EXPERIMENTAL DE B16F10.....  | 21        |
| 1.5      | TRATAMENTO DO MELANOMA .....        | 22        |
| 1.6      | CURCUMINA.....                      | 25        |
| 1.7      | AÇÃO DA CURCUMINA.....              | 27        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....              | <b>30</b> |
| 2.1      | OBJETIVO GERAL.....                 | 30        |
| 2.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....          | 30        |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....            | <b>31</b> |
| <b>3</b> | <b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....      | <b>39</b> |
| <b>4</b> | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....   | <b>58</b> |

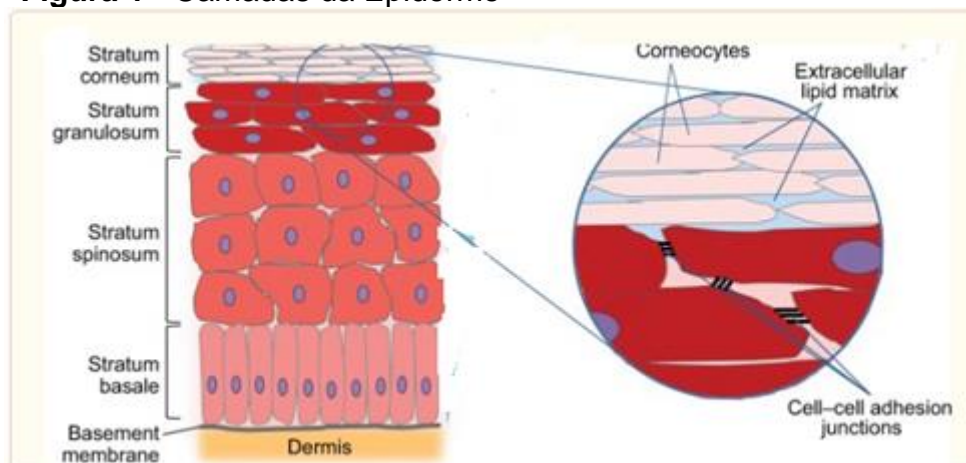
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PELE

A pele é um órgão extenso que recobre toda a superfície do corpo humano, é formada por 3 camadas sobrepostas, indo da superfície até a camada mais profunda: Epiderme, Derme e a Hipoderme (SILVA; MICHNIAK-KOHN; LEONARDI, 2015).

Epiderme é a camada mais superficial, apresenta revestimento escamoso, e predominância celular de queratinócitos, constituída de subcamadas: basal (figura 1), espinhosa, granulosa e córnea. (BLAYDON; KELSELL, 2014).

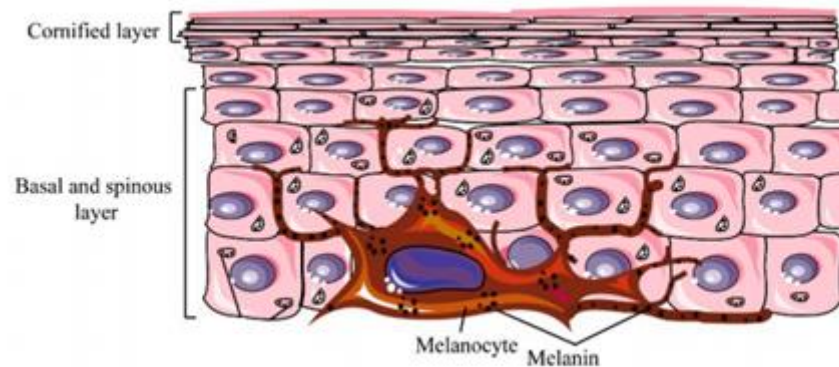
**Figura 1 - Camadas da Epiderme**



**Fonte:** Adaptado de Blaydon e Kelsell (2014).

A camada Basal epidérmica é a mais profunda das subcamadas e antecede a derme, caracteriza-se por uma intensa atividade proliferativa dos queratinócitos que vão se diferenciando e ascendendo para as camadas seguintes: espinhosa, granulosa e depois córnea (PROST-SQUARCIONI, 2005).

Ainda na camada basal, encontramos o melanócito (Figura 2) que se situa na junção com a derme, esta célula tem formato oval e tamanho aproximado de 7  $\mu\text{m}$ , contém diversas prolongações dendríticas alongadas que interagem célula a célula com os queratinócitos em uma quantidade aproximada de 30 a 40 células (DAY *et al.*, 2017). Além da camada basal da epiderme, essas células podem ser encontradas em outros locais como olhos, ouvido interno, bulbo capilar, sistema nervoso central e cardiovascular (D'MELLO *et al.*, 2016).

**Figura 2 - Melanócito**

**Fonte:** Adaptado de D'Mello *et al.* (2016).

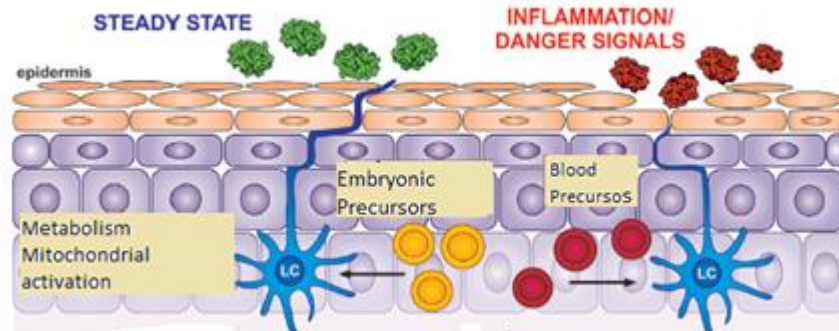
O Melanócito epidérmico sintetiza melanina que é responsável pela pigmentação da pele humana e da proteção contra os raios ultravioletas (ISOLA; EDDY; CHEN, 2016). A melanina é um pigmento regularmente produzida pelo processo de melanogênese, tem importante função em cobrir os núcleos dos queratinócitos epidérmicos reduzindo assim os danos físicos e químicos causados pela irradiação UV (SLOMINSKI *et al.*, 2014).

Na camada granulosa e espinhosa, os queratinócitos nucleados apresentam diferentes tipos de junções ligadas ao citoesqueleto celular que confere a pele maior resistência e dificultam a perda de água pelo organismo (BLAYDON; KELSELL, 2014).

Os corneócitos (queratinócitos mortos) presentes na camada córnea estão envolvidos em uma matriz de bicamada lipídica extracelular que se torna uma importante barreira física contra microrganismos e substâncias danosas (PROST-SQUARCIONI, 2005).

A imunovigilância da pele é realizada pelas células de Langerhans (LC) que monitoram todo o ambiente da epiderme (Figura 3) passando por entre as diversas camadas com prolongamentos que alcançam a porção mais externa, a camada córnea (CLAYTON *et al.*, 2017). Estas células derivam de progenitores embrionários da própria pele na homeostasia cutânea, diante de sinais de dano (Figura 3) e havendo necessidade, o número de LC passa a ser reforçada por progenitores hematopoiéticos, e são ativadas aumentando a expressão de moléculas apresentadoras de antígeno (CLAYTON *et al.*, 2017).

**Figura 3 - Ação das células de Langerhans**



**Fonte:** Adaptado de Clayton *et al.* (2017).

A camada adjacente à epiderme, é a derme, é um tecido conjuntivo formado essencialmente de complexos proteicos de matriz extracelular, associados a esta matriz se localizam os fibroblastos responsáveis pela síntese de colágeno e elastina. Essa composição dérmica determina a espessura da pele e confere a elasticidade e força (SAHLE *et al.*, 2014). As camadas da derme são divididas em duas partes: superficial ou papilar constituída de elevada densidade celular (fibroblastos) e tecido conjuntivo frouxo, a camada mais profunda ou reticular apresenta baixa densidade celular mas é densamente completa por colágeno e outras proteínas do tecido conjuntivo, sobrepondo-se a hipoderme (KOROSEC *et al.*, 2019).

A derme ainda contém outras estruturas como glândulas (sebáceas, sudoríparas), vasos sanguíneos, terminações nervosas, células de Merkel (estrutura referente ao tato) e sistema linfático (PULLAR; CARR; VISSERS, 2017).

A camada mais interna da pele é a hipoderme, um tecido subcutâneo gorduroso, que mantém uma separação tênue com a derme, atua como isolante térmico e fixa a pele a músculos e ossos por fibras de elastina e colágeno (CUNHA; CUNHA; MACHADO, 2014).

## 1.2 MELANOMA

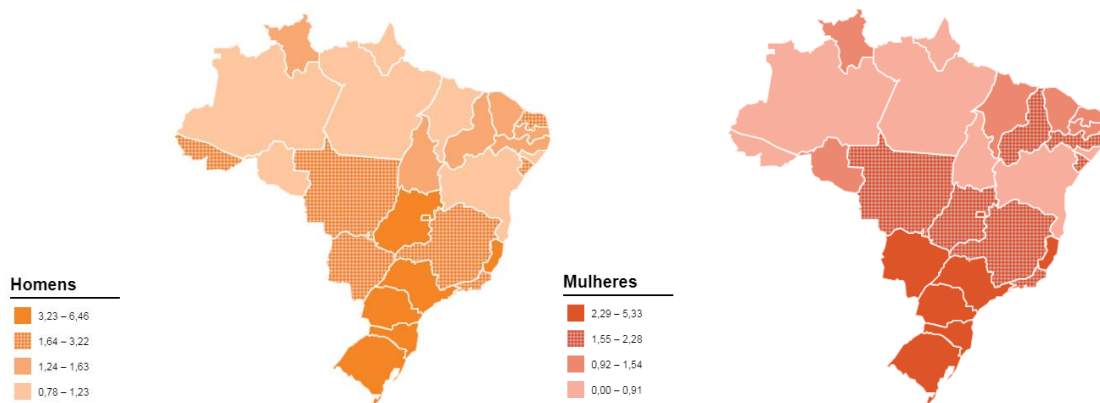
Atualmente uma das doenças que mais causam óbito no mundo é o câncer, que pode ser definido como uma alteração celular causada por diferentes mecanismos genéticos dando origem a neoplasias (popularmente conhecida como tumor) benignos ou malignos. Enquanto os tumores benignos são constituídos por células bem semelhantes às que os originaram e não possuem a capacidade de

provocar metástases, o câncer maligno apresenta perda da diferenciação celular e função da célula de origem, caracteriza-se pela invasão (metástase) a diversos tecidos através da via linfática ou sanguínea (NAIDOO; KRUGER; ABRAHAMSE, 2018).

Diversos tipos de neoplasias acometem a pele, são classificadas em não-melanoma e melanoma, o tipo não-melanoma acomete queratinócitos epidérmicos, e corresponde ao carcinoma espinocelular e ao carcinoma basocelular, estes apresentam alta incidência porém baixa mortalidade (AL-ZOU *et al.*, 2016). Enquanto o Melanoma é uma neoplasia maligna e origina-se de melanócitos e é altamente agressivo podendo alcançar em casos graves da doença até 80% de morte mesmo representando apenas 3% das neoplasias malignas (BAHARARA *et al.*, 2016; D'MELLO *et al.*, 2016; INCA, 2018). Este tipo de câncer apresenta elevada capacidade de metástase e por isso é considerado o câncer de pele mais grave em relação aos tipos não melanoma (CERVENKA *et al.*, 2017; INCA, 2018).

No mundo, o melanoma pode chegar até a 160.000 casos segundo Yamamoto *et al.* (2017), já no Brasil estima-se 6.260 novas ocorrências, destas 2.920 para homens (46,6%) e 3.340 para mulheres (53,3%) (INCA, 2018). A incidência maior em mulheres segundo Roh *et al.* (2015) é parcialmente decorrente de exposições excessivas á lâmpadas de UVA utilizadas em processo de bronzeamento artificial. Na figura 4 observando o score do gráfico nota-se um aumento na incidência de melanoma masculino, porém esse dado (INCA, 2018) demonstra a incidência por estado brasileiro a cada 100 mil habitantes.

**Figura 4** - Incidência do melanoma no Brasil.



Fonte: INCA (2018).

De fato, entre os fatores de risco, os raios ultravioleta (UV)

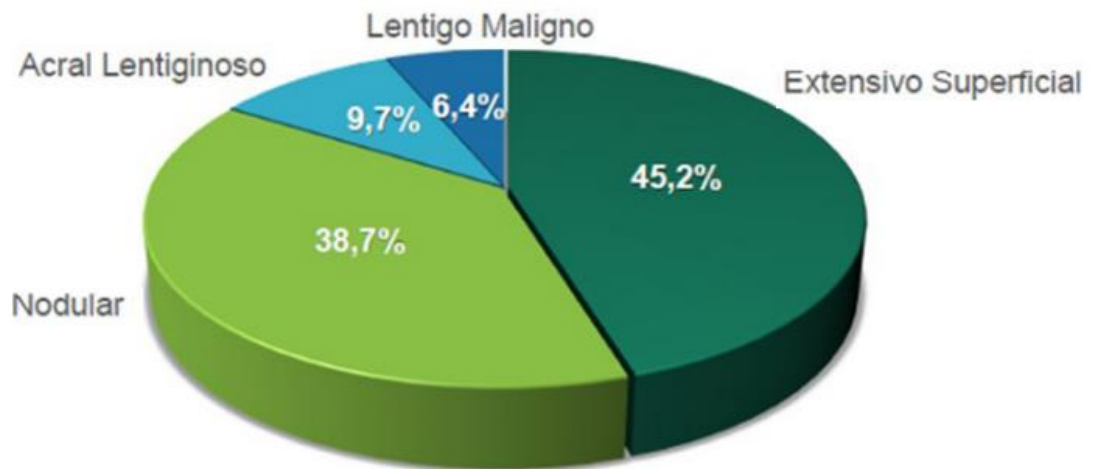
correspondem ao principal agente causal do melanoma, exposições persistentes a esses raios principalmente com presença de lesões (bolhas) e inflamação local aumentam a incidência deste tipo de câncer (CERVENKA *et al.*, 2017). Contudo, o melanoma pode ocorrer também em lugares não expostos ao sol, portanto a transformação maligna do melanócito deve ser multifatorial e complexa (ZITO; SCHARF, 2018). Outros fatores como hereditariedade, indivíduos com pele e cabelos de coloração clara, além de múltiplos nevos e nevos displásicos predispõe ao melanoma cutâneo (PERERA *et al.*, 2013).

