

## ANÁLISE DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS PERIFÉRICAS MONONUCLEARES DE PACIENTES COM MELANOMA

Greicy C. Kosvoski<sup>1\*</sup>, Helena F. Basso<sup>1</sup>, Aline Mânica<sup>2</sup>, Filomena Marafon<sup>3</sup>, Beatriz da S. R. Bonadiman<sup>3</sup>, Alessandra Paiz<sup>4</sup>, Vitória Maria Marques<sup>1</sup>, Margarete D. Bagatini<sup>5</sup>

1. Estudante de Enfermagem da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)
2. Doutoranda em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) da Universidade Federal de Santa Maria (UFMS)
3. Doutoranda em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)
4. Enfermeira Residente em Saúde da Família (UFPR)
5. Professora da UFFS – Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) – Orientadora

### Resumo

O melanoma cutâneo (MC) é o câncer de pele que se desenvolve como resultado da transformação maligna dos melanócitos. O estresse oxidativo altera o equilíbrio dos melanócitos e induz a transformação maligna. Sendo assim, o objetivo principal foi avaliar os níveis de estresse oxidativo em uma população com melanoma. Foi realizado um estudo de caso-controle *in vitro*, através de cultivo celular de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com MC em 24 e 48 horas. Os resultados obtidos foram: significativa diminuição da atividade da GSH nas células dos pacientes com melanoma em 24 e 48 horas de cultivo quando comparadas ao controle 24hs. Em relação a quantificação de vitamina C, foi observada uma significativa diminuição nas PBMCs dos pacientes com melanoma, cultivadas durante 24 horas, quando comparado aos outros grupos. Para os outros parâmetros avaliados não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Em resumo, foi demonstrado uma alteração no equilíbrio oxidativo nas células dos pacientes com melanoma e a suplementação com antioxidantes naturais poderia ser uma terapia alternativa nesses pacientes.

**Autorização legal:** O protocolo do presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal da Fronteira Sul sob número 822.782.

**Palavras-chave:** câncer de pele; enzimologia; radicais livres.

**Apoio financeiro:** CAPES; CNPq

### Introdução

O câncer de pele - melanoma e não melanoma, é o tipo mais comum de neoplasia na população caucasiana. O melanoma porém, apresenta maior agressividade e se desenvolve como resultado da transformação maligna dos melanócitos, células produtoras do pigmento melanina (APALLA et al., 2017). A frequência de novos casos dobra a cada 10 - 15 anos e a incidência é crescente, especialmente na população jovem. O número de vidas perdidas pela morte por melanoma é excessivamente maior do que para outras doenças malignas, tornando-se um importante problema de saúde pública (PASTUSHENKO et al., 2014). Células de MC Podem surgir em qualquer território anatômico ocupado por melanócitos, porém os melanócitos da pele é o local mais comum de origem (GODAR; SUBRAMANIAN; MERRILL, 2017; TSAO et al., 2012).

O estresse oxidativo está envolvido em todas as etapas no desenvolvimento do melanoma, bem como na modulação das vias de proliferação e morte celular (SANCHES et al., 2017). Os altos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs) promovem o estresse oxidativo associado à morte celular através da oxidação de proteínas, DNA e lipídios. As EROs, incluindo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), íon superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e radical hidroxila (HO), são produzidas principalmente durante as reações metabólicas que consomem oxigênio e que ocorrem nos peroxissomos, retículo endoplasmático e nas mitocôndrias (PEIRIS-PAGÈS et al., 2015). O estresse oxidativo pode afetar o equilíbrio homeostático de melanócitos, devido ao estado pró-oxidante gerado durante a síntese de melanina, ameaçando sua sobrevivência ou induzindo a transformação maligna (HAMBRIGHT et al., 2015).

Portanto, considerando que a região geográfica de estudo escolhida – região oeste e meio oeste de Santa Catarina (SC) – é uma região com forte prevalência e quando diagnosticado em estágio inicial o melanoma tem bom prognóstico com altas possibilidades de cura, o estudo do estresse oxidativo em pacientes com melanoma é de fundamental relevância para descrever o mecanismo de ação dessa doença e buscarmos terapias que reduzam a morbimortalidade.

### Metodologia

O trabalho foi um estudo de caso-controle *in vitro* – células dos indivíduos com a doença foram comparadas as células dos indivíduos controles, através de cultivo celular de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Todos os testes foram realizados em triplicatas. Os indivíduos participantes foram da região oeste e meio oeste do estado de SC, selecionados de acordo com a Classificação Internacional de Doenças (CID) antes da remoção cirúrgica ou de qualquer tratamento. Os pacientes controles do estudo foram aqueles que não tinham doença aguda ou crônica ou história de melanoma, além de ter pressão arterial normal e não estarem sob terapia medicamentosa. Para os que aceitaram participar através da assinatura de TCLE, foram

coletados 15 ml de sangue venoso em tubo com anticoagulante EDTA e realizada uma cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) dos participantes. A amostra foi composta por 20 pacientes com melanoma e 20 indivíduos saudáveis como grupo controle, selecionados de acordo com as características, idade e sexo do grupo melanoma.

As PBMCs foram isoladas de sangue de participantes saudáveis e com melanoma dentro de 1 a 2 horas após a coleta. O procedimento consistiu na diluição do sangue coletado 1: 1 com solução salina tamponada com fosfato (PBS), cuidadosamente colocado em camadas sobre Ficoll-Paque PLUS e centrifugado a 400g durante 40 min.

Após o processo de centrifugação, as PBMCs foram cautelosamente separadas, ressuspensas em 15 ml de PBS e centrifugadas novamente a 500g por 15 min. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspensão em 15 ml de PBS e centrifugado a 500g durante 10 min. O sobrenadante foi removido novamente e o sedimento foi ressuspensão em 1 ml de meio RPMI (11,1 mM de glicose, suplementado com 3% de FBS, 50 unidades/ml de penicilina, 50 g/ml de estreptomicina). As PBMCs foram cultivadas em RPMI-1640 suplementada com 100 U/ml de penicilina e 10% de soro fetal bovino nos seguintes grupos: controle 24 horas, melanoma 24 horas, controle 48 horas e melanoma 48 horas. Todos os procedimentos e análises foram realizadas no laboratório 1 da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Chapecó.

Para as análises de estresse oxidativo foram realizados os seguintes testes: avaliação da peroxidação lipídica/ ensaio TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) de acordo com JENTZSCH et al. (1996); o conteúdo de ácido ascórbico de acordo com JACQUES-SILVA et al. (2001); a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), conforme SUZUKI et al., 1983). A quantificação dos grupamentos tióis, biomarcadores clássicos de estresse oxidativo, de acordo com ELLMAN (1959).

## Resultados e Discussão

Apesar de representar apenas 3 a 4% dos cânceres de pele no Brasil, o melanoma é responsável por mais de 75% das mortes por câncer (FERREIRA; NASCIMENTO, 2016). A frequência de novos casos aumenta a cada ano e a incidência é crescente, especialmente na população jovem da região Sul do Brasil, tornando-se um importante problema de saúde pública (CALLAHAN; FLAHERTY; POSTOW, 2016). Fatores de risco constitucionais e ambientais estão associados ao aparecimento dos melanomas, entretanto, pesquisas recentes apontam que fatores ainda não estudados possam estar favorecendo o aumento do número de casos (CHEN et al., 2016; PILLAIYAR; MANICKAM; JUNG, 2017).

Neste trabalho foram avaliados parâmetros de estresse oxidativo nas PBMCs de pacientes com melanoma e controles, para verificar os níveis de estresse oxidativo presente nestas células bem como correlacionar com a agressividade do melanoma. Sendo assim, as PBMCs foram avaliadas após 24 e 48 horas de cultivo e comparadas com seus respectivos controles. Os resultados obtidos foram: significativa diminuição da atividade da GSH nas células dos pacientes com melanoma em 24 e 48 horas de cultivo (Anova de uma via  $p= 0,0401$ ) quando comparadas ao controle 24hs. Em relação a quantificação de vitamina C, foi observada uma significativa diminuição nos níveis de vitamina C nas PBMCs dos pacientes com melanoma cultivadas durante 24 horas (Anova de uma via  $p= 0,0015$ ) quando comparado aos outros grupos. Para os outros parâmetros avaliados: TBARS, atividade da Mieloperoxidase, quantificação dos tióis proteicos e não proteicos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

A glutatona (GSH) desempenha um papel fundamental no controle celular de EROs além de ser associada a metástases linfonodais, tornando-se um alvo potencial na regulação de metástases de melanoma (LI et al., 2018). Nossos resultados demonstraram uma diminuição na quantificação dessa molécula em 24 e 48 horas de cultivo nos pacientes com melanoma, o que pode sugerir um aumento das EROS e conseqüentemente possível evolução do melanoma. No estudo de Li et al. (2018) foi demonstrado que uma diminuição da produção de GSH, similar aos nossos resultados, levou ao desenvolvimento de metástases em células de melanoma B16F10.