A doença se manifesta em estágios, na fase inicial é de fácil retirada por ressecção cirúrgica, em estágios mais tardios, acomete vários locais e a retirada é comprometida pela presença de metástases, com pior prognóstico e expectativa de vida abaixo de 5 anos (PERERA *et al.*, 2013; PIKE *et al.*, 2017). O tratamento oferece poucas opções terapêuticas nos casos metastáticos (BERNARDES *et al.*, 2016).

Na clínica médica, primeiramente a verificação das lesões melanocíticas ocorre pela observação da regra ABCD – assimetria irregular, bordas desiguais, diferentes cores e alterações de superfície com crescimento rápido (PERERA *et al.*, 2013; STENEHJEM *et al.*, 2017). Outras ferramentas são clinicamente usadas por patologistas no diagnóstico do melanoma como o sistema de Clark, que considera os níveis de invasão por camadas da pele para determinar o estadiamento do melanoma (WAINSTEIN; BELFORT, 2004), e as alterações de espessura observadas no tegumento humano por Breslow que desenvolveu uma tabela em milímetros para excisão local cirúrgica mais confiável (NURDJAJA; YOZU; MATHY, 2018).

Os tipos clínicos histológicos de melanoma (Figura 5) com maior incidência são melanoma extensivo superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno e o melanoma lentiginoso acral (ROSA *et al.*, 2017). Outros como melanoma uveal e mucoso são menos comuns e requerem mais estudos para se determinar o prognóstico (LIMA *et al.*, 2009).

**Figura 5** - Os tipos clínicos histológicos de melanoma



Fonte: Adaptado de Araújo *et al.* (2014).

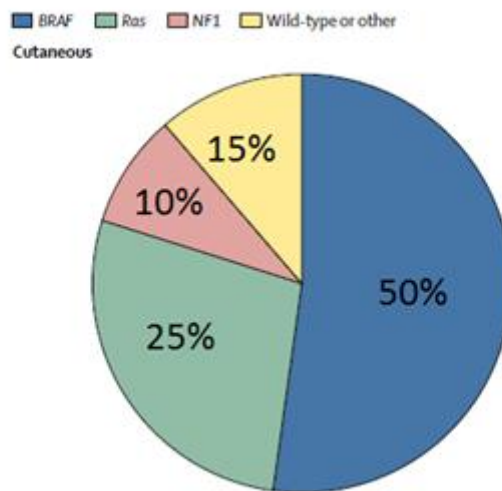
O melanoma extensivo superficial – MS é o mais prevalente, com 70% da incidência, acompanha quase sempre sangramentos e ulcerações, a fase de proliferação inicial tem forma radial e progressão posterior vertical. 50% da incidência do MS está relacionado a mutações no gene BRAF (Figura 6) que origina clinicamente uma mácula corada e irregular, enquanto 15 a 25% da incidência estão relacionados a mutação no gene NRAS que origina clinicamente uma massa tumoral mais espessa e com elevada proliferação (PERERA *et al.*, 2013).

O melanoma nodular – MN acomete principalmente pescoço e cabeça, tem uma característica bem agressiva (crescimento vertical rápido) levando o indivíduo a um pior prognóstico, responde por 15 a 30 % dos casos, pode acometer áreas cobertas (sem incidência solar), a coloração varia de total ausência de pigmento até azul para o preto. (ZITO; SCHARF, 2018). O MN é frequentemente diagnosticado como granuloma piogênico ou hemangioma e 50% de sua incidência (Figura 4) está relacionado a mutação no gene BRAF enquanto 20 % dos casos está relacionado a mutação no gene NRAS. (ROSA *et al.*, 2017).

O melanoma lentigo maligno – ML surge quando existe a invasão da derme papilar e responde por 4 a 10 % dos casos de melanoma. Clinicamente chamado de sarda melanótica de Hutchinson, apresenta maior incidência na face de idosos, é um tipo de melanoma *in situ*, de crescimento lento que pode durar anos para ocorrer metástase. A mutação do ML não têm incidência definida variando entre o gene BRAF e o gene RAS nos casos clínicos. (PERERA *et al.*, 2013).

O melanoma lentiginoso acral - MLA é mais encontrado em indivíduos de pele escura (60%), em indivíduos de pele clara incide apenas de 2 a 8 %. A mutação nesse tipo de melanoma ocorre no gene c-KIT, uma proteína transmembrana tirosina quinase do receptor kit com mutação no domínio justamembrana - éxon 11 e no domínio quinase - éxon 13 (GOLDINGER *et al.*, 2013; PERERA *et al.*, 2013; ROSA *et al.*, 2017).

**Figura 6** - Incidência dos tipos de mutação encontrados no melanoma

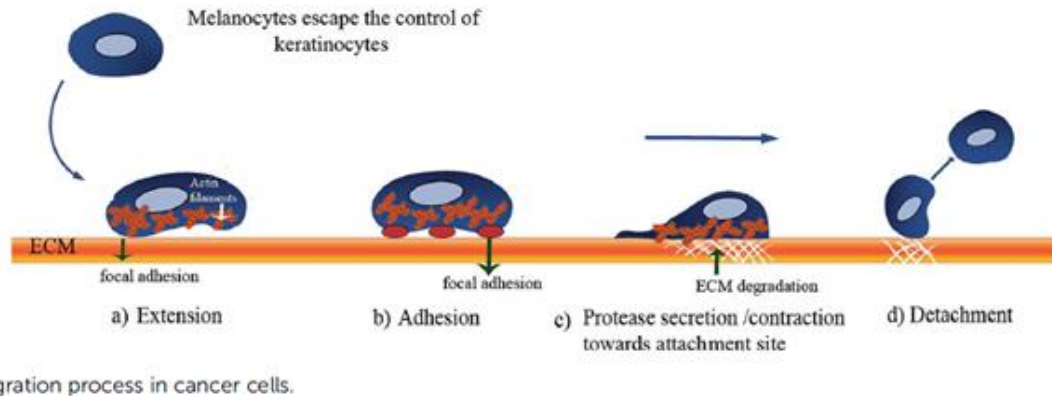


**Fonte:** Adaptado de Schadendorf *et al.* (2018).

A metástase no melanoma tem início na fase de crescimento radial do melanócito atípico na epiderme, na fase de propagação horizontal as células neoplásicas adquirem a capacidade de invasão a outros tecidos. Esse processo (figura 7) depende de uma série de mudanças na célula cancerígena que passa por diferentes eventos. A extensão(a) é quando a membrana da célula é deslocada para frente devido a polimerização de filamentos de actina, a adesão(b) que é o ancoramento na matriz celular via moléculas de adesão como integrinas, a contração(c) é uma diminuição dos inibidores teciduais de metaloproteinasas (TIMPs) comumente encontrado em melanoma metastático, e o último evento, consiste no desprendimento - d (superexpressão de quinases que desestabilizam complexos focais, facilitando a migração celular). Essas etapas serão imprescindíveis ao sucesso da separação do tumor primário rumo ao vaso linfático ou vaso sanguíneo. (ALQATHAMA; PRIETO, 2014).

**Figura 7:** O processo de migração da célula neoplásica (ALQATHAMA; PRIETO, 2014).

**Figura 7** - O processo de migração da célula neoplásica.



Fonte: Alqathama e Prieto (2014).

### 1.3 MELANOMA E EXTRESSE OXIDATIVO

As espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERNS), são moléculas estruturalmente instáveis pela presença de um elétron desemparelhado, são formadas em quantidade rigorosamente controlada a partir de reações do metabolismo do oxigênio participando da homeostase celular (SOARES *et al.*, 2015). Sinalizam alguns processos importantes como vias de crescimento da célula, transformação celular e apoptose, atuando também na inflamação e resposta imunológica (VENZA *et al.*, 2015).

A produção não controlada destas moléculas, contribui para uma alteração no ambiente celular causado pelo aumento de oxidantes ou diminuição de antioxidantes, gerando assim o estresse oxidativo (EO). O EO promove mudanças significativas no estado redox da célula que pode danificar componentes importantes como proteínas, lipídios, carboidratos e DNA, alterando a fisiologia celular (SOARES *et al.*, 2015). Para inibir e/ou reduzir estes danos oxidativos existem os sistemas antioxidantes que participam na regulação da homeostase redox, dentre estes estão os sistemas enzimáticos como Superóxido desmutase (SOD), Catalase, (CAT) Glutathione peroxidase (GPX) e sistemas não enzimáticos como as vitaminas A, C, E e o tripeptídeo glutathione GSH (GADJEVA; DIMOV; GEORGIEVA, 2008).

Algumas das principais espécies reativas que causam danos as estruturas celulares por estresse oxidativo (EO) e nitrosativo (EN) vem sendo estudadas e quantificadas. Como, por exemplo, peróxido lipídico L-OOH, ânion superóxido  $O_2^{\cdot-}$ , radical hidroxila HO, peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$ , oxigênio singlet  $O$

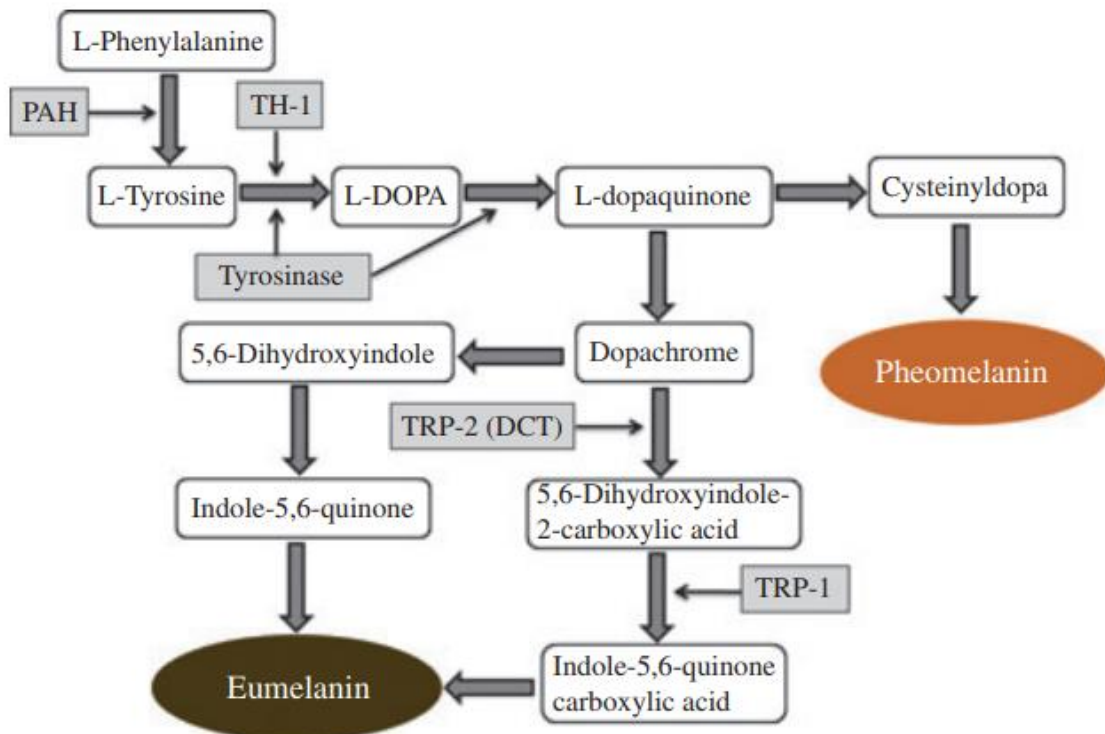
O<sub>2</sub>, óxido nítrico NO e peroxinitrito ONOO<sup>-</sup> (DUNAWAY *et al.*, 2018).

A relação do EO/EN com a incidência de melanoma, têm sido descrito como por exemplo, no aumento da peroxidação lipídica (interação de espécies reativas com lipídeos), diminuição das enzimas antioxidantes, e elevação do estresse nitrosativo em pacientes com melanoma (BERNARDES *et al.*, 2016; GADJEVA; DIMOV; GEORGIEVA, 2008; VARMA *et al.*, 2016). Outro fator que pode favorecer a incidência de melanoma é a melanogênese, aja visto a formação de espécies reativas na síntese de melanina, devido à incidência de radiação UV na pele (DENAT *et al.*, 2014; VENZA *et al.*, 2015). Falhas na regulação da melanogênese potencializa a ação catalítica da tirosinase que aumenta tanto a produção de melanina como de espécies reativas no melanócito, alterações que tornam o melanoma mais agressivo (CHAIPRASONGSUK *et al.*, 2016; VENZA *et al.*, 2015; WOLNICKA-GLUBISZ *et al.*, 2014).

Contudo, estudos controversos relatam a melanina ora atuando como oxidante ora como antioxidante, no primeiro caso a estimulação da melanogênese induz lesões oxidativas no DNA. (VENZA *et al.*, 2015). Como antioxidante o aumento da melanogênese induz a atividade e a expressão da enzima catalase, que atua reduzindo a concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) favorecida pela irradiação UV na pele (OH *et al.*, 2014).

A Melanina, é sintetizada a partir de reações de oxidação e polimerização no interior do melanócito (ALI; NAAZ, 2018). Gillbro e Olsson (2011) descrevem a reação da melanogênese (Figura 8) que consiste em um polimerização do aminoácido tirosina. Esta via pode ocorrer a partir do aminoácido fenilalanina, que através da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) gera o aminoácido tirosina que como resultado final leva a síntese de melanina.

**Figura 8** - Reação da Melanogênese considerando TH-1 como enzima tirosina hidroxilase, e TRP-2 que corresponde a Dopacromo tautomerase (DCT).



**Fonte:** Gillbro e Olsson (2010).

A melanina apresenta duas formas moleculares que se alteram em quantidade e proporção, dependem do hormônio estimulador de melanócitos e do seu receptor específico (AKABERI *et al.*, 2018). Quando a interação hormônio-receptor for perfeita, a síntese de eumelanina aumenta e de feomelanina diminui, processo que ocorre na maioria dos indivíduos, já se o receptor apresentar alteração em que o encaixe com o hormônio não é realizado completamente, a feomelanina é predominante e a síntese de eumelanina diminui expressivamente, situação fenotipicamente encontrada em indivíduos ruivos (TESTA; CASTELLI; PELOSI, 2017).

A proteção dada pela eumelanina é mais efetiva que a feomelanina, quando a pele é submetida a irradiação UV, inibindo as espécies reativas formadas (OH *et al.*, 2014). A eumelanina dispersa a radiação ultravioleta e impede a sua penetração, atuando como um filtro absorvente (VENZA *et al.*, 2015). Indivíduos ruivos apresentam uma expressão aumentada de feomelanina, que favorece a uma maior incidência de melanoma (OH *et al.*, 2014). Estudo indica que a feomelanina

forma mais espécies reativas na reação de melanogênese mesmo em baixa incidência de irradiação UV (TESTA; CASTELLI; PELOSI, 2017).

O melanoma sintetiza melanina em quantidades variadas, a produção do pigmento pode ser mínima dificultando o diagnóstico clínico, mas também a total ausência de pigmento pode ocorrer em um número considerável de melanomas indetectáveis clinicamente (PERERA *et al.*, 2013).

A melanina também interfere ativamente na resistência ao quimioterápico Dacarbazina (DAC), pelo comportamento antioxidante da neutralização da espécie reativa formada pelo medicamento, levando ao avanço do câncer e um pior prognóstico para o indivíduo com melanoma metastático (BALDEA; FILIP, 2012; WOLNICKA-GLUBISZ *et al.*, 2014).

#### 1.4 MODELO EXPERIMENTAL DE B16F10

As células B16F10 foram isoladas pela primeira vez em 1973 a partir do tipo celular murino B16 e avaliadas segundo o potencial de metastatização do melanoma maligno em camundongos C57BL/6 (DANCIU *et al.*, 2015) O tipo celular de melanoma murino B16 apresenta um baixo potencial de metastatização *in vivo*, variantes dessa linhagem celular foram selecionadas por suas características de implantação, invasão, sobrevivência e crescimento no pulmão após injeção subcutânea em camundongos C57BL/6 (CARVALHO *et al.*, 2013).

As metástases que foram desenvolvidas no pulmão eram identificadas pela sua pigmentação (melanina) e separadas para isolamento de crescimento em cultura. Assim foi obtida a designada linhagem B16-F1, este processo foi repetido mais nove vezes até a obtenção da linhagem B16F10, que apresentava uma maior potência de metástase no pulmão em relação a B16F1 (FIDLER, 1973, 1975; NICOLSON; BRUNSON; FIDLER, 1978).

A linhagem B16F10 é especializada em invadir a circulação e induzir metástases em modelo murino, portanto é ideal para estudar o tratamento de melanoma maligno metastático, assim como avaliar novos tratamentos para o melanoma (CARVALHO *et al.*, 2013; DANCIU *et al.*, 2015, HUANG *et al.*, 2014).

Anteriormente nosso grupo de pesquisa utilizou esta linhagem celular em estudos visando elucidar possíveis alvos terapêuticos com diferentes drogas como o citral-limão e a metformina. O uso da metformina influenciou tanto *in*

*vitro* havendo a participação predominante de espécies reativas de oxigênio e alterando o estado redox da célula B16F10, quanto *in vivo* chegando a refletir em níveis sistêmicos um estado pró-antioxidante, este estado foi eficiente em reduzir o crescimento tumoral em 54% (SANCHES *et al.*, 2016; SOUZA NETO *et al.*, 2017). Foi observado ainda por Baharara *et al.* (2016), o tratamento de saponinas com o quimioterápico Dacarbazina (DAC) em células de melanoma murino (B16F10), constatando morte celular em 50 % das células tratadas com saponina e DAC, demonstrando que essa linhagem celular é adequada em estudos para verificar tratamentos alternativos no melanoma.

### 1.5 TRATAMENTO DO MELANOMA

O tratamento para o melanoma baseia-se principalmente na fase em que se encontra a doença, em estágios precoces, a ressecção cirúrgica é a mais indicada e a mais efetiva, quando não há metástase do tumor primário. (ISOLA; EDDY; CHEN, 2016). Para a realização da cirurgia, a profundidade do tumor é de extrema relevância e os candidatos a linfadenectomia são então identificados, evitando a morbidade do procedimento em pacientes que não necessitam dele (NIEWEG; GALLEGUO-HERNANDES, 2015). Ainda nos casos detectados precocemente, o custo de tratamento cai, pois o tumor é retirado cirurgicamente, com um índice satisfatório de cura (SATHEESHA *et al.*, 2016).

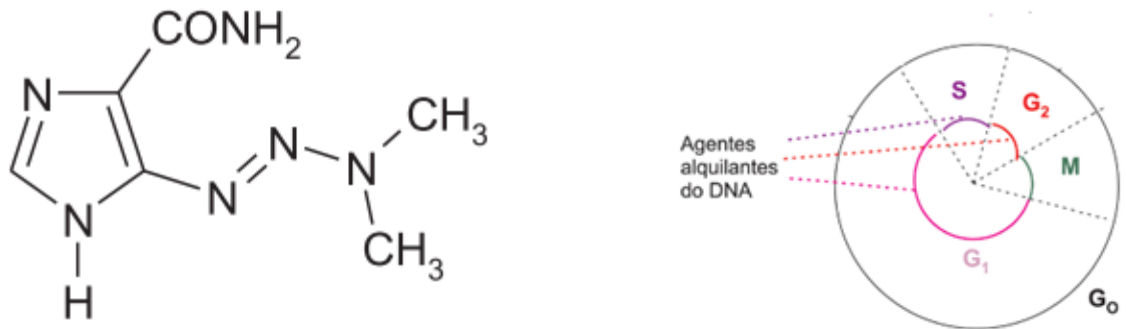
Em estágios avançados do melanoma, a quimioterapia se faz necessária em aproximadamente 60 a 70 % dos indivíduos portadores de câncer de pele quando ocorre a presença prévia de micro metástases, que conduz ao tratamento sistêmico (ALMEIDA *et al.*, 2005). Neste caso, o custo do tratamento se eleva pelo uso de quimioterápicos e radioterapia, e a sobrevida cai drasticamente, ficando por volta de apenas 5%.

Mas pouco progresso foi feito no tratamento sistêmico: desde a década de 1970, o uso de Dacarbazina (DAC) foi introduzido para o tratamento de pacientes com progressão tumoral ou metástases sistêmicas, mas os resultados foram decepcionantes; Apesar disso, a Dacarbazina tem sido a droga mais utilizada até hoje (NIEWEG; GALLEGUO-HERNANDES, 2015).

A Dacarbazina é uma molécula classificada quimicamente como Triazeno (Figura 9A), por apresentar três átomos de nitrogênio ligados em sequência

em uma cadeia aberta (HÖRNER *et al.*, 2008). É classificada farmacologicamente como inibidor do ciclo celular (Figura 9 B) não específico, por se unir ao DNA através da geração de ligações cruzadas em todas as fases da divisão celular. (ALMEIDA *et al.*, 2005).

**Figura 9 - A - Fórmula estrutural da Dacarbazina e B - Gráfico do ciclo celular**



**Fonte:** Adaptado de Almeida *et al.* (2005).

A Dacarbazina foi identificada em 1959, contudo somente em 1975 essa molécula foi aprovada pelo controle norte-americano de drogas e alimentos (FDA) como quimioterápico padrão para ser usado na quarta fase (metástase) do melanoma cutâneo (KOPROWSKA; CZYŚ, 2011; JIN, MISHRA-KALYANI; SRIDHARA, 2018).

O quimioterápico DAC requer uma reação inicial de N-desmetilação pela família citocromo p-450, o metabólito final e ativo gerado a partir das reações químicas sofridas pela DAC corresponde ao íon metildiazônio que metila ácidos nucleicos principalmente bases nitrogenadas de adenina e guanina causando dano direto ao DNA celular. Assim age desnaturando pequenas porções da molécula de DNA, formando ligações cruzadas por alquilação tanto entre as hélices como fora delas (FOLETTTO; HAAS, 2014).

Contudo, a formação do íon metildiazônio aumenta a concentração de espécies reativas, que por sua vez aumenta o estado oxidativo celular. O mecanismo de defesa frente a este aumento do estado oxidativo, favorece a expressão do fator de transcrição nuclear eritróide 2 (Nrf2) que aumenta os níveis de antioxidantes celulares, interferindo na ação da Dacarbazina (AMIRMOSTOFIANA *et al.*, 2013; GADJEVA; DIMOV; GEORGIEVA, 2008; KASAI *et al.*, 2016). Outro mecanismo de ineficácia da ação do quimioterápico relacionado ao estresse

oxidativo deve-se ao aumento da expressão de Glutathione Peroxidase – GPX presente em células de melanoma (WOŪNIAK *et al.*, 2005).

A baixa eficácia, algo em torno de 15%, do quimioterápico Dacarbazina se deve a facilidade de desmetilação das bases nitrogenadas pela enzima guanina O<sup>6</sup> alquil transferase, esta é uma enzima de reparo do DNA, alterando a metilação da base guanina para outro códon de cisteína (MA *et al.*, 2003), este processo é descrito como o principal mecanismo de resistência da Dacarbazina (BAHARARA *et al.*, 2016; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

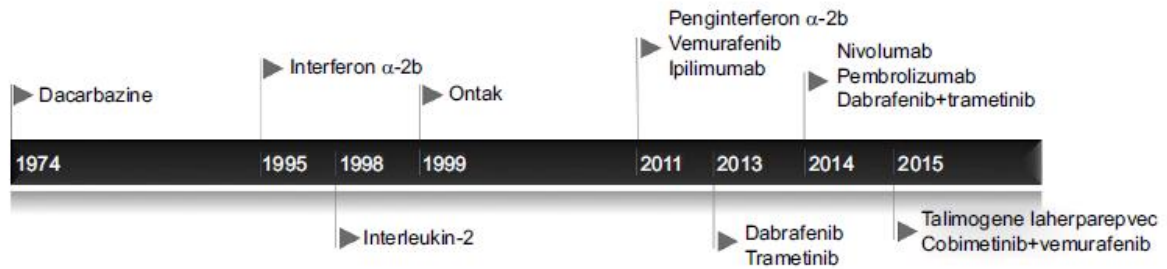
Devido á essa baixa eficácia da Dacarbazina, autores como Ugurel *et al.* (2017) relatam a importância da associação deste medicamento a outras terapias que visam melhorar a efetividade do tratamento contra o melanoma.

Efeitos importantes do medicamento DAC, restringem ainda mais o seu uso, que limita-se a uma curta duração (TENTORI; LACAL; GRAZIANI, 2013). Os efeitos adversos correspondem a mielossupressão (ambas leucopenia e trombocitopenia) com efeito leve até moderado, náusea e vômito em grande parte dos indivíduos chegando a 90 %, além de outros efeitos como febre, mal estar, hepatotoxicidade, calafrios, neurotoxicidade, situações que causam intenso desconforto (FOLETTTO; HAAS, 2014).

A desvantagem desse tratamento com DAC ainda consiste em que o melanoma metastático é resistente a tratamentos convencionais com quimioterápicos, com sobrevida do paciente por até 9 meses, (BALDEA; FILIP, 2012).

Considerando a baixa eficácia da DAC, ao longo dos anos, outros tratamentos (figura 9) foram empregados no combate ao melanoma cutâneo, baseados no local, estágio do tumor e características genéticas conforme Food and Drug Administration (FDA) dos EUA. Além de que estudos demonstram que a associação de terapias tem melhorado a sobrevida para 12 meses (BALDEA; FILIP, 2012; DOMINGUES *et al.*, 2018).