A vitamina C (ácido ascórbico) desempenha um papel importante na manutenção da saúde da pele e pode promover a diferenciação de queratinócitos e diminuir a síntese de melanina, levando à proteção antioxidante contra a fotodanos induzidos por radiação UV. Por outro lado, altas doses de vitamina C reduziram significativamente a viabilidade das células cancerosas, a invasividade e a apoptose induzida no melanoma maligno humano (WANG et al., 2018). Nossos resultados mostraram uma significativa diminuição da concentração de vitamina C nos pacientes com melanoma 24 horas de cultivo, quando comparados ao seu controle. Nesses pacientes, o melanoma pode estar diminuindo as concentrações desse antioxidante com o objetivo de facilitar seu crescimento e evolução. Em relação aos outros parâmetros avaliados, apesar de apresentarem uma tendência, não obtivemos diferença significativa entre os grupos.

## Conclusões

Nossos resultados demonstram uma alteração no equilíbrio oxidativo nas células dos pacientes com melanoma em alguns dos parâmetros avaliados. Apesar das limitações do estudo em humanos, pode-se sugerir que a suplementação com antioxidantes naturais em pacientes com melanoma poderia ser uma terapia alternativa para melhoria da qualidade de vida, além de diminuir a agressividade desse câncer.

## Referências bibliográficas

- APALLA, Z. et al. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. **Dermatology and Therapy**, v. 7, n. S1, p. 5–19, 1 jan. 2017.
- CALLAHAN, M. K.; FLAHERTY, C. R.; POSTOW, M. A. **Melanoma**. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 167
- CHEN, G.-L. et al. High fat diet increases melanoma cell growth in the bone marrow by inducing osteopontin and interleukin 6. **Oncotarget**, v. 7, n. 18, p. 1–17, 2016.
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, maio 1959.
- FERREIRA, F. R.; NASCIMENTO, L. F. C. Mortality due to cutaneous melanoma in south region of Brazil: a spatial approach. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 4, p. 437–441, ago. 2016.
- GODAR, D. E.; SUBRAMANIAN, M.; MERRILL, S. J. Cutaneous malignant melanoma incidences analyzed worldwide by sex, age, and skin type over personal Ultraviolet-B dose shows no role for sunburn but implies one for Vitamin D 3. **Dermato-Endocrinology**, v. 9, n. 1, p. e1267077, 14 jan. 2017.
- HAMBRIGHT, H. G. et al. Inhibition of PI3K/AKT/mTOR axis disrupts oxidative stress-mediated survival of melanoma cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 9, p. 7195–7208, 30 mar. 2015.
- JACQUES-SILVA, M. C. et al. Diphenyl Diselenide and Ascorbic Acid Changes Deposition of Selenium and Ascorbic Acid in Liver and Brain of Mice. **Pharmacology and Toxicology**, v. 88, n. 3, p. 119–125, mar. 2001.
- JENTZSCH, A. M. et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 2, p. 251–256, 1996.
- LI, X. et al. Glutathione reductase-mediated thiol oxidative stress suppresses metastasis of murine melanoma cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 129, p. 256–267, dez. 2018.
- PASTUSHENKO, I. et al. Mechanisms of tumour vascularization in cutaneous malignant melanoma: clinical implications. **The British journal of dermatology**, v. 171, n. 2, p. 220–233, 2014.
- PEIRIS-PAGÈS, M. et al. Metastasis and Oxidative Stress: Are Antioxidants a Metabolic Driver of Progression? **Cell Metabolism**, v. 22, n. 6, p. 956–958, 2015.
- PILLAIYAR, T.; MANICKAM, M.; JUNG, S.-H. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. **Cellular Signalling**, v. 40, p. 99–115, dez. 2017.
- SANCHES, L. J. et al. Cytotoxicity of citral against melanoma cells: The involvement of oxidative stress generation and cell growth protein reduction. **Tumor Biology**, v. 39, n. 3, p. 101042831769591, 2017.
- SUZUKI, K. et al. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. **Analytical Biochemistry**, v. 132, n. 2, p. 345–352, 1983.
- TSAO, H. et al. Melanoma: From mutations to medicine. **Genes and Development**, v. 26, n. 11, p. 1131–1155, 2012.
- WANG, K. et al. Role of Vitamin C in Skin Diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. July, p. 1–9, 4 jul. 2018.