**Figura 10** - História do uso de tratamentos para Melanoma Cutâneo



Fonte: Domingues *et al.* (2018).

Recentemente o melanoma é considerado como um tumor imunogênico pela capacidade de expressão de antígenos proteicos decorrentes da síntese de melanina, o que permite tratamento imune seletivo para este tipo de câncer de pele. (PASQUALI *et al.*, 2018).

A imunoterapia vem sendo empregada com o uso de imunoterápicos como Ipilimumab® (inibidores do receptor CTLA-4 associado a linfócito T citotóxico) que têm se destacando por apresentar resultados promissores no tratamento do melanoma, visando melhorar a resposta imunológica e consequentemente favorecendo a sobrevida dos portadores dessa doença (ACHKAR; TARHINI, 2017; PASQUALI *et al.*, 2018).

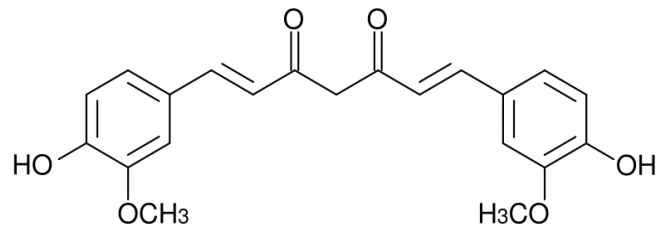
Outra terapia utilizada, é o medicamento inibidor do gene BRAF (gene comumente alterado no melanoma maligno) como o Vermurofenib® que atua na regressão tumoral facilitando a morte celular da célula neoplásica (ATKINSON 2015; TENTORI; LACAL; GRAZIANI, 2013). Inclusive esse medicamento pode ser combinado com o ipilimumab ou outros imunoterápicos para ampliar os mecanismos de inibição do melanoma (YU; SI, 2017).

## 1.6 CURCUMINA

A curcumina, também conhecida como açafrão da terra, é um membro da família dos compostos curcuminoides, caracteriza-se por ser um pigmento fenólico de cor amarela obtido a partir da cúrcuma (*Curcuma longa L.*), pertencente à família da *Zingiberaceae* (STAVRIC, 1994; FOTSIS *et al.*, 1997; POOL-ZOBEL *et al.*, 1997), quimicamente apresenta estrutura q [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona] de um polifenol natural da cúrcuma longa

(Figura 11) (PULIDO-MORAN *et al.*, 2016).

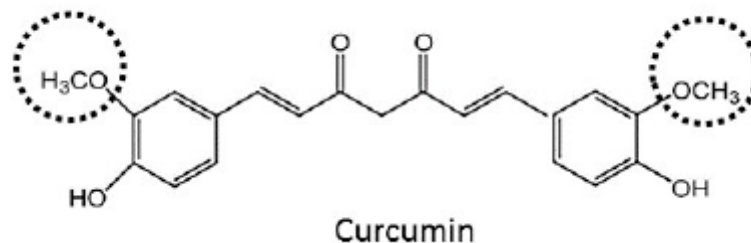
**Figura 11** - Fórmula estrutural da Curcumina



**Fonte:** Sueth-Santiago *et al.* (2015).

Vogel isolou a substância pela primeira vez em 1815, facilitando o estudo da estrutura em 1910 por Milobedzka e Lampe (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015). Na estrutura química da curcumina (figura 12) nota-se dois grupos metoxi no anel fenil que tem importante papel anti-inflamatório por suprimir a atividade do fator nuclear kappa B (NF-κB) através do fator de necrose tumoral - TNF, permitindo a atuação da curcumina em reações relacionadas a homeostase celular (PULIDO-MORAN *et al.*, 2016; SANDUR *et al.*, 2007).

**Figura 12** - Demonstração dos grupos metoxi na estrutura química da curcumina



**Fonte:** Pulido-Moran *et al.* (2016).

A curcumina representa aproximadamente 2% do peso seco do rizoma (caule subterrâneo) e se encontra associada a duas substâncias (Figura 13) desmetoxicurcumina (DMC) e a bisdesmetoxicurcumina (BDMC) que juntas são conhecidas como curcuminóides (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

**Figura 13** - Estrutura química da desmetoxicurcumina e Bisdesmetoxicurcumina



**Fonte:** Pulido-Moran *et al.* (2016).

A porcentagem no rizoma corresponde a 77 % de curcumina, 17% de DMC e 3% de BDMC (PULIDO-MORAN *et al.*, 2016). O metabolismo em relação aos curcuminóides expõe uma biodisponibilidade ineficaz devido a reduzida afinidade pela água que limita o amplo uso clínico da curcumina (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

A característica lipofílica da curcumina que diminui expressivamente a sua utilização clínica, levou a pesquisa que tenta melhorar este aspecto, há experimentos com micelas poliméricas contendo curcumina que aumentam sua biodisponibilidade melhorando suas propriedades antitumorais (LU *et al.*, 2015).

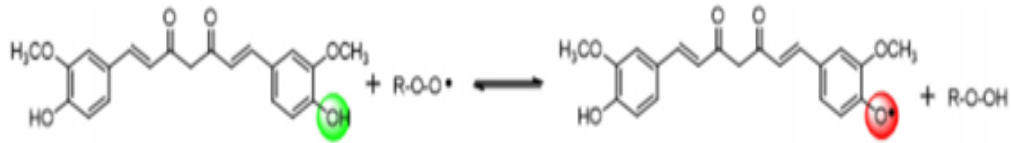
### 1.7 AÇÃO DA CURCUMINA

A curcumina é amplamente utilizada como corante de alimentos e tem sido extensivamente investigado como um antioxidante natural que atua sequestrando os radicais livres e inibe a peroxidação lipídica, agindo na proteção celular das macromoléculas celulares, incluindo o DNA (KUNCHANDY; RAO, 1990; SUBRAMANIAN *et al.*, 1994).

A curcumina também atua inibindo as enzimas oxidases do complexo p-450 que são encontradas no retículo endoplasmático celular (SHAMSI *et al.*, 2017), principalmente as enzimas CYP1A1, CYP1A2 e CYP3A4 que participam diretamente da degradação da Dacarbazina o que permite a ação deste fármaco por mais tempo no local de atuação, concluindo então que a curcumina aumenta a ação do quimioterápico (LEWIS; MACKENZIE; MINERS, 2011).

Considerando a propriedade antioxidante da curcumina (Figura 14), um dos mecanismos deve-se a presença em sua estrutura de um grupo metileno alfa com baixa estabilidade de elétrons, que atua como um excelente doador de átomos de hidrogênio (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

**Figura 14** - Mecanismo da capacidade antioxidante da curcumina



**Fonte:** Adaptado de Sueth-Santiago *et al.* (2015).

Ainda Pulido-Moran *et al.* (2016) relata a curcumina interferindo nas reações celulares envolvidas na formação de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), peróxido de hidrogênio e o radical oxido nítrico, reduzindo a formação de espécies reativas e favorecendo a capacidade dos sistemas antioxidantes celulares na diminuição do estresse oxidativo envolvido na carcinogênese. A diminuição da geração do ânion superóxido é devido a uma menor exposição da subunidade p47 phox do complexo enzimático NADPH oxidase (SOARES *et al.*, 2015). De fato, Venza *et al.* (2015) demonstrou que a transformação de melanócito normal para maligno é inibida pela curcumina pelo mecanismo de regulação negativa de formação de espécies reativas intracelulares.

Outras pesquisas demonstram que a curcumina desenvolve propriedade antioxidante interferindo diretamente no mecanismo endógeno da célula neoplásica, aumentando a expressão do fator nuclear eritrocitário 2 (NRF2) que por sua vez aumenta a resposta antioxidante da célula, e age indiretamente como scavenger de radicais livres (GONZÁLEZ-REYES *et al.*, 2013).

Além disso, a curcumina ativa o processo de apoptose celular no melanoma pelo aumento da atividade das caspases 3 e 8 (LELLIA; PEDONEA; SAHEBKAR, 2017), dificulta a migração e a invasão do melanócito transformado, por reduzir a expressão e a atividade de enzimas que decompõe a matriz celular, a partir das metaloproteinases (ALISI *et al.*, 2018) e diminuem a expressão do fator nuclear kappa B - NF- $\kappa$ B (ALQATHAMA; PRIETO, 2014) desfavorecendo o processo de metástase da célula cancerígena.

A curcumina influencia a melanogênese reduzindo a concentração de melanina em células B16F10, quando os melanócitos são expostos a hormônios estimuladores ( $\alpha$ -MSH), a enzima tirosinase responde a baixa expressão do gene fator de transcrição de microftalmia (MIFT) alterando a regulação das enzimas da síntese de melanina e da proliferação celular (FLAHERTY; HODI; FISHER, 2012;

WOLNICKA-GLUBISZ *et al.*, 2014).

Faião-Flores *et al.* (2015) comparou a eficácia de um composto análogo da curcumina (DM-1) e o quimioterápico Dacarbazina (DAC). Inoculou células de melanoma murino B16F10 por via intraperitoneal em camundongos C57BL6 e inoculou pela mesma via nos grupos (DM-1), (DAC) e (DM-1 + DAC). O composto DM-1 tem características antimetástáticas e antiproliferativas que no experimento não interagiu com células normais, causando dano oxidativo nas células B16F10, o que não foi observado no quimioterápico DAC que interagiu também com as células normais. Os autores verificaram que o tratamento combinado DM-1 + DAC teve um aumento significativo (100%) da sobrevivência do grupo comparado ao grupo tratado somente com Dacarbazina (40%) e somente com DM-1 (60%).

Diante desse panorama do câncer de pele do tipo melanoma, notamos sua gravidade e sua incidência aumentando de maneira progressiva. O quimioterápico utilizado em estágios avançados da doença é a Dacarbazina, que apresenta baixa eficácia na remissão do câncer e nenhum aumento significativo na sobrevivência do indivíduo. O uso de antioxidantes é controverso em diversas patologias inclusive no melanoma.

Nesse contexto, a curcumina com propriedades antioxidante e antineoplásica em diversos tipos de câncer, entre eles o melanoma, poderia quando associada a Dacarbazina, melhorar a sua ação.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o papel do estresse oxidativo na ação da Dacarbazina em célula de melanoma murino (B16F10) após pré-tratamento com trolox e curcumina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar in vitro as concentrações de trolox, curcumina e Dacarbazina não citotóxicas para as células B16F10.
- Analisar in vitro a ação da Dacarbazina na célula B16F10.
- Pelo método de Quimioluminescência (QL), observar a formação de lipoperóxidos em células de B16F10.

## REFERÊNCIAS

- ACHKAR, T; TARHINI, A. A. The use of immunotherapy in the treatment of melanoma. **Journal of Hematology & Oncology**, London, v. 10, n. 1, p. 2-9, 2017.
- AKABERI, M.; EMAMI, S. A.; VATANI, M.; TAYARANI-NAJARAN, Z. Evaluation of Antioxidant and Anti-Melanogenic Activity of Different Extracts of Aerial Parts of *N. Sintonisii* in Murine Melanoma B16F10 Cells. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, Mashhad, v. 17, n. 1, p. 225-235, 2018.
- ALI, S. A.; NAAZ, I. Biochemical aspects of mammalian melanocytes and the emerging role of melanocyte stem cells in dermatological therapies. **International Journal of Health Sciences**, Madhya Pradesh, India, v. 12, n. 1, p. 69-76, Feb. 2018.
- ALISI, I. O.; UZAIRU, A.; ABECHI, S. E.; IDRIS, S. O. Evaluation of the antioxidant properties of curcumin derivatives by genetic function algorithm. **Journal of Advanced Research**, Katsina State, V. 12, p. 47-54, Jul. 2018.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p.118-129, jan./fev. 2005.
- ALQATHAMA, A.; PRIETO, J. M. Natural products with therapeutic potential in melanoma metastasis. **The Royal Society of Chemistry**, Londres, v. 32, n. 8, p. 1170-1182, Oct. 2014.
- AL-ZOU, A. B.; THABIT, M. A.; ALSAKKAF, K. A.; BASALEEM, H. O. Skin cancer: clinico-pathological study of 204 patients in southern governorates of yemen. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Bangkok, v. 17, n. 7, p. 3195-3199, 2016.
- AMIRMOSTOFIAN, M.; JAKTAJI, J. P.; SOLEIMANI, Z.; TABIB, K.; TANBAKOSAZAN, F.; OMRANI, M.; KOBARFARDA, F. Synthesis and Molecular-cellular mechanistic study of pyridine derivative of dacarbazine. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, Iran, v. 12, n. 3, p. 255-265, 2013.
- ARAUJO, I. C.; COELHO, C. M. S.; SALIBA, G. A. M.; LANA, P. C.; ALMEIDA, A. C. M.; PEREIRA, N. A.; FONSECA, R. P. L.; SILVA FILHO, A. F. Melanoma cutâneo: aspectos cínicos, epidemiológicos e anatomopatológicos de um centro de formação em Belo Horizonte. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, Belo Horizonte, v. 29, n 4, p. 497-503, 2014.
- ATKINSON, V. Medical management of malignant melanoma. **Australian Prescriber**, Brisbane, v. 38, n. 3, p. 73-78, June 2015.
- BAHARARA, J.; AMINI, E.; NIKDEL, N.; SALEK-ABDOLLAHI, F. The cytotoxicity of dacarbazine potentiated by sea cucumber saponin in resistant B16F10 melanoma cells through apoptosis induction. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, Tehran, v. 8, n. 3, p. 112-119, 2016.

BALDEA, I.; FILIP, A. G. Photodynamic therapy in melanoma - an update. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Krakow, v. 63, n. 2, p. 109-118, 2012.

BERNARDES, S. S.; SOUZA-NETO, F. P.; MELO, G. P.; GUARNIER, F. A.; MARINELLO, P. C.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A. L. Correlation of TGF- $\beta$ 1 and oxidative stress in the blood of patients with melanoma: a clue to understanding melanoma progression? **Tumor Biology**, Londrina, v. 37, n. 8, p. 10753-10761, 2016.

BLAYDON, D. C.; KELSELL, D. P. Defective channels lead to an impaired skin barrier. **Journal of Cell Science**, London, v. 127, n. 20, p. 4343-4350. 15 out. 2014.

CARVALHO, A. A.; COSTA, P. M.; SOUZA, L. G. S.; LEMOS, T. L.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. Inhibition of metastatic potential of B16-F10 melanoma cell line in vivo and in vitro by biflorin. **Life Sciences**, Oxford, v. 93, n. 5, p. 201-207, 21 maio 2013.

CERVENKA, P. D.; PEREZ, L.; PEREZ, D. E.; JONES, B. Melanoma metastasis to the mandible-case report and comprehensive literature review. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 75, n. 9, p. 1-12, 2017.

CHAIPRASONGSUK, A.; ONKOKSOONG, T.; PLUEMSAMRAN, T.; LIMSAENGURAI, S.; PANICH, U. Photoprotection by dietary phenolics against melanogenesis induced by UVA through Nrf2-dependent antioxidant responses. **Redox Biology**, Amsterdam, v. 8, p. 79-90, 2016.

CLAYTON, K.; VALLEJO, A. F.; DAVIES, J.; SIRVENT, S.; POLAK, M. E. Langerhans cells-programmed by the epidermis. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 8, p. 1-11, 2017.

CUNHA, M. G.; CUNHA, A. L. G.; MACHADO, C. A. Hypodermis and subcutaneous adipose tissue - two different structures. **Surgery Cosmetology Dermatology**, Santo André, v. 6, n. 4, p. 355-359, 2014.

D'MELLO, S. A.; FINLAY, G. J.; BAGULEY, B. C.; ASKARIAN-AMIRI, M. E. Signaling pathways in melanogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 17, n. 7, p. 1-18, 2016.

DANCIU, C.; OPREAN, C.; CORICOVAC, D. E.; ANDREEA, C.; CIMPEAN, A.; RADEKE, H.; SOICA, C.; DEHELEAN, C. Behaviour of four different B16 murine melanoma cell sublines: C57BL/6J skin. **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v. 96, n. 2, p. 73-80, 2015.

DAY, C. P.; MARCHALIK, R.; MERLINO, G.; MICHAEL, H. Mouse models of UV-induced melanoma: genetics, pathology, and clinical relevance. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 97, n. 6, p.698-705, 2017.

DENAT, L.; KADEKARO, A. L.; MARROT, L.; LEACHMAN, S. A.; ABDEL-MALEK, Z. A. Melanocytes as instigators and victims of oxidative stress. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 134, n. 6, p. 1512-1518, 2014.

DOMINGUES, B.; LOPES, J. M.; SOARES, P.; PÓPUL, H. Melanoma treatment in

review. **Immunotargets and Therapy**, Auckland, v. 7, p. 35-49, 2018.

DUNAWAY, S.; ODIN, R.; ZHOU, L.; JI, L.; ZHANG, Y.; KADEKARO, A. L. Natural antioxidants: multiple mechanisms to protect skin from solar radiation. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 9, n. 392, p.1-14, 2018.

FAIÃO-FLORES, F.; QUINCOES SUAREZ, J. A.; FRUET, A. C.; MARIA-ENGLER, S. S.; PARDI, P. C.; MARIA, D. A. Curcumin analog DM-1 in monotherapy or combinatory treatment with dacarbazine as a strategy to inhibit in vivo melanoma progression. **Plos One**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. 1-16, 2015.

FIDLER, I. J. Selection of successive tumor lines for metastasis. **Nature New Biology**, London, v. 242, n. 118, p. 148-9, 1973.

FILDER, I. J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. **Cancer Research**, Baltimore, v. 35, n. 1, p. 218-24, 1975.

FLAHERTY, K. T.; HODI, F. S.; FISHER, D. E. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 12, n. 5, p. 349-361, 2012.

FOLETTTO, M. C.; HAAS, S. E. Cutaneous melanoma: new advances in treatment. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 2, p. 301-310, 2014.

FOTSIS, T.; PEPPER, M. S.; AKTAS, E.; BREIT, S.; RASKU, S.; ADLERCREUTZ, H.; WÄHÄLÄ, K.; MONTESANO, R.; SCHWEIGERER, L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. **Cancer Research**, Baltimore, v. 57, n. 14, p. 2916-2921, 1997.

GADJEVA, V.; DIMOV, A.; GEORGIEVA, N. Influence of therapy on the antioxidant status in patients with melanoma. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, Bulgária, v. 33, n. 2, p. 179-185, 2008.

GILLBRO, J. M.; OLSSON, M. J. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents – existing and new approaches. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 210-221, 2011.

GOLDINGER, S. M.; MURER, C.; STIEGER, P.; DUMMER, R. Targeted therapy in melanoma – the role of BRAF, RAS and KIT mutations. **EJC Supplements**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 92-96, 2013.

GONZÁLEZ-REYES, S.; GUZMÁN-BELTRÁN, S.; MEDINA-CAMPOS, O. N.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Curcumin pretreatment induces Nrf2 and an antioxidant response and prevents hemin-induced toxicity in primary cultures of cerebellar granule neurons of rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, New York, v. 2013, n. 1, p. 1-15, 2013.

HÖRNER, M.; GIGLIO, F.; SANTOS, A. J. R.; WESTPHALEN, A. B.; IGLESIAS, B. A.; MARTINS, P. R.; AMARAL, C. H.; MICHELOT, T. M.; REETZ, L. G. B.; BERTONCHELI, C. M.; PARAGINSKI, G. L.; HORNER, R. Triazenos e atividade antibacteriana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 441-448, set. 2008.

HUANG, H. C.; HSIEH, W. Y.; NIU, Y. L.; CHANG, T. M. Inhibitory effects of adlay extract on melanin production and cellular oxygen stress in B16F10 melanoma cells. **International Journal of Molecular Sciences**, Taiwan, v. 15, n. 9, p. 16665-16679, 2014.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_melanoma/definicao](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao). Acesso em: 17 maio 2018.

ISOLA, A. L.; EDDY, K.; CHEN, S. Biology, therapy and implications of tumor exosomes in the progression of melanoma. **Cancers**, Basel, v. 8, n. 12, p. 110, 2016.

JIN, S.; MISHRA-KALYANI, P. S.; SRIDHARA, R. Unresectable and metastatic melanoma of the skin: literature review of clinical trials and efficacy endpoints since 2000. **Therapeutic Innovation & Regulatory Science**, Silver Spring, v. 5, n. 20, p. 1-11, Mar. 2018.

KASAI, S.; ARAKAWA, N.; OKUBO, A.; SHIGEEDA, W.; YASUHIRA, S.; MASUDA, T.; AKASAKA, T.; SHIBAZAKI, M.; MAESAWA, C. NAD (P)H: quinone oxidoreductase-1 expression sensitizes malignant melanoma cells to the HSP90 inhibitor 17-AAG. **Plos One**, San Francisco, v. 11, n. 4, p. 1-11, 2016.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. T. **Farmacologia básica e clínica**. 12. ed. São Paulo: Artmed, 2014.

KOPROWSKA, K.; CZYŚ, M. Dacarbazine, a chemotherapeutic against metastatic melanoma and a reference drug for new treatment modalities. **Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej**, Polônia, v. 65, p. 734-751, 2011.

KOROSEC, A.; FRECH, S.; GESSLBAUER, B.; VIERHAPPER, M.; RADTKE, C.; PETZELBAUER, P.; LICHTENBERGER, B. M. Lineage identity and location within the dermis determine the function of papillary and reticular fibroblasts in human skin. **Journal Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 139, n. 2, p. 342-351, 2019.

KUNCHANDY, E.; RAO, M. N. A. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 58, p. 237-240, 1990.

LELLIA, D.; PEDONEA, C.; SAHEBKAR, A. Curcumin and treatment of melanoma: the potential role of micrnas. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Rome, v. 88, n. 1, p. 832-834, 2017.

LEWIS, B. C.; MACKENZIE, P. I.; MINERS, J. O. Application of homology modeling to generate CYP1A1 mutants with enhanced activation of the cancer chemotherapeutic prodrug dacarbazine. **Molecular Pharmacology**, Bethesda, v. 80, n. 5, p.879-888, 2011.

LIMA, R. L. F.; NÓBREGA, M. Q. R.; MORAES, M. L. S. A.; MIGUEL, M. C. C.; LIMA, K. C.; SILVEIRA, E. J. D. Estudo retrospectivo de melanomas cutâneos e mucosos na população do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 3, p. 493-499, 2009.

LU, Y.; MIAO, L.; WANG, Y.; XU, Z.; ZHAO, Y.; SHEN, Y.; XIANG, G.; HUANG, L.

- Curcumin micelles remodel tumor microenvironment and enhance vaccine activity in an advanced melanoma model. **The American Society of Gene & Cell Therapy**, San Diego, v. 24, n. 2, p. 364-374, 2015.
- MA, S.; EGYHÁZI, S.; UENO, T.; LINDHOLM, C.; KREKLAU, E. L.; STIERNER, U.; RINGBORG, U.; HANSSON, J. O6-methylguanine-DNA-methyltransferase expression and gene polymorphisms in relation to chemotherapeutic response in metastatic melanoma. **British Journal of Cancer**, London, v. 89, n. 8, p. 1517-1523, 2003.
- NICOLSON, G. L.; BRUNSON, K. W.; FIDLER, I. J. Specificity of Arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cells linesd. **Cancer Research**, Maryland, v. 1, n. 38, p.4105-4111, 1978.
- NIEWEG, O. E.; GALLEGO-HERNANDES, J. F. Cutaneos Malignant melanoma and the new drugs. **Cirurgia y Cirujanos**, México, v. 83, n. 2, p. 175-180, 2015.
- NAIDOO, C.; KRUGER, C. A.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy for metastatic melanoma treatment: a review. **Technology In Cancer Research & Treatment**, Schenectady, v. 17, n. 2018, p.1-15, 2018.
- NURDJAJA, V.; YOZU, M.; MATHY, A. Essential components of melanoma histopathological reporting: the surgical oncologist's perspective. **Journal of Skin Cancer**, New York, p. 1-4, 2018.
- OH, C. T.; LEE, D.; KOO, K.; LEE, J.; YOON, H. S.; CHOI, Y. M.; KWON, T. R.; KIM, B. J. Superoxide dismutase 1 inhibits alpha-melanocyte stimulating hormone and ultraviolet b-induced melanogenesis in murine skin. **Annals of Dermatology**, Seoul, v. 26, n. 6, p. 681-687, 2014.
- PASQUALI, S.; HADJINICOLAOU, A. V.; CHIARION, S.; ROSSI, C. R.; MOCELLIN, S. **Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma**. Milano: Cochrane Skin Group, 2018.
- PERERA, E.; GNANESWARAN, N.; JENNENS, R.; SINCLAIR, R. Malignant melanoma. **Healthcare Journal**, Basel, v. 2, n. 1, p. 1-19, 2013.
- PIKE, E.; HAMIDI, V.; SAETERDAL, I.; ODGAARD-JENSEN, J.; KLEMP, M. Multiple treatment comparison of seven new drugs for patients with advanced malignant melanoma: a systematic review and health economic decision model in a Norwegian setting. **BMJ Open**, London, v. 7, n. 8, p. 1-18, 2017.
- POOL-ZOBEL, B. L.; BUB, A.; MÜLLER, H.; WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. **Carcinogenesis**, New York, v. 18, n. 9, p. 1847-1850, 1997.
- PROST-SQUARCIONI, C. Histologie de la peau et des follicules pileux. **Medicine Sciences**, Paris, v. 22, n. 2, p.131-137, 2005.
- PULIDO-MORAN, M.; MORENO-FERNANDEZ, J.; RAMIREZ-TORTOSA, C.; RAMIREZ-TORTOSA, M. Curcumin and Health. **Molecules**, Granada, v. 264, n. 21,

p. 2-22, 2016.

PULLAR, J. M.; CARR, A. C.; VISSERS, M. C. M. The roles of vitamin C in skin health. **Nutrients**, Basel, v. 9, n. 866, p. 2-27, 2017.

ROH, M. R.; PHILIP, E. B. S.; SAMEER, G. B. A.; JANE, M.; GRANT-KELS, M. D.; HENSIN, D. Cutaneous melanoma in women. **International Journal of Women's Dermatology**, Amsterdam, v. 3, suppl. 1, p. 21-25, 2015.

ROSA, T. G.; SANTOS, S. N.; PINTO, T. J. A.; GHISLENI, D. D. M.; BARJA-FIDALGO, T. C.; RICCI-JUNIOR, E.; AI-QAHTANI, M.; KOZEMPEL, J.; BERNARDES, E. S.; SANTOS-OLIVEIRA, R. Microradiopharmaceutical for metastatic melanoma. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 34, n. 12, p. 2922-2930, 2017.

SAHLE, F. F.; GEBRE-MARIAM, T.; DOBNER, B.; WOHLRAB, J.; NEUBERT, R. H. Skin diseases associated with the depletion of stratum corneum lipids and stratum corneum lipid substitution therapy. **Skin Farmacology and Physiology**, University of Halle-Wittenberg, Basel, v. 28, n. 1, p. 42-55, 2014.

SANCHES, L. J.; MARINELLO, P. C.; PANIS, C.; FAGUNDES, T. R.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; FREITAS JUNIOR, J. C.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A. L.; LUIZ, R. C. Cytotoxicity of citral against melanoma cells: The involvement of oxidative stress generation and cell growth protein reduction. **Tumor Biology**, Tokyo, v. 39, n. 3, p. 1-15, 2016.

SANDUR, S. K.; PANDEY, M. K.; SUNG, B.; AHN, K. S.; MURAKAMI, A.; SETHI, G.; LIMTRAKUL, P.; BADMAEV, V.; AGGARWAL, B. B. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 28, n. 8, p. 1765-1773, 2007.

SATHEESHA, T. Y.; SATYANARAYANA, D.; GIRI, P. M. N.; KASHYAP, D. D. Melanoma is skin deep: A 3D reconstruction technique for computerized dermoscopic skin lesion classification. **Journal of Translational Engineering in Health And Medicine**, New York, v. 5, p. 2168-2372, 2016.

SCHADENDORF, D.; VAN AKKOOI, A. C. J.; BERKING, C.; GRIEWANK, K. G.; GUTZMER, R.; HAUSCHILD, A.; STANG, A.; ROESCH, A.; UGUREL, S. Melanoma. **Lancet**, London, v. 392, n. 2018, p. 971-984, 2018.

SHAMSI, S.; TRAN, H.; TAN, R. S.; TAN, Z. J.; LIM, L. Y. Curcumin, Piperine, and Capsaicin: a comparative study of spice-mediated inhibition of human cytochrome P450 isozyme activities. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 45, n. 1, p. 49-55, 2017.

SILVA, S. A. M.; MICHNIAK-KOHN, B.; LEONARDI, G. R. An overview about oxidation in clinical practice of skin aging. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, São Paulo, v. 3, n. 92, p. 367-374, 2015.

SLOMINSKI, A.; KIM, T. K.; BROŻYNA, A. A.; JANJETOVIC, Z.; BROOKS, D. L.; SCHWAB, L. P.; SKOBOWIAT, C.; JÓŻWICKI, W.; SEAGROVES, T. N. The role of

melanogenesis in regulation of melanoma behavior: Melanogenesis leads to stimulation of HIF-1 $\alpha$  expression and HIF-dependent attendant pathways. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 1, n. 1, p.79-93, 2014.

SOARES, E. R.; ELISA, B.; MONTEIRO, R. C. S.; ALINE, B.; FLAVIA, S.; THAÍSA, M.; CRISTIANE, A. C.; JULIO, B. D. Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição. **Hupe: Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, p. 64-72, 2015.

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

STENEHJEM, J. S.; GRIMSRUD, T. K.; REES, J. R.; VOS, L.; BABIGUMIRA, R.; VEIERØD, M. B.; ROBSAHM, T. E. A protocol for prospective studies of 25-hydroxyvitamin D, leptin and body mass index in relation to cutaneous melanoma incidence and survival. **BMJ Open**, London, v. 7, n. 6, p. 014829-014829, 2017.

STAVRIC, B. Antimutagens and anticarcinogens in foods. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 79-90, 1994.

SUBRAMANIAN, M.; SREEJAYAN, R. M. N.; DEVASAGAYAM, T. P.; SINGH, B. B. Diminution of singlet oxygen-induced damage by curcumin and related antioxidants. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 311, n. 2, p. 249-255, 1994.

SUETH-SANTIAGO, V.; MENDES-SILVA, G. P.; DECOTÉ-RICARDO, D.; LIMA, M. E. F. Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: Introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 538–552, 2015.

TENTORI, L.; LACAL, P. M.; GRAZIANI, G. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. **Trends in Pharmacological Sciences**, Rome, v. 34, n. 12, p. 656-665, 2013.

TESTA, U.; CASTELLI, G.; PELOSI, E. Melanoma: genetic abnormalities, tumor progression, clonal evolution and tumor initiating cells. **Medical Sciences**, Rome, v. 5, n. 28, p. 1-70, 2017.

UGUREL, S.; LOQUAI, C.; TERHEYDEN, P.; SCHADENDORF, D.; RICHTIG, E.; UTIKAL, J.; GUTZMER, R.; RASS, K.; SUNDERKÖTTER, C.; STEIN, A.; FLUCK, M.; KAATZ, M.; TREFZER, U.; KÄHLER, K.; STADLER, R.; BERKING, C.; HÖLLER, C.; KERSCHKE, L.; EDLER, L.; KOPP-SCHNEIDER, A.; BECKER, J. C. Chemosensitivity-directed therapy compared to dacarbazine in chemo-naive advanced metastatic melanoma: a multicenter randomized phase-3 DeCOG trial. **Oncotarget**, Albany, v. 8, n. 44, p. 76029-76043, 2017.

VARMA, S. R.; SIVAPRAKASAM, T. O.; MISHRA, A.; KUMAR, L. M.; PRAKASH, N. S.; PRABHU, S.; RAMAKRISHNAN, S. Protective effects of triphala on dermal fibroblasts and human keratinocytes. **Plos One**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. 1-20, 2016.

VENZA, M.; VISALLI, M.; BENINATI, C.; GAETANO, G. V.; TETI, D.; VENZA, I.

Cellular mechanisms of oxidative stress and action in melanoma. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Austin, v. 2015, p.1-11, 2015.

WAINSTEIN, A. J. A.; BELFORT, F. A. Conduta para o melanoma cutâneo. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Belo Horiznte, v. 31, n. 3, p. 204-214, 2004.

WOLNICKA-GLUBISZ, A.; NOGAL, K.; ŻĄDŁO, A.; PŁONKA, P. M. Curcumin does not switch melanin synthesis towards pheomelanin in B16F10 cells. **Archives of Dermatology Research**, Berlin, v. 307, n. 1, p. 89-98, 2014.

WOŹNIAK, A.; DREWA, G.; WOŹNIAK, B.; SCHACHTSCHABEL.; MILA-KIERZENKOWSKA, C.; DREWA, T.; OLSZEWSKA-SŁONINA, D.; SOPOŃSKA, M. The effect of antitumor drugs on oxidative stress in B16 and S91 melanoma cells in vitro. **Medical Science Monitor**, Warsaw, v. 11, n. 1, p. 22-29, 2005.

YAMAMOTO, Y.; KODAMA, K.; MANIWA, T.; TAKEDA, M.; TANAKA, Y.; OZAWA, K.; ISEI, T. Primary malignant melanoma of the lung: a case report. **Molecular and Clinical Oncology**, London, v. 7, N. 1, p. 39-41, 2017.

YU, Z.;SI, L. Immunotheray of patients with metastatic melanoma. **Chinese Clinical Oncology, Peking University Cancer Hospital & Instituty**, Beijing, v. 2, n. 6, p. 1-9, 2017.

ZITO, P. M.; SCHARF, R. **Cancer, melanoma, head and neck**. Treasure Island: Statpearls, 2018.

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

#### THE EFFECT OF TROLOX AND CURCUMIN ON THE ACTION OF DACARBAZINE ON MURINE MELANOMA CELLS (B16F10)<sup>1</sup>

Paola Gomes Benício Souza <sup>1</sup>, Fernando Pinheiro de Souza Neto <sup>1</sup>, Alessandra Lourenço Cecchini <sup>2</sup>, Rubens Cecchini <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Pathophysiology and Free Radicals, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Pathology, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

**Corresponding author:** Alessandra Lourenço Cecchini.

E-mail: [alcecchini@uel.br](mailto:alcecchini@uel.br)

Fax: +55 (43) 3371 42 67

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, Brasil

---

<sup>1</sup> O artigo está normalizado de acordo com as normas da Revista Brazilian Journal of Oncology.

**THE EFFECT OF TROLOX AND CURCUMIN ON THE ACTION OF  
DACARBAZINE ON MURINE MELANOMA CELLS (B16F10)**

**ABSTRACT**

**Introduction and objectives** The annual increase in the number of new cases of melanoma in the world is of greater concern due to its high mortality rate and lower efficacy of the treatment with Dacarbazine (DTIC) of around 20%. Therefore several search seek for improvements in DTIC treatment and / or new treatment alternatives. DTIC is the standard treatment in the most severe stages of melanoma. Curcumin is widely used as a food dye and has been extensively investigated as a natural antioxidant that acts to inhibit free radicals and lipid peroxidation by acting on the cellular protection of cell macromolecules including DNA. Acts by inhibiting the enzymes of the p-450 complex responsible for the degradation of DTIC potentiating the effect of chemotherapy. For the achievement the research, we made use of the murine melanoma cell line B16F10. The objective of this study was to elicit the role of DTIC-induced oxidative stress in B16F10 murine melanoma cells and to observe the effect of a pre-treatment with antioxidants on the action of Dacarbazine using curcumin (*Curcuma longa* extract) and antioxidant standard (Trolox is the vitamin E analogue). **Material and methods:** Three groups pre treatment (24h before treatment with DTIC) were make with Trolox Group (500 $\mu$ M), Curcumin group (10  $\mu$ M) and Trolox (500 $\mu$ M) + Curcumin (10  $\mu$ M) group. B16F10 cells were exposed to DTIC treatment (500  $\mu$ g/mL) for 24h. Assays were performed with cytotoxicity/proliferation and lipoperoxidation. **Results** We found a higher cytotoxicity and decrease proliferation at the DTIC group in the cell line B16F10 demonstrating chemotherapeutic effect on this cells ( $p < 0.05$ ). The pre-treatment of Curcumin group showed a potentiation the effect cytotoxic and antiproliferative of DTIC ( $p < 0.05$ ). Whereas environment oxidative contributes to melanoma cells spread, it was observed also the

formation of membrane lipoperoxides at the groups. We found that the pre- treatment curcumin group presented higher level of lipoperoxidation ( $p < 0.05$ ). **Conclusion** It concludes that curcumin showed cytotoxic activity and antiproliferative effect on murine melanoma B16F10 cells, improving the action of the chemotherapeutic DTIC by inhibiting the process of degradation of the chemotherapeutic also increasing lipoperoxidation in the cells B16F10.

**Keywords:** Dacarbazine; Melanoma cutaneous; Curcumin; Oxidative stress; B16F10.

## INTRODUCTION

Melanoma is a malignant neoplasm of skin. Because it is highly aggressive (high metastatic capacity), it can reach, in severe cases of the disease, up to 80% of death, even with an incidence of only 3% of human skin malignant neoplasia<sup>(1-3)</sup>. Several studies deal with the annual increase in new occurrences of this type of cancer in Brazil and in the World, raising a concern with the increase of the mortality rate<sup>(3,4)</sup>.

In the treatment of metastatic melanoma, the chemotherapeutic used is Dacarbazine (DTIC). The mechanism of action of this drug involves the formation of the methyldiazonium ion that methyl the nitrogenous bases of the DNA (adenine and guanine), preventing the protein synthesis of the transformed melanocyte. In the process of metabolism of DTIC, there is the increase of reactive species due to the release of the methyldiazonium ion favoring an intracellular pro-oxidant state<sup>(5,6)</sup>.

Dacarbazine has been used despite its low efficacy (around 20%) in the treatment of melanoma in patients with advanced disease staging<sup>(1)</sup>. Research in the sense of search for therapeutic associations that improve the action of Dacarbazine are in constant study<sup>(7)</sup>. Immunotherapy has been used with the use of immunotherapeutics such as Ipilimumab (inhibitors of CTLA-4 receptor associated with cytotoxic T lymphocytes) that have been outstanding for presenting promising results in the treatment of melanoma aiming to improve the immune response favoring the survival of patients with this disease<sup>(8,9)</sup>.

Another therapy used is the inhibitor drug of BRAF (gene commonly altered in malignant melanoma) such as Vermurofenib that acts on tumor regression facilitating cell death of the neoplastic cell<sup>(10,11)</sup>. Even this drug can be combined with ipilimumab or other immunotherapeutics to amplify the mechanisms of melanoma inhibition<sup>(12)</sup>.

Curcumin, the main active agent of turmeric, a plant-derived natural antioxidant (*curcuma longa L.*), has been widely used in research with various types of cancer, for

example in the Li et al. <sup>(13)</sup> study on colorectal cancer, a daily dose of 360 mg curcumin was observed to act as a colon chemoprotector. In melanoma, the research by Venza et al. <sup>(14)</sup> has shown that the transformation of normal to malignant melanocytes is inhibited by curcumin by means of negative regulation of intracellular reactive species. Research into the use of curcumin in melanoma cancer cells has shown favorable results, reducing cell proliferation and inducing apoptosis <sup>(15)</sup>.

In vivo studies with curcumin performed by Das and Vinayak <sup>(16)</sup>, demonstrate antioxidant properties that directly interfere in the endogenous mechanism of the neoplastic cell, increasing the antioxidant response of the cell expressive results in the use of combination of Dacarbazine and an analog of curcumin in vitro and in vivo with B16F10 cells were demonstrated by Faião-flores et al <sup>(17)</sup>.

In this context, we intend with this study to seek a better understanding the interference of oxidative stress (EO) caused by the action of the chemotherapeutic in the B16F10 cell and observe of the influence with by antioxidants such as trolox and curcumin, in the action of Dacarbazine. Also knowing that there is the participation of oxidative stress EO in the mechanism of melanoma tumor metastasis, in which the formation of membrane lipoperoxides is an indicative of EO <sup>(18)</sup>. Whereas the formation of lipoperoxides is directly related to cellular oxidative damage <sup>(19)</sup>.

Our research utilizes a pretreatment with trolox and curcumin 24 hours prior to treatment with Dacarbazine to evaluate the efficacy of this chemotherapeutic by observing cell damage from the levels of lipoperoxides in B16F10 cells.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell culture**

To accomplish the research, we made use of the murine melanoma cell line B16F10.

The material was seeded in 25 mm<sup>3</sup> culture flasks in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Thermo Fisher USA) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Thermo Fisher, USA) and 1% penicillin / Streptomycin (Santa Cruz, Biotechnology, USA). This cell culture was maintained in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C (Sanyo CO2 Incubator; Sanyo, Kitanagoya, Aichi, Japan) for maintenance of cell culture for 24 time. Three in vitro treatment steps were taken in the experiment: with trolox (vitamin E analog); with curcumin; and with Dacarbazine (DTIC) for 24 hours.

#### **Treat with Trolox (analogue VIT E) *in vitro***

For the pre-treatment with trolox (ALDRICH®), we tested the concentrations of 20, 50, 100, 250 and 500 µM to determine the best dose. Next, tests were performed on the effect of trolox on cytotoxicity and cell proliferation. For these tests, a concentration of 2x10<sup>5</sup> cells in DMEM medium seeded in 24-well plates was used for 24 hours and, therefore, the results were observed in triplicate. The dose of the pre-treatment of trolox used corresponds to 500µM.

#### **Treat with curcumin *in vitro***

For curcumin pre-treatment (SIGMA®) in vitro, we applied 2.71mM curcumin to phosphate buffered saline (PBS) to perform the cellular pre-treatment on B16F10. We therefore tested concentrations of 10, 25, 50 and 100µM to determine the best pretreatment dose in B16F10 cells. Soon after, tests were performed again to verify cytotoxicity and cell proliferation of curcumin. In this way, the results were observed in triplicate. The dose of the curcumin pre-treatment that was used corresponds to 10µM curcumin.

#### **Treat with Dacarbazine (DTIC) *in vitro***

In the experiments in which we used the chemotherapeutic Dacarbazine (DTIC), there was a pre-treatment, 24 hours earlier, with the antioxidants trolox and Curcumin. Thus, we have the following experimental groups: trolox + DTIC, Curcumin + DTIC and pre-treatment with both antioxidants plus Dacarbazine (trolox + Curcumin + DTIC). The DTIC concentration used was 500 µg/ml "*in press*" in all groups for a period of 24 hours after the pre-treatment of trolox and curcumin performed within 24 hours, totaling 48 hours of treatment in the cell culture. Tests were performed to verify cytotoxicity and cell proliferation of the chemotherapeutic in all pre-treatments.

### **Cytotoxicity assay and Cell proliferation assay**

The cytotoxicity test was performed by the MTT 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) test to investigate cell viability by the mechanism of mitochondrial function alteration, according to standard Mosmann's bromide assay (1983). In the cell proliferation assay, the cell growth was evaluated according to the following procedure: the cells were suspended in tripan blue (0.05%) and counted the four quadrants of the Neubauer chamber. Cellular proliferation of the treatment was performed by counting viable cells (without staining) and non-viable cells (blue staining) according to the procedure described by Queiroz et al. <sup>(20)</sup>.

### **Oxidative stress parameters**

For evaluation of oxidative stress parameters, B16F10 cells were washed and trypsinized with 0.5 ml after treatment and the cell suspension was centrifuged at 600 g (4°C for 3 minutes). Cells were suspended in cold PBS buffer and frozen (-20 °C) until chemiluminescence (QL) analysis. The QL curves were obtained on a GloMax® 20/20 luminometer (Promega, Madison, USA), and the results are expressed as reading numbers per

relative light unit.

### **Statistical analysis**

The complete statistical analysis of this work used GraphPad Prisma (version 6.0; USA) to verify the normality of the results, which showed that all presented a normal distribution. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean and analyzed using analysis of variance (ANOVA). The intergroup differences were analyzed by the Tukey test and  $p < 0.05$  was considered statistically significant. The Spearman correlation was calculated using GraphPad Prism and correlations with  $p < 0.05$  were considered significant.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The low efficiency of Dacarbazine (DTIC) treatment in malignant melanoma, approximately 20% effectiveness and the need for more effective therapies against melanoma<sup>(1,21)</sup>, have become the object of study of several studies aimed at improving the effect of DTIC with adjuvant treatments and increased survival of the individual with melanoma<sup>(1,6)</sup>. In this scenario, it was proven the participation of oxidative stress (OE) in the progression of melanoma and also in the oxidation of the tumor microenvironment<sup>(22,23)</sup>. However, the involvement of the EO for a better efficacy of the DTIC is controversial<sup>(14,18)</sup>. Studies have shown that the antioxidant, analog of curcumin DM-1, directly interferes with neoplastic melanocytes in order to favor tumor regression, interfering little with normal melanocytes<sup>(24)</sup>. Other studies demonstrating otherwise<sup>(17)</sup>.

Our work addresses the use of antioxidants (trolox and curcumin) in murine melanoma cells (B16F10) and evaluates their therapeutic potential as adjuvant to treatment with Dacarbazine. The murine melanoma model B16F10 is considered one of the best to study melanoma *in vitro*<sup>(25,26)</sup>. We chose this cell line because it was one of the research lines

of our group, in which alternative treatments such as citral lemon and metformin were used, which demonstrated antineoplastic potential <sup>(27,28)</sup>. Metformin influenced both *in vitro* and *in vivo* treatment with predominant participation of reactive oxygen species, altering the redox status of B16F10 cells <sup>(28)</sup>, *in vivo*, the use of metformin at the systemic level reflected an efficient pro-antioxidant state in reducing tumor growth, reducing tumor mass by 54%.

In order to evaluate the cytotoxicity we have (Figure 1a) the increase in the cytotoxicity of the pre - treated group with 10 $\mu$ M curcumin when compared to the control, (p<0.05), demonstrating that only curcumin has cellular cytotoxicity. This result was subsidized by another study in which a cytotoxicity was found at the same concentration of 10 $\mu$ M curcumin in B16F10 cells <sup>(29)</sup>. There was a significant difference between the DTIC groups as the sole treatment and the control group (p<0.05) evidencing the chemotherapy effect of the DTIC observed in Figure 1b. It was also found that cytotoxicity in pre-treatment with curcumin for 24 hours and then with DTIC for another 24 hours was potentiated, that is, there was greater cytotoxicity in relation to the control and the group Dacarbazine when the cells are pre-treated with curcumin.

Regarding cell proliferation, it was observed that only pre-treatment with curcumin and trolox significantly reduced the number of viable cells. (Figure 1c) The DTIC + CURCUMIN group significantly decreases the cell proliferation of B16F10 cells relative to Dacarbazine alone (Figure 1d). Agreeing our data, a other *in vivo* study of murine melanoma that evaluated the effect of Dacarbazine and an analysis of curcumin (DM-1), obtained promising results, achieving a 100% survival in the combined treatment DTIC + DM-1 <sup>(24)</sup>.

The dissemination of melanoma evolves in the face of the imbalance between oxidants and cellular pro-oxidants (EO), in which lipoperoxides are formed <sup>(23)</sup>. Lipoperoxides are derived from the reaction of reactive species ERO and ERN with lipids of the cell membrane, the reaction occurs in the form of cascade and significantly increases the oxidative

damage in the cell <sup>(23,30)</sup>. This reaction can also break the membrane generating toxic side products, maloldialdehyde, 8-hydroxyguanozine that comes from proteins and DNA, respectively, these alterations damage the cells, which can lead to cell death <sup>(30)</sup>.

We verified by chemiluminescence the increase of membrane lipoperoxides that would be indicative of EO. In which curcumin pretreatment demonstrates an increase of oxidative stress by lipoperoxides in comparison to control and pre-treatment with trolox (figure 2a). When we analyzed the DTIC chemotherapy and its impact on the lipoperoxidation of B16F10 cells, we noticed a significant increase when cells were pretreated with curcumin ( $p < 0.05$ ) (figure 2b). The explanation given to the increased toxicity of DTIC on melanoma cells when pretreated with curcumin is in the fact that curcumin inhibits the P450 complex, where it is this complex that metabolizes the chemotherapeutic <sup>(19)</sup>. Thus curcumin acts on the enzymatic complex P450 that could facilitate the reaction of the active metabolite of the DTIC (methionine ion), favoring its action.

We concluded with this work that curcumin, a natural antioxidant derived from the plant (*Curcuma longa c.*), applied experimentally *in vitro*, showed cytotoxic and antiproliferative activity, potentiating the action of the chemotherapeutic Dacarbazine when used as a pretreatment

We observed an improvement in the action potential of the treatment with Dacarbazine, considering its low efficacy, and that this effect is a reflection of a significant increase in membrane lipoperoxides caused by curcumin, so we suggested a possible mechanism for lipoperoxidation given by curcumin in the treatment with Dacarbazine.

## References

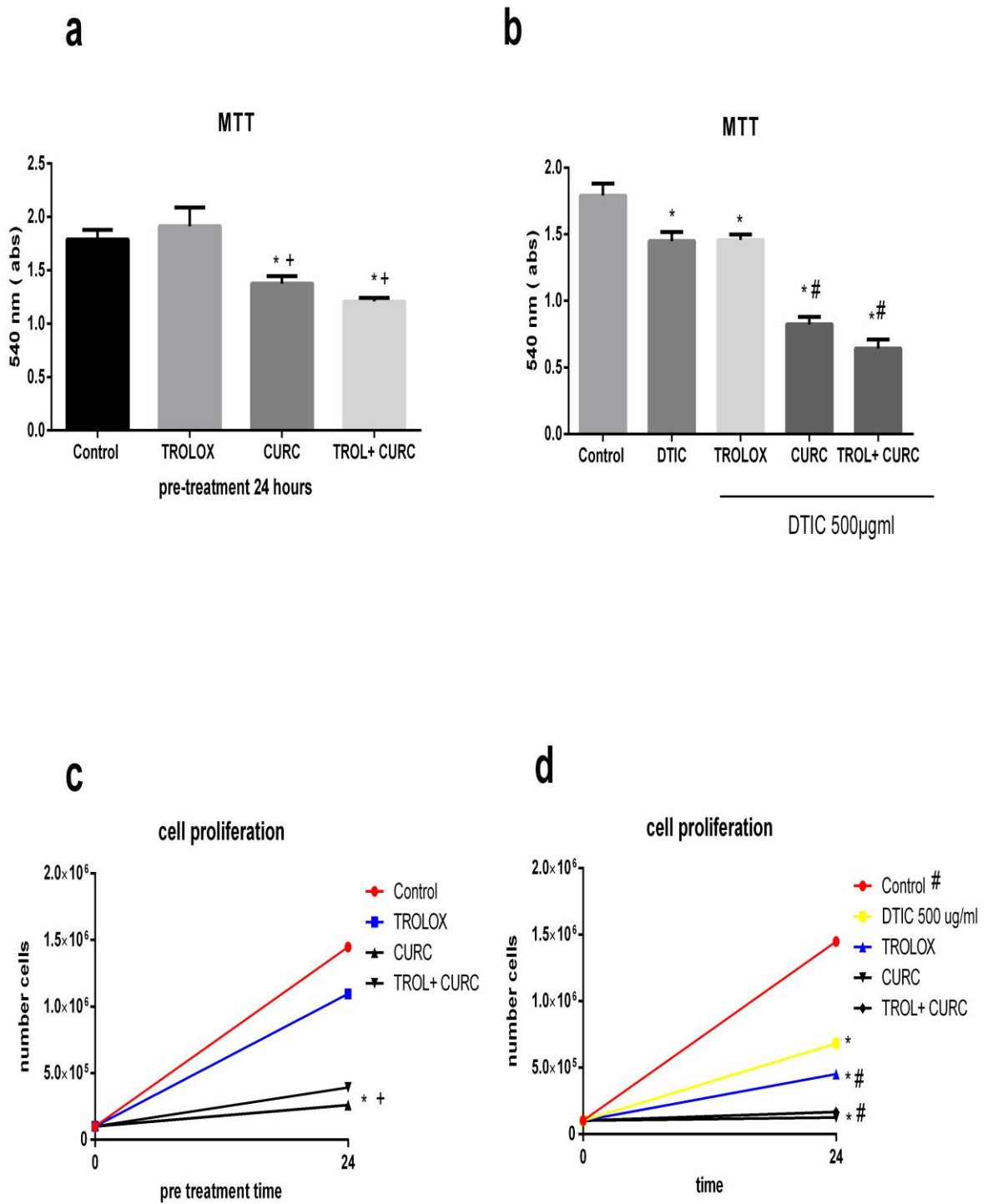
1. Baharara J, Amini E, Nikdel N, Salek-Abdollahi F. The cytotoxicity of dacarbazine potentiated by sea cucumber saponin in resistant B16F10 melanoma cells through apoptosis induction. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 2016; 8 (3): 112-9.
2. D'Mello SAN, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling Pathways in Melanogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016; 17 (7): 1-18.
3. Brazil. Instituto Nacional do Câncer. [Internet]. [cited 2018 May 17]. Available at: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_melanoma/definicao](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao)
4. Cervenka PD, Perez L, Perez DE, Jones B. Melanoma metastasis to the mandible—case report and comprehensive literature review. *Journal Oral Maxillofac Surgiry*. 2017; 75 (9): 1-12.
5. Amirmostofian M, Jaktaji JP, Soleimani Z, Tabib K, Tanbakosazan F, Omrani M, et al. Synthesis and Molecular-cellular Mechanistic Study of Pyridine Derivative of Dacarbazine. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2012; 12 (3): 255-65.
6. Koprowska K, Czyż M. Dacarbazine, a chemotherapeutic against metastatic melanoma and a reference drug for new treatment modalities. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej*. 2011; 65: 734-51.
7. Wainstein AJA, Belfort FA. Conduta para o melanoma cutâneo. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2014; 31 (3): 204-14.
8. Achkar T, Tarhini AA. The use of immunotherapy in the treatment of melanoma. *Journal of Hematology & Oncology*. 2017; 2017: 2-9.
9. Pasquali S, Hadjinicolaou AV, Chiarion S, Rossi CR, Mocellin S. Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma. Instituto Nazionale Tumori, Milano, Italy: Cochrane Skin Group; 2018.

10. Atkinson V. Medical management of malignant melanoma. *Australian Prescriber*. 2015; 38 (3): 73-8.
11. Tentori L, Lacal PM, Graziani G. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. *Trends In Pharmacological Sciences*. 2013; 34 (12): 656-65.
12. Yu Z, Si L. Immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *Chinese Clinical Oncology*. 2017; 2 (6): 1-9.
13. Li YH, Niu YB, Sun Y, Zhang F, Liu CX, Fan L, et al. Role of phytochemicals in colorectal cancer prevention. *World Journal of Gastroenterology*. 2015; 21 (31): 9262-72.
14. Venza M, Visalli M, Beninati C, Gaetano GV, Teti D, Venza I. Cellular mechanisms of oxidative stress and action in melanoma. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015; 2015: 1-11.
15. Lellia D, Pedonea C, Sahebkar A. Curcumin and treatment of melanoma: The potential role of microRNAs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017; 88 (1): 832-4.
16. Das L, Vinayak M. Long term effect of curcumin in restoration of tumour suppressor p53 and phase-ii antioxidant enzymes via activation of Nrf2 signalling and modulation of inflammation in prevention of cancer. *Plos One*. 2015; 1 (2015): 1-22.
17. Faião-Flores F, Quincoces Suarez JÁ, Fruet AC, Maria-Engler SS, Pardi PC, Maria DA. Curcumin analog DM-1 in monotherapy or combinatory treatment with dacarbazine as a strategy to inhibit in vivo melanoma progression. *Plos One*. 2015; 2015: 1-16.
18. Wolnicka-Glubisz A, Nogal K, Zadło A, Plonka PM. Curcumin does not switch melanin synthesis towards pheomelanin in B16F10 cells. *Archives of Dermatology Research*. 2014; 307 (1): 89-98.
19. Chen X, Hall H, Simpson JP, Leon-Salas WD, Ready DF, Weake VM. Cytochrome b5 protects photoreceptors from light stress induced lipid peroxidation and retinal degeneration. *Npj - Aging And Mechanism of Disease*. 2017; 3 (18): 1-9.

20. Queiroz EA, Puukila S, Eichler R, Sampaio SC, Forsyth HL, Lees SJ, et al. Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 breast cancer cells, *Plos One*. 2014; 9 (5): e 98207.
21. Almeida VL, Leitão A, Reina LCB, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MTP. Cancer and non-specific cycle-cellular and cycle- cellular antineoplastic agents that interact with DNA: an introduction. *Química Nova*. 2004; 28 (1): 118-29.
22. Bernardes SS, Souza-Neto FP, Melo GP, Guarnier FA, Marinello PC, Cecchini R, et al. Correlation of TGF- $\beta$ 1 and oxidative stress in the blood of patients with melanoma: a clue to understanding melanoma progression? *Tumor Biology*. 2015; 1 (2015): 4967-74.
23. Gadjeva V, Dimov A, Georgieva N. Influence of therapy on the antioxidant status in patients with melanoma. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2007; 33 (2): 179-85.
24. Faião-Flores F, Suarez JA, Maria-Engler SS, Soto-Cerrato V, Pérez-Tomás R, Maria DA. The curcumin analog DM-1 induces apoptotic cell death in melanoma. *Tumor Biology*. 2013; 34(2): 1119-29.
25. Carvalho AA, Costa PM, Souza LGS, Lemos TL, Alves AP, Pessoa C, et al. Inhibition of metastatic potential of B16-F10 melanoma cell line in vivo and in vitro by biflorin. *Life Sciences*. 2013; 93(5-6): 201-7.
26. Huang HC, Hsieh WY, Niu YL, Chang TM. Inhibitory effects of adlay extract on melanin production and cellular oxygen stress in B16F10 melanoma cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014; 15 (9): 16665-79.
27. Sanches LJ, Marinello PC, Panis C, Fagundes TR, Morgado-Díaz JA, Freitas-Junior JC, et al. Cytotoxicity of citral against melanoma cells: the involvement of oxidative stress generation and cell growth protein reduction. *Tumor Biology*. 2016; 1 (1): 1-15.
28. Souza Neto FP, Bernardes SS, Marinello PC, Melo GP, Luiz RC, Cecchini R, et al.

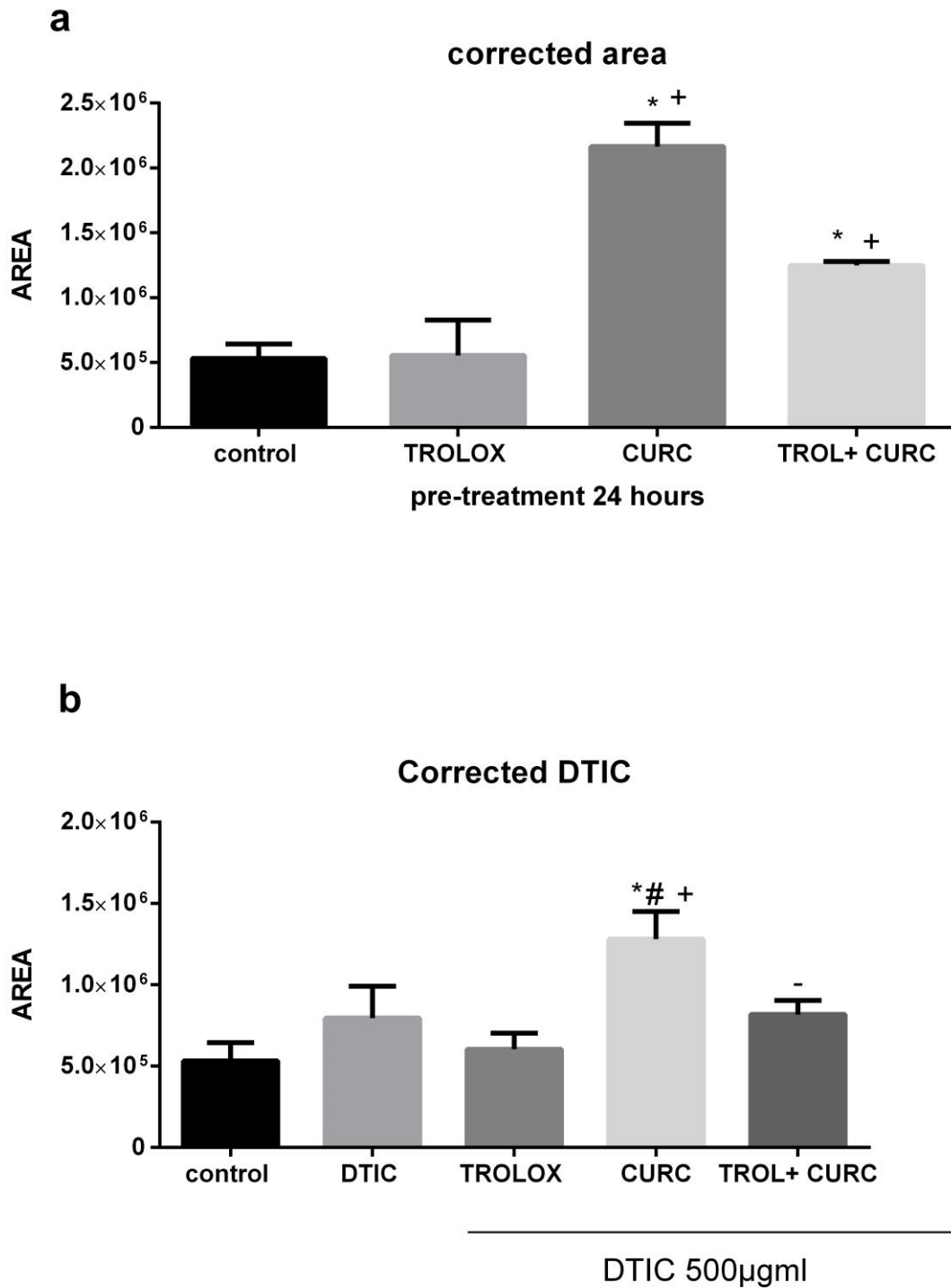
Metformin: oxidative and proliferative parameters in-vitro and in-vivo models of murine melanoma. *Melanoma Research*. 2017; 27 (2017): 536-44.

29. Wang B, Liu X, Teng Y, Yu T, Chen J, Hu Y, et al. Improving anti-melanoma effect of curcumin by biodegradable nanoparticles. *Oncotarget*. 2017; 8 (65): 108624-42.
30. Rai B, Kaur J, Jacobs R, Singh J. Possible action mechanism for curcumin in pre-cancerous lesions based on serum and salivary markers of oxidative stress. *Journal of Oral Science*. 2010; 52 (2): 251-6.



**Figure 1** - The graphs presented (a and b) demonstrate the cell viability parameters in vitro. The "a" graph shows only the data regarding pre-treatment with 500  $\mu$ M trolox, 10  $\mu$ M curcumin and the combination of trolox 500  $\mu$ M + curcumin 10  $\mu$ M at the same concentrations for 24 hours. On the other hand, the graph "b" provides information on

treatment with DTIC 500 µg/ml in B16F10 in vitro 24 hours after pretreatment. The graphs presented (c and d) demonstrate the parameters of cell proliferation in vitro. As shown in figure "c", which shows only the pre-treatment with 500 µM trolox, 10 µM curcumin and the combination of trolox 500µM + curcumin 10 µM for 24 hours, whereas in "d" the treatment with DTIC in B16F10 in vitro 24 hours after pretreatment. Significant differences, consider that \* is the difference between groups at the control  $p < 0.05$ ; # corresponds to the difference between groups related to Dacarbazine  $p < 0.05$ ; + difference related to Trolox  $p < 0.05$ .



**Figure 2** - The graphs presented (a and b) demonstrate the membrane lipoperoxide parameters in B16F10 cells, analyzed by chemiluminescence (QL) The "a" graph presents the data regarding the pre-treatment 500 µM trolox, 10 µM curcumin and the combination of trolox 500µM + curcumin 10µM for 24 hours. The "b" chart provides information on treatment with

DTIC 500 µg/ml within 24 hours after pretreatment. Statistical data showed significant differences for  $p < 0.05$ , considering that \* is the difference between groups regarding the control; # corresponds to the difference between groups related to Dacarbazine; + difference related to Trolox and - difference related to curcumin

**Declaration of conflicting interests**

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos dias atuais, as neoplasias, são consideradas pela alta complexidade a qual estão envolvidas, um grande desafio a comunidade científica, que considera com entusiasmo cada pesquisa e dado encontrado acerca dos diversos tipos dessa doença.

O melanoma, câncer de pele extremamente agressivo e mortal na maioria dos casos, apresenta um tratamento quimioterápico por Dacarbazina considerado ineficaz, o que aumenta o foco dos profissionais de saúde para as terapias associadas a Dacarbazina na tentativa de melhorar a sua ação. Empregamos o modelo B16F10 nesse trabalho, por fazer parte da pesquisa do nosso grupo e por ser recomendado na literatura como um modelo ideal no estudo do melanoma.

O estresse oxidativo está intimamente relacionado a carcinogênese do melanoma cutâneo. O uso de antioxidantes desafia a ciência na interação com as espécies reativas nas reações ocorridas em células transformadas malignamente.

A Curcumina nesse trabalho demonstrou propriedades citotóxicas e antiproliferativas na linhagem celular da B16F10, também potencializou a ação da Dacarbazina por inibir as enzimas do citocromo p-450 responsáveis pela metabolização do quimioterápico, favorecendo o efeito deste por mais tempo.

Ainda relacionando o dano celular causado pelo estresse oxidativo (os níveis de lipoperóxidos de membrana), observamos que houve aumento destes na célula B16F10 pré-tratada com curcumina, indicando uma possível terapia alternativa da curcumina no tratamento do melanoma metastático com o quimioterápico Dacarbazina.